

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2012.11.28	(73) Titular(es):
(30) Prioridade(s):	UNIVERSIDADE DO MINHO LARGO DO PAÇO 4704-553 BRAGA PT
(43) Data de publicação do pedido: 2014.05.28	UNIVERSIDADE DO PORTO PRAÇA GOMES TEIXEIRA, S/N, 4º, S.419 4099-002 PORTO PT
	(72) Inventor(es):
	MARIA JOÃO LOPES DA COSTA VIEIRA PT
	CARINA MANUELA FERNANDES ALMEIDA PT
	NUNO FILIPE RIBEIRO PINTO DE OLIVEIRA AZEVEDO PT
	JOSÉ ANTÓNIO BAPTISTA MACHADO SOARES PT
	NUNO MIGUEL DIAS CERCA PT
	(74) Mandatário:
	MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **SONDAS DE ÁCIDO PÉPTIDO NUCLEICO, ESTOJO E MÉTODO PARA DETECTAR ESPÉCIES DO GÉNERO LACTOBACILLUS SPP. E/OU GARDNERELLA SPP. E RESPECTIVAS APLICAÇÕES**

(57) Resumo: O PRESENTE INVENTO REFERE-SE À CONCEPÇÃO DE DUAS SONDAS DE ÁCIDO PÉPTIDO NUCLEÍCO (PNA) PARA DETECTAR AS BACTÉRIAS LACTOBACILLUS E/OU GARDNERELLA SPP.. ESTAS SONDAS SÃO APLICADAS A UM PROCESSO BASEADO EM TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR, NOMEADAMENTE DE HIBRIDAÇÃO FLUORESCENTE IN SITU (FISH), APLICÁVEIS NO DIAGNÓSTICO DE VAGINOSE BACTERIANA OU A DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DESTES GÉNEROS BACTERIANOS EM DIVERSOS TIPOS DE AMOSTRAS, INCLUINDO SANGUE, ALIMENTOS, BIOPSIAS, FEZES, ÁGUA E OUTRAS AMOSTRAS CLÍNICAS, AMBIENTAIS OU PROVENIENTES DA INDÚSTRIA AGRÍCOLA OU ALIMENTAR.

RESUMO

"SONDAS DE ÁCIDO PÉPTIDO NUCLEICO, ESTOJO E MÉTODO PARA DETECTAR ESPÉCIES DO GÉNERO LACTOBACILLUS SPP. E/OU GARDNERELLA SPP. E RESPECTIVAS APLICAÇÕES"

O presente invento refere-se à concepção de duas sondas de ácido péptido nucleico (PNA) para detectar as bactérias *Lactobacillus* e/ou *Gardnerella* spp.. Estas sondas são aplicadas a um processo baseado em técnicas de biologia molecular, nomeadamente de hibridação fluorescente *in situ* (FISH), aplicáveis no diagnóstico de vaginose bacteriana ou a detecção e quantificação destes géneros bacterianos em diversos tipos de amostras, incluindo sangue, alimentos, biopsias, fezes, água e outras amostras clínicas, ambientais ou provenientes da indústria agrícola ou alimentar.

Devido às características físico-químicas inerentes à sua estrutura, estas sondas permitem uma análise mais rápida e sensível do que usando sondas de ADN.

Outro dos aspectos da presente invenção relaciona-se com o desenvolvimento de um estojo, utilizando uma ou as duas sondas de PNA aqui descritas e no referido processo de detecção ou quantificação, que tem como objectivo a identificação de *Lactobacillus* spp. e/ou *Gardnerella* spp. em amostras clínicas.

RESUMO

“SONDAS DE ÁCIDO PÉPTIDO NUCLEICO, ESTOJO E MÉTODO PARA DETECTAR ESPÉCIES DO GÉNERO *LACTOBACILLUS SPP.* E/OU *GARDNERELLA SPP.* E RESPECTIVAS APLICAÇÕES”

O presente invento refere-se à concepção de duas sondas de ácido péptido nucleico (PNA) para detectar as bactérias *Lactobacillus* e/ou *Gardnerella spp.*. Estas sondas são aplicadas a um processo baseado em técnicas de biologia molecular, nomeadamente de hibridação fluorescente *in situ* (FISH), aplicáveis no diagnóstico de vaginose bacteriana ou a detecção e quantificação destes géneros bacterianos em diversos tipos de amostras, incluindo sangue, alimentos, biopsias, fezes, água e outras amostras clínicas, ambientais ou provenientes da indústria agrícola ou alimentar.

Devido às características físico-químicas inerentes à sua estrutura, estas sondas permitem uma análise mais rápida e sensível do que usando sondas de ADN.

Outro dos aspectos da presente invenção relaciona-se com o desenvolvimento de um estojo, utilizando uma ou as duas sondas de PNA aqui descritas e no referido processo de detecção ou quantificação, que tem como objectivo a identificação de *Lactobacillus spp.* e/ou *Gardnerella spp.* em amostras clínicas.

DESCRIÇÃO

"SONDAS DE ÁCIDO PÉPTIDO NUCLEICO, ESTOJO E MÉTODO PARA DETECTAR ESPÉCIES DO GÉNERO LACTOBACILLUS SPP. E/OU GARDNERELLA SPP. E RESPECTIVAS APLICAÇÕES"

Campo da Invenção

Esta invenção insere-se no âmbito de um processo de detecção de microrganismos clinicamente relevantes para a avaliação do processo infeccioso denominado por vaginose bacteriana, tendo sido desenvolvidas duas sondas de ácido péptico nucleico (PNA) para a detectar a *Lactobacillus spp.* e/ou a *Gardnerella spp.* em diversos tipos de amostras.

Outro dos aspectos da presente invenção relaciona-se com a aplicação destas sondas e referido processo de detecção a um estojo para a detecção e quantificação de *Lactobacillus spp.* e/ou de *Gardnerella spp.* em amostras biológicas tendo, portanto, aplicação clínica para o diagnóstico de vaginose bacteriana.

Antecedentes da Invenção

Lactobacillus spp. e *Gardnerella spp.* constituem bactérias intrínsecas da mucosa vaginal. Em casos normais, as bactérias do género *Lactobacillus spp.* encontram-se em elevado número enquanto que as bactérias do género *Gardnerella spp.* existem em número diminuto ou encontram-se mesmo ausentes. Embora as bactérias na forma planctónica do género *Gardnerella spp.* estejam presentes na microflora vaginal de mulheres saudáveis, estas podem eventualmente formar biofilmes ocorrendo assim casos de vaginose bacteriana. O biofilme de *Gardnerella spp.* induz a uma alteração de expressão fenotípica e, conseqüentemente a uma

maior virulência. Simultaneamente, o número de bactérias *Lactobacillus spp.* diminui drasticamente, em casos de vaginose bacteriana, favorecendo o crescimento microbiano de anaeróbios patogénicos na mucosa vaginal. Desta maneira, destaca-se a necessidade da utilização das duas sondas de ácido péptido nucleico para avaliação da microflora vaginal.

O diagnóstico da infecção por vaginose bacteriana pode ser baseado em métodos morosos, que implicam um exame clínico e um exame laboratorial que normalmente implica realizar uma cultura microbiana de exsudado vaginal do paciente. O diagnóstico clínico é o mais frequentemente utilizado, embora seja propício a erros e extremamente susceptível da interpretação do médico. Este exame consiste na identificação de pelo menos três resultados positivos em quatro sintomas/sinais característicos desta infecção vaginal, mais propriamente, nível de pH do corrimento vaginal igual ou superior a 4.5, a presença de células epiteliais cobertas de bactérias de carácter Gram negativo, aparência típica de descarga ou corrimento no exame vaginal e a libertação de um odor característico de produtos azotados pela adição de uma solução de hidróxido de potássio a 10%. Por sua vez, o exame laboratorial por cultura microbiana consiste na inoculação de exsudado vaginal do paciente num meio enriquecido com 5-10% de sangue, como por exemplo Human Blood medium (HBA) ou Brucella Blood medium (BBA), durante 48-72h à 37°C numa atmosfera de 5% de dióxido de carbono. Em seguida, o crescimento bacteriano é usualmente quantificado pelas quatro zonas de crescimento na placa de Petri e realiza-se a observação no microscópio, após a coloração de Gram. Durante a observação microscópica da coloração de Gram

aplica-se o critério de Nugent et al., 1991, classificando assim a amostra observada num dos três diagnósticos possíveis: microflora vaginal normal; microflora vaginal intermédia; e vaginose bacteriana. No entanto, a falta de sensibilidade/especificidade do exame clínico e a morosidade na análise da cultura microbiana implicam um procedimento complexo para o diagnóstico clínico correcto de vaginose bacteriana nos pacientes.

Outros ensaios laboratoriais empregam métodos baseados em PCR ("Polimerase Chain Reaction" - reacção em cadeia pela polimerase) para a identificação de estirpes bacterianas na vaginose bacteriana. Porém esta técnica exige alguns cuidados ao nível de contaminação do ADN que, caso não sejam seguidos, se podem traduzir num falso positivo ou mesmo num falso negativo. Além disso, devido à presença de *Gardnerella spp.* em amostras clínicas de mulheres saudáveis, embora em baixo número, impede assim a aplicação desta metodologia como procedimento de diagnóstico clínico.

Recentemente, têm sido desenvolvidas e optimizadas sondas de ácidos péptido nucleicos (PNA) para a detecção bacteriana. As moléculas de PNA são mímicas das de ADN, na qual a estrutura carregada negativamente de açúcar-fosfato é substituída por uma aquiral e electricamente neutra formada por unidades repetidas de N -(2-aminoetil) glicina.

Embora a molécula de PNA não possua pentoses, ocorre hibridação específica entre as sequências de PNA e as sequências complementares de ácidos nucleicos, por ligações de hidrogénio. Esta hibridação obedece às regras de Watson-Crick.

A natureza electricamente neutra do PNA é responsável pelas características de hibridação mais robustas desta molécula, no que respeita à alta estabilidade nas ligações PNA/sequência alvo (rARN ou DNA de dupla cadeia), quando se compara com as sondas de ADN, tradicionalmente usadas. Assim, devido à sua afinidade elevada, as sondas de PNA têm sequências de nucleótidos relativamente curtas, preferivelmente entre 8 a 17 nucleótidos. Uma sonda de ADN tem, normalmente, pelo menos 18 nucleótidos, devido à sua fraca estabilidade e inferior temperatura de fusão (T_m), requerendo também processos adicionais de fixação e permeabilização com enzimas ou outros agentes. As moléculas de PNA apresentam também uma maior resistência a proteases e nucleases que a molécula natural de ADN.

Quando acopladas a um fluorocromo, as sondas de PNA podem ser detectadas por microscopia ou citometria de fluxo através da técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH). Esta técnica produz resultados mais céleres em amostras clínicas, quando comparados com os métodos de cultivo tradicionais, tendo sido provadas a sua eficácia, rapidez, sensibilidade e especificidade. A sua aplicação é também muito abrangente, podendo ser usada em diversas áreas da microbiologia, incluindo a detecção de microrganismos patogénicos em amostras de origem humana, alimentares e ambientais.

Alguns exemplos de sondas já desenhadas e publicadas/patenteadas para alguns microrganismos de interesse clínico, como as sondas desenvolvidas para a detecção do género *Salmonella*, *Bacillus anthracis*, espécies de *Staphylococcus coagulase* negativos, *Papillomavirus*

humano, e o género *Candida*, entre outras, demonstram o crescente interesse que esta técnica proporciona.

Para a vaginose bacteriana já foi publicada uma metodologia FISH com sondas de ADN para a detecção em exsudados vaginais de diversas estirpes envolvidas na infecção (Fredicks et al., 2005). No entanto, as sondas utilizadas correspondiam a oligonucleótidos de ADN de maiores dimensões e com diferentes sequências-alvo, embora ambas as sondas possuam os seus oligonucleótidos-alvo no ARN ribossómico (16S). Nesse estudo, a sonda (Eub-338-Cy5 5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-Cy5-3') utilizada para identificar as bactérias *Lactobacillus spp.* era inespecífica e apresentava dezanove nucleótidos, detectando a ordem Bacillales. Por sua vez, a sonda para *Gardnerella vaginalis* (G.vag-198-Cy3 5'-CCACTAAACACTTCCCAACAAGA-Cy3-3') apresentava vinte e cinco nucleótidos. Ambas as sondas funcionavam a uma temperatura de hibridação (T_m) de 45°C, podendo levar a falsos positivos. Por último, os fluorocromos utilizados no trabalho correspondiam a cianina número 5 (Cy5) e a número 3 (Cy3), os quais são de fluorescência inferiores aos fluorocromos Alexa Fluor (Alexa Fluor 488 e 594) utilizados nas sondas aqui apresentadas. Deste modo, esta metodologia revelou especificidade e sensibilidade inferiores ao método aqui proposto.

A vaginose bacteriana é uma infecção vaginal comum em mulheres em idade reprodutiva podendo, inicialmente, ocorrer de forma assintomática. A etiologia desta infecção permanece ainda desconhecida, todavia a vaginose bacteriana encontra-se associada à mudança da microflora vaginal, caracterizando-se pela substituição crescente da flora

normal de espécies *Lactobacillus* por determinadas bactérias de carácter anaeróbico como, por exemplo, a *Gardnerella vaginalis*. Em países desenvolvidos, a taxa de incidência de vaginose bacteriana (infecção bacteriana) é, aproximadamente, o dobro da candidíase genital (infecção fúngica) em mulheres sintomáticas e ainda mais comum que tricomoníase (infecção protozoária). Assim, torna-se importante um método de detecção que permita a visualização rápida dos microrganismos responsáveis por uma infecção vaginal e a quantidade de bactérias presente no exsudado vaginal, mais propriamente a relação entre *Lactobacillus* spp. e *Gardnerella* spp..

A presente invenção descreve um método fiável e exequível de aplicação sistemática de identificação de bactérias presentes em amostras vaginais normais e em casos patogénicos de vaginose bacteriana. Logo, é um contributo significativo para a selecção rápida de um tratamento adequado, poupando incómodos, riscos, prolongamento de tratamentos e custos ao doente.

Por outro lado, o controlo de higiene e de qualidade na indústria alimentar e agrícola toma um papel cada vez mais proeminente nos nossos dias. Produtos alimentares, como leite, iogurte e queijo, necessitam de um método de detecção e/ou quantificação eficaz e rápido para determinados microrganismos, por exemplo, espécies *Lactobacillus* spp. . De facto, a aplicação directa das sondas PNA para *Lactobacillus* spp. nos produtos alimentares, em particular o leite, torna a presente invenção bastante prática e dinâmica na indústria alimentar e agrícola. Desta maneira, a presente invenção facilita o processo de controlo ao evitar tratamentos morosos e

dispendiosos na preparação dos produtos alimentares para respectiva análise de higiene e qualidade.

Sumário da Invenção

O presente invento refere-se a sondas de ácido péptido nucleico (PNA) ou conjunto de sondas de PNA, para detectar e/ou quantificar bactérias presentes em amostras vaginais normais e envolvidas em casos patogénicos de vaginose bacteriana. As sondas reconhecem o 16S rARN do género de cada tipo de espécie bacteriana em questão ou as sequências genómicas correspondentes ao rARN mencionado. As sondas de PNA têm características físico-químicas inerentes à sua estrutura que, quando aplicadas a um método baseado na tecnologia FISH, permitem uma análise mais rápida, robusta e específica do que usando uma sonda de ADN.

Um dos problemas resolvidos pela presente invenção é a detecção e a visualização da relação/proporção entre as espécies existentes de *Lactobacillus spp.* e *Gardnerella spp.* em amostras vaginais. Além de proporcionar um método fiável e expedito para a determinação da presença de *Lactobacillus spp.* e/ou de *Gardnerella spp.* numa amostra biológica, possibilita também a quantificação destas espécies, permitindo assim a classificação da microflora vaginal (microflora normal, microflora intermédia ou vaginose bacteriana) e iniciar tratamento conveniente de forma rápida e segura.

Outro dos aspectos da presente invenção relaciona-se com o desenvolvimento de um estojo, baseado na aplicação destas sondas à técnica de hibridação fluorescente in situ (FISH), que permite a detecção de *Lactobacillus spp.* e/ou de *Gardnerella spp.* em amostras biológicas, de uma forma

simples e rápida. As duas sondas podem ou não ser utilizadas em simultâneo.

A presente invenção descreve um conjunto de sondas de PNA as quais detectam, isto é identificam e/ou quantificam, a presença de *Lactobacillus spp.* e/ou de *Gardnerella spp.*. Estas sondas de PNA compreendem uma das sequências de nucleótidos pelo menos 80% idêntica às SEQ ID Nos. 1 a 6.

Numa realização preferencial as sondas de PNA descritas na presente invenção detectam a sequência alvo no rARN, no rADN ou nas sequências complementares do rARN de *Lactobacillus spp.* e/ou de *Gardnerella spp.*.

Sendo que numa realização ainda mais preferencial a presente invenção engloba as seguintes sequências:

- pelo menos uma das sequências de nucleótidos, pelo menos 80% idêntica às SEQ ID No. 1 a 3 que detectam espécies de *Lactobacillus spp.* ;
- pelo menos uma das sequências de nucleótidos, pelo menos 80% idêntica à SEQ ID No. 4 a 6 que detectam espécies de *Gardnerella spp.*.

Numa realização ainda mais preferencial, as sequências se encontrarem ligadas a pelo menos um tipo de fracção detectável. Sendo que, o tipo de fracção detectável a utilizar poderá ser seleccionado a partir de um dos seguintes grupos: um conjugado, um sistema de detecção ramificado, um cromóforo, um fluoróforo, radioisótopo, uma enzima, um hapteno ou um composto luminescente, entre outros.

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

É ainda objecto da presente invenção um estojo de detecção de *Lactobacillus spp.* e/ou de *Gardnerella spp.* em amostras biológicas, o qual compreende pelo menos uma das sondas anteriormente descritas.

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

Ora numa realização ainda mais preferencial a solução de fixação poderá compreender paraformaldeído e etanol, nomeadamente 2-8% (peso/vol) de paraformaldeído e 25-75% (vol/vol) de etanol e/ou a solução de hibridação poderá compreender formamida.

É também objecto da presente invenção a descrição de um método de detecção de *Lactobacillus spp.* e/ou de *Gardnerella spp.* em amostras biológicas, o qual utiliza pelo menos uma das sondas de PNA anteriormente citada e que compreende os seguintes passos:

- o contacto da sonda de PNA com amostras biológicas;
- o hibridação da sonda de PNA com a sequência alvo dos microrganismos presentes nas amostras biológicas;

- o detecção da hibridação como indicativo da referida detecção e quantificação nas amostras biológicas.

Ora, as referidas amostras biológicas podem ser proveniente de sangue, exsudado vaginal, alimentos, água, biopsias, entre outras.

Sendo que numa realização ainda mais preferencial a detecção da hibridação poderá ser feita por fluorescência.

É ainda objecto da presente invenção a utilização das sondas de PNA anteriormente descritas, a utilização dos estojos anteriormente descritos e da metodologia para serem aplicadas numa metodologia de detecção de *Lactobacillus spp.* e/ou de *Gardnerella spp.* em amostras biológicas.

Descrição geral da invenção

A presente invenção engloba sondas de PNA, reagentes, métodos e estojo destinados à detecção ou quantificação de estirpes de *Lactobacillus spp.* e/ou de *Gardnerella spp.*. A maior especificidade das sondas de PNA (relativamente às sondas de ADN) permite uma melhor discriminação de sequências de nucleótidos relacionadas com um ou dois nucleótidos de diferença. Na presente invenção este aspecto assume particular relevância, uma vez que a diferença entre os géneros pertencentes a mesma família do género *Lactobacillus spp.* dado que partilham um certo nível de semelhança genómica, em particular 16S ARN.

As sondas de PNA, descritas na presente invenção são capazes de detectar rARN, sequências genómicas correspondentes ao rARN (rADN), ou ainda sequências

complementares às mesmas, permitindo a detecção específica do género alvo.

As sondas desta invenção são usadas para análise por hibridação *in situ* de *Lactobacillus spp.* e/ou de *Gardnerella spp.* eventualmente presentes na amostra, preferivelmente através da técnica de hibridação *in situ* fluorescente.

As sequências de nucleótidos das sondas de PNA descritas nesta invenção são seleccionadas de um grupo formado com pelo menos 80% idêntica as seguintes sequências:

5'-ACA TGG AGT TCC ACT-3' (SEQ ID No.1 *Lactobacillus spp.*),

5'-AGG CTC GAA AGC ATG-3' (SEQ ID No.2 *Lactobacillus spp.*),

5'-TTC TCA GTT CGG ACT-3' (SEQ ID No.3 *Lactobacillus spp.*),

5'-CAG CAT TAC CAC CCG-3' (SEQ ID No.4 *Gardnerella spp.*),

5'-ATG CTC CAG AAT AGC-3' (SEQ ID No.5 *Gardnerella spp.*),

5'-GCT CCA GAA TAG CTC-3' (SEQ ID No.6 *Gardnerella spp.*),

O desenvolvimento de novas sondas de PNA-FISH é neste momento realizado de forma empírica. Neste caso, começou-se por testar o número de bases ideal para o funcionamento de cada uma das sondas. Um número elevado de bases faz com que as sondas tenham uma grande afinidade para o alvo e funcionem assim a temperaturas demasiado elevadas, enquanto que um número demasiado pequeno implica que a energia livre de ligação não seja suficiente para ocorrer uma hibridação. Para este caso, os melhores resultados foram para o intervalo de 12-18 pares de bases. Adicionalmente, tiveram

que ser escolhidas as melhores sequências para a detecção de cada um dos géneros bacterianos anteriormente citados. Verificou-se que quando as sondas continham uma maior especificidade com sequências de quinze nucleótidos, apresentando valores de energia de Gibbs (ΔG°) nos valores teóricos ideais para uma hibridação mais robusta. Desta forma, a sonda PNA destinada para a detecção e/ou quantificação de *Gardnerella spp.* (SEQ ID No. 4) apresentou in silico uma especificidade e sensibilidade de 100%. Todavia, a sonda PNA destinada para a detecção e/ou quantificação de *Lactobacillus spp.* (SEQ ID No. 1) demonstra uma especificidade 78.86% e uma sensibilidade de 92.76%, podendo hibridar com algumas espécies de outros géneros bacterianos mas que demonstram uma morfologia bastante distinta das espécies *Lactobacillus spp.* e, conseqüentemente, facilmente distinguíveis por microscopia.

Para cada caso tiveram também que ser estudadas as condições óptimas do processo de FISH, uma vez que o sucesso das hibridações das sondas de PNA-FISH é dependente das condições de hibridação, bem como da fixação/permeabilização e lavagem. Inicialmente foram consideradas as condições referidas na invenção previamente publicada (WO2008155742-A2; PT103767-A1), que se destina à detecção de *Helicobacter pylori*.

Assim, a presente investigação laboratorial iniciou-se por analisar parâmetros como a temperatura, a concentração de formamida, bem como, o tempo de hibridação e lavagem. Uma vez que as condições para o funcionamento da sonda anterior poderiam não ser as ideais ao novo conjunto de sondas aqui propostas. Uma vez que é necessário otimizar os parâmetros em simultâneo sem ter uma ideia de qual deles (ou se até

mesmo um dos outros) está a afectar negativamente o método de PNA-FISH, este processo é bastante complicado e moroso. De resto, em alguns trabalhos publicados por outros autores é possível verificar que muitas sondas testadas acabam por não se revelar eficientes e como tal inúteis para o processo de PNA-FISH. Neste caso, as condições de tempo e temperatura, concentração de formamida mais favoráveis foram identificadas como sendo 90 minutos de hibridação e 30 minutos de lavagem a 60 °C e 30 % de formamida. De referir que, devido à relação entre a temperatura e a formamida, é expectável que para concentrações intermédias de formamida a hibridação também funcione a um intervalo de temperaturas de 55-65 °C.

Posteriormente, os outros parâmetros foram estudados como a fixação/permeabilização com diferentes percentagens de paraformaldeído (1-20%) e etanol (10-90%). Tendo-se obtido uma maior eficiência com paraformaldeído a 4% e etanol a 50%.

Uma hibridação bem sucedida permite depois, por exemplo, por microscopia de fluorescência, citometria de fluxo ou PCR em tempo real, aferir da presença/ausência, concentração e caracterização de cada um dos géneros bacterianos em estudo nas amostras analisadas.

Para tal também é importante considerar a fracção da sonda de PNA que permita a detecção/identificação da existência de um complexo estável formado pela sonda e o alvo. Essa fracção detectável da sonda é seleccionada a partir de um dos seguintes grupos: um conjugado, um sistema de detecção ramificado, um cromóforo, um fluoróforo, radioisótopo, uma enzima, um hapteno ou um composto luminescente.

Diferentes sondas podem estar acopladas a um mesmo grupo detectável (por exemplo, um fluoróforo), de forma a detectar espécies bacterianas do género *Lactobacillus spp.*, enquanto uma outra sonda opcional com outra diferente molécula detectável, de forma a identificar, por exemplo, espécies bacterianas do género *Gardnerella spp.*

O método descrito na presente invenção compreende o contacto de uma amostra com uma ou mais sondas de PNA descritas anteriormente. De acordo com o método, os microrganismos numa amostra são detectados, identificados ou quantificados, relativamente ao seu género bacteriano, correlacionando a hibridação, realizada nas condições de hibridação adequadas, da sequência de PNA com a sequência alvo. Consequentemente, a análise é baseada num único ensaio com um parecer definitivo. Em contraste, os métodos de rotina actuais para a análise de microrganismos são baseados em características múltiplas envolvendo múltiplos testes, como descrito anteriormente.

É ainda objecto da presente invenção um estojo adequado à execução do ensaio para determinar, isto é detectar, identificar ou quantificar, espécies bacterianas pertencentes ao género *Lactobacillus spp.* e/ou *Gardnerella spp.*. O estojo da invenção inclui uma ou mais sondas de PNA e outros reagentes ou compostos seleccionados para a realização dos ensaios de hibridação *in situ*.

Numa realização ainda mais preferencial, o de um estojo adequado à execução do ensaio para detectar, identificar ou quantificar espécies bacterianas pertencentes ao género

Lactobacillus spp. e/ou *Gardnerella spp.* contém ainda uma solução de fixação, hibridação e lavagem.

Preferivelmente, este método pretende substituir os actuais métodos laboratoriais associados ao exame clínico realizado pelo paciente. Assim, a partir da obtenção de uma amostra do paciente e a identificação/quantificação de espécies bacterianas pertencentes ao género *Lactobacillus spp.* e/ou *Gardnerella spp.*, o clínico poderá classificar adequadamente a microflora vaginal do paciente e, conseqüentemente, recomendar o tratamento apropriado. Deste modo, a implementação deste método de diagnóstico laboratorial é essencial para uma maior eficiência do diagnóstico clínico contemporâneo.

As sondas de PNA podem ser aplicadas directamente na amostra preparada em lâmina, já que a aplicação destas sondas não envolve o uso de reagentes ou enzimas para a permeabilização das membranas celulares antes da hibridação. No entanto, necessita de alguns dos compostos mais utilizados nas hibridações. Assim, as sondas são normalmente incluídas em estojos que permitam um mais fácil manuseamento por parte dos utilizadores.

Breve descrição das figuras

Para uma mais fácil compreensão do presente pedido juntam-se em anexo figuras, as quais, representam realizações preferenciais que, contudo, não pretendem limitar a técnica aqui divulgada.

Figura 1 - Detecção do gene 16S rRNA de espécies *Lactobacillus spp.* (a) e *Gardnerella spp.* (b),

respectivamente, em amostras de exsudados vaginais (S01 até S10).

Legenda - λ , marcador de DNA lambda; -, controlo negative do PCR; +, controlo interno positive do PCR; S01 até S10, amostras clínicas de exsudados vaginais de 1 à 10.

Descrição detalhada da invenção

I - Definições

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

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

c) O termo "sequência alvo" significa uma sequência de nucleótidos das espécies bacterianas pertencentes ao género *Lactobacillus spp.* ou *Gardnerella spp.* que se pretende que seja detectada no ensaio, onde a porção de nucleótidos de uma das sondas é desenhada para hibridar.

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

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

f) O termo "amostra" refere-se a qualquer amostra biológica que pode conter o microrganismo ou sequência alvo para a detecção. Preferivelmente as amostras biológicas estão na forma líquida (por exemplo: água, alimentos, sangue, exsudado vaginal, urina, etc...) ou como amostra de tecido (por exemplo: amostras de biopsias, nomeadamente biopsias vaginais).

II - Descrição

Concepção das sondas de PNA:

As sondas de PNA desta invenção têm como sequências alvo oligonucleótidos pertencentes à zonas de 16S rARN das espécies bacterianas dos géneros *Lactobacillus spp.* e/ou *Gardnerella spp.*. Assim, sequências de 16S rARN de várias bases de dados, como por exemplo Ribosomal Database Project II (RDPII, version 10.0; <http://rdp.cme.msu.edu/>; Cole et al., 2009), foram alinhadas para cada um dos géneros bacterianos em estudo. A sonda Lac663 (SEQ ID No. 1) é destinada para a identificação/quantificação das espécies do género *Lactobacillus spp.* e a sua sequência alvo está localizada na posição 663 a 677 da sequência rARN 16S da estirpe *Lactobacillus spp.* strain MDL2 (Número do Genbank: HM753265.1). Por sua vez, a sonda Gard162 (SEQ ID No. 4) foi desenhada para a identificação/quantificação das espécies do género *Gardnerella spp.* e a sua sequência alvo está localizada na posição 162 a 176 da sequência rARN 16S

da estirpe *Gardnerella vaginalis* 409-05 (Número do RDPII: S001872672).

De preferência, as sondas de PNA desta invenção contemplam sequências de 15 nucleótidos. Para além das sondas mencionadas anteriormente, outras sondas para a detecção/quantificação de espécies *Lactobacillus spp.* (SEQ ID No. 2 e 3) e *Gardnerella spp.* (SEQ ID No. 5 e 6) foram também desenvolvidas no âmbito desta invenção.

Tabela 1 - Sondas de PNA desta invenção.

SEQ ID No.	Organismos Alvo	Sequência nucleotídica
1	<i>Lactobacillus spp.</i>	5'-ACA TGG AGT TCC ACT-3'
2	<i>Lactobacillus spp.</i>	5'-AGG CTC GAA AGC ATG-3'
3	<i>Lactobacillus spp.</i>	5'-TTC TCA GTT CGG ACT-3'
4	<i>Gardnerella spp.</i>	5'-CAG CAT TAC CAC CCG-3'
5	<i>Gardnerella spp.</i>	5'-ATG CTC CAG AAT AGC-3'
6	<i>Gardnerella spp.</i>	5'-GCT CCA GAA TAG CTC-3'

Alternativamente, esta invenção contempla também variações nas sequências nucleotídicas das sondas. Tais variações podem incluir deleções, inserções entre outras. De uma forma geral, uma homologia da sequência de nucleótidos, anteriormente referidas, de 80 % ou superior é suficiente para o bom funcionamento do método.

Fracção detectável da sonda de PNA:

Não limitado aos seguintes exemplos, a fracção detectável da sonda de PNA pode incluir diferentes tipos de moléculas, como conjugados de dextrano, cromóforos, fluoróforos,

radioisótopos, enzimas, hapteno, composto quimioluminescente entre outros.

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

Método

A presente invenção apresenta um método para a identificação/quantificação das espécies do género *Lactobacillus spp.* e/ou *Gardnerella spp.*. As sondas de PNA usadas compreendem pelo menos uma das sequências de nucleótidos pelo menos 80% idêntica às SEQ ID Nos. 1 a 6.

sondas de PNA descritas neste documento com a sequência alvo da bactéria sob condições de hibridação adequadas ou condições de hibridação in-situ adequadas (como abordado no EXEMPLO 1). Preferivelmente, a hibridação in situ fluorescente (FISH ou PNA-FISH) ou PCR em tempo real são os formatos de ensaio para a análise das espécies do género *Lactobacillus spp.* e/ou *Gardnerella spp.*.

O método pode assim ser dividido em: preparação das amostras, fixação das células, hibridação, lavagem e visualização dos resultados (ver exemplo 1). O método pode ser realizado em células aderidas ou em suspensão.

Condições de Hibridação

Existem vários factores que impõem ou controlam o rigor da hibridação da sonda de PNA a sequências alvo. Estes incluem a percentagem de formamida usada (ou outro reagente químico

desnaturante), a concentração salina e conseqüentemente a força iónica, a temperatura de hibridação, a concentração de detergente, o pH entre outros.

Para detectar as condições óptimas de hibridação pode ser necessário fixar os diferentes factores e variar cada factor isoladamente até se encontrar um grau de discriminação desejado.

Quanto mais próxima se encontra uma sequência alvo de outra não-alvo na amostra, maior terá que ser o grau de rigor na definição dos diferentes factores que influenciam a hibridação. Nesta invenção sequências não-alvo podem ter apenas um nucleótido de diferença em relação às sequências alvo (uma vez que o género *Lactobacillus spp.* se encontra numa família com diversos géneros bacterianos relacionados entre si e partilhando uma elevada similaridade genómica), sendo necessário um elevado nível de discriminação de forma a evitar hibridações não específicas da sonda de PNA a sequências não-alvo. As sondas desta invenção que hibridam com sequências alvo relativamente a espécies de dois géneros bacterianos distintos podem ser utilizadas em conjunto, uma vez que ambos géneros bacterianos se encontram em exsudados vaginais. No entanto, opcionalmente, cada tipo de sonda (para *Gardnerella spp.* ou *Lactobacillus spp.*) pode ser usada de forma exclusiva ou única, a par de condições de hibridação optimizadas, sem realizar ligações não específicas nas sequências alvo das restantes sondas.

Preparação de amostras:

As amostras a analisar podem ser provenientes de exsudados vaginais, sangue, urina, entre outros. No caso dos exsudados vaginais, as zaragatoas com as amostras vaginais

são vortexadas em 1 ml de solução salina (0.9% de NaCl) ou em tampão fosfato (Phosphate Buffer Saline, PBS) e centrifugadas a 10.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, despreza-se o sobrenadante e ressuspende-se novamente as células decantadas em 1 ml de solução salina (0.9% de NaCl) ou em tampão fosfato (PBS). Recolhe-se 20 a 50 μ l da suspensão anterior e coloca-se em lâminas de imunofluorescência. No caso das bactérias em estudo se encontrarem em amostras mais complexas, tal como em amostras de urina, leite e sangue, as amostras são centrifugadas a 10.000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente, desprezando-se o sobrenadante e ressuspendendo-se as células decantadas em 1 ml de solução salina (0.9% de NaCl) ou em tampão fosfato (PBS). Eventualmente, as amostras poderão ainda sofrer uma diluição de 1 para 10 novamente em solução salina ou PBS com o intuito de eliminar potenciais compostos autofluorescentes presentes nas amostras iniciais. Alternativamente, as suspensões podem ainda ser filtradas por uma membrana de policarbonato ou equivalente. Por fim, recolhe-se 20 a 50 μ l da suspensão e coloca-se em lâminas de imunofluorescência. As membranas são depois colocadas em lâminas. É importante ainda referir que a solução salina e o tampão PBS devem ser previamente esterilizados por autoclavagem a 121°C durante 15 a 20 minutos.

Estojo:

A presente invenção contempla um estojo que permite a realização do ensaio que analisa a presença e a quantidade de espécies do género *Lactobacillus spp.* e/ou *Gardnerella spp.*

As sondas de PNA a usar no estojo, as suas características, o método envolvido foram anteriormente referidos neste documento.

O estojo nesta invenção compreende pelo menos duas sondas, em que a primeira compreende uma das sequencias de nucleótidos pelo menos 80% idêntica às SEQ ID Nos. 1 a 3 (reconhecem espécies *Lactobacillus spp.*); enquanto que, a segunda compreende uma das sequencias de nucleótidos pelo menos 80% idêntica às SEQ ID Nos. 4 a 6 (reconhecem espécies *Gardnerella spp.*). É importante referir que nesta invenção compreende também os outros reagentes ou composições que são seleccionados para realizar o ensaio.

As sondas de PNA, as suas características, os métodos e estojo desta invenção são apropriados à análise de ácidos nucleicos presentes, ou não, internamente nos organismos de interesse. Assim, esta invenção pode ser usada para ambas, análise dos organismos ou análise dos ácidos nucleicos extraídos ou derivados dos organismos de interesse, fazendo com que a fonte das sequências alvo não sejam uma limitação nesta invenção.

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

EXEMPLO 1: Detecção de espécies dos géneros *Lactobacillus spp.* e/ou *Gardnerella spp.*

Tabela 2 - Sequências das sondas PNA usadas.

Organismos Alvo	Sequência nucleotídica da sonda
<i>Lactobacillus spp.</i>	Lac663 Alexa 488-OO-ACA TGG AGT TCC ACT
<i>Gardnerella spp.</i>	Gard162 Alexa 594-OO-CAG CAT TAC CAC CCG

Legenda - OO = 8-amino-3,6-dioxaoctanato (de ligação dupla que realiza a ligação entre as duas moléculas, o fluoróforo e a sequência nucleotídica da sonda).

Alexa Fluor 488nm/594nm - fluoróforo (fracção detectável).

Estirpes bacterianas:

Foram adquiridas diferentes géneros bacterianos a partir de isolados clínicos, cuja identidade foi verificada pela sequenciação do rARN 16S, e diversas colecções de referência (ver tabela 3), tais como American Type Culture Collection, Manassas (ATCC), Colección Española de Cultivo Tipo (CECT), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM), Culture Collection University of Goteborg (CCUG), entre outros.

Todas as espécies bacterianas de colecção foram incubadas 20-24h em placas de meio de crescimento frescas antes das experiências laboratoriais sob condições de temperatura de crescimento e atmosférica ideal (aerobiose, anaerobiose e microfilia) para cada caso em particular. As espécies *Lactobacillus spp.* foram cultivadas em placas de Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS), enquanto que as espécies de *Atopobium spp.* e *Gardnerella spp.* cultivaram-se em Brucella Blood Agar (BBA). As restantes espécies bacterianas foram inoculadas em Brain Heart Infusion agar (BHI).

Para cada estirpe bacteriana, colocou-se uma gota da cultura em lâminas de imunofluorescência com poços de 8 mm de diâmetro.

A lâmina foi depois colocada cerca de 10 minutos na estufa a 60 °C.

Fixação:

Com o objectivo de prevenir a perda de 16S rARN durante o processo de hibridação, expôs-se a amostra a uma solução de 4% (peso/vol) de paraformaldeído e de 50% (vol/vol) etanol durante dez minutos cada.

Hibridação:

Durante esta etapa, foi colocada uma gota de solução de hibridação em contacto com a amostra, contendo 10% (peso/vol) sulfato de dextrano, 10 mM NaCl, 30% (vol/vol) formamida, 0.1% (peso/vol) pirofosfato de sódio, 0.2% (wt/vol) polivinilpirrolidona, 0.2% (peso/vol) Ficol, 5 mM di-sódio EDTA, 0.1% (vol/vol) Triton X-100, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) e 200 nM de cada uma das sondas de PNA.

A amostra foi coberta com uma lamela para garantir o espalhamento uniforme da sonda. De seguida as lâminas foram colocadas na estufa durante 90 minutos. Durante este período de tempo, as sondas puderam penetrar nas membranas celulares e ligar-se a sequências complementares do 16S rARN. Durante o período de hibridação, é essencial que a solução de hibridação não evapore. Para tal, a presença da lamela e de papel humedecido à volta da lâmina foram necessários.

Lavagem:

Após o tempo de hibridação as lamelas foram removidas e as lâminas imersas em solução de lavagem pré-aquecida contendo 5 mM Tris Base, 15 mM NaCl e 0.1% (vol/vol) Triton X (pH 10), colocando na estufa à temperatura de hibridação durante 30 minutos.

Resultados:

Os resultados foram obtidos através de observação ao microscópio de fluorescência com filtros adequados para a detecção dos fluorocromos ligados às sondas (ou seja, que contemplam os comprimentos de onda em que emitem os fluorocromos acoplados à sonda), não tendo sido detectado qualquer sinal em situações em que a sequência alvo não se encontra presente.

O filtro 488 permite captar fluorescência promovida pelo fluorocromo Alexa 488, que é revelador da hibridação de sonda Lacto663 (SEQ ID No. 1) com a sequência alvo característica do género *Lactobacillus* spp. . Por sua vez, o filtro 594 permite captar a fluorescência promovida pelo fluorocromo Alexa 594, que é revelador da hibridação de sonda Gard162 (SEQ ID No. 4) com a sequência alvo característica do género *Gardnerella* spp..

Tabela 3 - Resultados ao microscópio de fluorescência com filtros adequados para a detecção dos fluorocromos ligados às sondas.

Éspecies bacterianas	Estirpe	Genus	Lac663 Probe efficiency	Gard162 Probe efficiency
<i>L. pentosus</i>	CECT4023	<i>Lactobacillus</i> spp.	++++	-
<i>L. casei</i>	CECT5275	<i>Lactobacillus</i> spp.	++++	-

<i>L. rhamnosus</i>	CECT288	<i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i>	++++	-
<i>L. coryniformis</i> sub. <i>torquens</i>	CECT4129	<i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i>	++++	-
<i>L. paracasei</i>	CECT227	<i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i>	++++	-
<i>L. acidophilus</i>	ATCC4356	<i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i>	++++	-
<i>L. agilis</i>	CCUG 31450	<i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i>	++++	-
<i>L. animalis</i>	ATCC35046	<i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i>	+++	-
<i>L. bif fermentans</i>	ATCC35409	<i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i>	+++	-
<i>L. brevis</i>	ATCC14869	<i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i>	++++	-
<i>L. buchneri</i>	ATCC4005	<i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i>	+++	-
<i>L. fermentum</i>	ATCC11739	<i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i>	+++	-
<i>L. crispatus</i>	ATCC33820	<i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i>	++++	-
<i>L. curvatus</i> sub. <i>curvatus</i>	ATCC25601	<i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i>	++++	-
<i>L. delbrueckii</i> sub. <i>delbrueckii</i>	ATCC9649	<i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i>	+++	-
<i>L. delbrueckii</i> sub. <i>lactis</i>	ATCC12315	<i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i>	+++	-
<i>L. farciminis</i>	DSM20182	<i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i>	++++	-
<i>L. fructivorans</i>	ATCC8288	<i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i>	+++	-
<i>L. gallinarum</i>	CCUG31412	<i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i>	++++	-
<i>L. gasseri</i>	ATCC9857	<i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i>	++++	-
<i>L. graminis</i>	DSM20719	<i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i>	++	-
<i>L. hamsteri</i>	ATCC43851T	<i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i>	+++	-
<i>L. helveticus</i>	ATCC15009	<i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i>	++++	-
<i>L. hilgardii</i>	NCFB962	<i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i>	+++	-

<i>L. intestinalis</i>	ATCC49335	<i>Lactobacillus</i> spp.	+++	-
<i>L. johnsonii</i>	ATCC11506	<i>Lactobacillus</i> spp.	++++	-
<i>L. murinus</i>	ATCC35020	<i>Lactobacillus</i> spp.	++++	-
<i>L. parabuchneri</i>	ATCC12936	<i>Lactobacillus</i> spp.	++++	-
<i>L. paracasei</i> sub. <i>paracasei</i>	CCUG27320	<i>Lactobacillus</i> spp.	+++	-
<i>L. plantarum</i>	NCIMB8827	<i>Lactobacillus</i> spp.	+++	-
<i>L. reuteri</i>	NCFB2656	<i>Lactobacillus</i> spp.	+++	-
<i>L. rhamnosus</i>	ATCC7469	<i>Lactobacillus</i> spp.	++++	-
<i>L. ruminis</i>	ATCC27781	<i>Lactobacillus</i> spp.	++++	-
<i>L. sakei</i> sub. <i>carnosus</i>	CCUG8045	<i>Lactobacillus</i> spp.	++	-
<i>L. salivarius</i>	DEVRIESE94 /438	<i>Lactobacillus</i> spp.	+++	-
<i>L. plantarum</i>	NCCB46043	<i>Lactobacillus</i> spp.	+++	-
<i>Lactococcus lactis</i> 53	-	<i>Lactococcus</i> spp.	-/++	-
<i>Streptococcus thermophilus</i> A	-	<i>Streptococcus</i> spp.	-	-
<i>Streptococcus thermophilus</i> B	-	<i>Streptococcus</i> spp.	+++	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-	<i>Leuconostoc</i> spp.	-/+	-
<i>Bacillus subtilis</i>	DSM 7-10	<i>Bacillus</i> spp.	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	CECT410	<i>Enterococcus</i> spp.	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	CECT184	<i>Enterococcus</i> spp.	-	-
<i>Gardnerella vaginalis</i> 51	-	<i>Gardnerella</i> spp.	-	++++
<i>Gardnerella vaginalis</i> 101	-	<i>Gardnerella</i> spp.	-	++++

<i>Gardnerella vaginalis</i> AMD	-	<i>Gardnerella</i> <i>spp.</i>	-	++++
<i>Gardnerella vaginalis</i>	ATCC	<i>Gardnerella</i> <i>spp.</i>	-	++++
<i>Atopobium vaginae</i>	CCUG 38953T	<i>Atopobium</i> <i>spp.</i>	-	-
<i>Atopobium vaginae</i>	CCUG 42099	<i>Atopobium</i> <i>spp.</i>	-	-
<i>Atopobium vaginae</i>	CCUG 44116	<i>Atopobium</i> <i>spp.</i>	-	-
<i>Atopobium vaginae</i>	-	<i>Atopobium</i> <i>spp.</i>	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Bacillus</i> <i>spp.</i>	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	CECT 684	<i>Enterobacter</i> <i>spp.</i>	-	-
<i>Salmonella enterica</i>	-	<i>Salmonella</i> <i>spp.</i>	-	-
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	NCTC 12900	<i>Escherichia</i> <i>spp.</i>	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	CECT 976	<i>Staphylococcus</i> <i>spp.</i>	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	CECT 86	<i>Staphylococcus</i> <i>spp.</i>	-	-
<i>Shigella</i>	ATCC 12022	<i>Shigella</i> <i>spp.</i>	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	<i>Listeria</i> <i>spp.</i>	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> sub. <i>Ozaenae</i>	ATCC 11296	<i>Klebsiella</i> <i>spp.</i>	-	-
<i>Salmonella Typhi</i>	-	<i>Salmonella</i> <i>spp.</i>	-	-
<i>Listeria seeligeri</i>	CECT 917	<i>Listeria</i> <i>spp.</i>	-	-
<i>Escherichia coli</i>	CECT 434	<i>Escherichia</i> <i>spp.</i>	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	CECT 5873	<i>Listeria</i> <i>spp.</i>	-	-

Legenda - A eficiência das sondas de PNA foi testada em triplicado para cada uma das estirpes. Esta eficiência de hibridação foi avaliada qualitativamente da seguinte forma: (-) hibridação ausente; (+) hibridação fraca; (++) hibridação moderada; (+++) hibridação eficiente; (++++) hibridação excelente. A tabela revela o valor médio obtido

Lactobacillus spp. e *Gardnerella spp.* a partir de exsudados vaginais. Uma vez que o objectivo da presente invenção é a identificação/quantificação rápida de espécies *Lactobacillus spp.* e *Gardnerella spp.* em amostras clínicas, entre outras.

Resultados:

Os resultados foram obtidos através de observação ao microscópio de fluorescência com filtros adequados para a detecção dos fluorocromos ligados às sondas.

Tabela 4 - Resultados das amostras mistas ao microscópio de fluorescência com filtros adequados para a detecção dos fluorocromos ligados às sondas.

Espécies presentes nas amostras mistas	Código das estirpes nas amostras mistas	Multiplex com sondas PNA	
		Lac663 Probe efficiency	Gard162 Probe efficiency
<i>L. pentosus</i> ; <i>G. vaginalis</i> 51	CECT4023; -	++++	++++
<i>L. casei</i> ; <i>G. vaginalis</i> 101	CECT5275; -	++++	++++
<i>L. rhamnosus</i> ; <i>G. vaginalis</i> AMD	CECT288; -	++++	++++
<i>L. crispatus</i> ; <i>G. vaginalis</i> ATCC	ATCC33820; -	++++	++++
<i>L. delbrueckii</i> sub. <i>delbrueckii</i> ; <i>Atopobium vaginae</i>	ATCC9649; CCUG 38953T	+++	-
<i>L. acidophilus</i> ; <i>A. vaginae</i>	ATCC4356; CCUG 42099	++++	-
<i>L. gasseri</i> ; <i>A. vaginae</i>	ATCC9857; CCUG 44116	++++	-
<i>L. paracasei</i> sub. <i>paracasei</i> ; <i>L. lactis</i> 53	CCUG27320; -	+++	-/+
<i>L. rhamnosus</i> ; <i>E. faecium</i>	ATCC7469; CECT410	++++	-
<i>L. reuteri</i> ; <i>E. coli</i> O157:H7	NCFB2656; NCTC 12900	+++	-
<i>S. aureus</i> ; <i>G. vaginalis</i> 51	CECT 976; -	-	++++
<i>Shigella</i> ; <i>G. vaginalis</i> 101	ATCC 12022; -	-	++++
<i>L. seeligeri</i> ; <i>G. vaginalis</i> AMD	CECT 917; -	-	++++

nas experiências em triplicado para cada uma das espécies bacterianas analisadas.

EXEMPLO 2: Detecção de espécies dos géneros *Lactobacillus spp.* e/ou *Gardnerella spp.* por Multiplex FISH.

Este exemplo pretende ilustrar a possibilidade de se detectar espécies *Lactobacillus spp.* e *Gardnerella spp.* a partir de um único ensaio de FISH através da utilização em simultâneo de duas sondas PNA em amostras mistas, isto é, com duas ou mais estirpes bacterianas. Uma vez que o objectivo da presente invenção é a identificação/quantificação rápida de espécies *Lactobacillus spp.* e/ou *Gardnerella spp.* em amostras complexas.

Com este intuito, foi realizado um número considerável de amostras mistas a partir das estirpes bacterianas utilizadas no EXEMPLO 1 (ver tabela 4). Para a realização eficaz do protocolo multiplex de FISH, voltou-se a testar os mesmos parâmetros anteriormente referidos para averiguar a máxima eficiência do ensaio pretendido. De facto, a eficiência permaneceu máxima nas mesmas condições apresentadas no protocolo do EXEMPLO 1. Por conseguinte, o protocolo de hibridação usado para o multiplex foi o mesmo do EXEMPLO 1.

As sondas utilizadas nesta análise de géneros bacterianos em amostras mistas foram as mesmas sondas anteriormente referidas na tabela 2 do EXEMPLO 1. No entanto, neste ensaio, a alíquota de uso consistiu na elaboração de uma única alíquota com as duas sondas de PNA, mais especificamente, a sonda Lacto663 (SEQ ID No. 1) e a sonda Gard162 (SEQ ID No. 4). Por fim, algumas alterações podem

ser realizadas de modo a otimizar a visualização das sondas em conjunto no mesmo ensaio, nomeadamente, o tempo de exposição para cada filtro de modo a maximizar a fluorescência da sonda hibridada. Além disso, iniciou-se a observação das amostras mistas pela sonda com o fluorocromo com menor energia de excitação, neste caso, a sonda Gard162, evitando a excitação involuntária da outra sonda PNA do ensaio multiplex, nomeadamente, a sonda Lac663.

Este exemplo pretende ilustrar a possibilidade de se detectar directamente espécies *Lactobacillus spp.* e *Gardnerella spp.* a partir de exsudados vaginais. Uma vez que o objectivo da presente invenção é a identificação/quantificação rápida de espécies *Lactobacillus spp.* e *Gardnerella spp.* em amostras clínicas, entre outras.

Além disso, foi adquirido um número considerável de exsudados vaginais (amostras vaginais de dez voluntárias controlo, S01 até S10). Antes da realização do protocolo experimental de FISH, as zaragatoas com os exsudados vaginais foram previamente vortexadas em 1 ml de solução salina (0.9% de NaCl) ou em tampão fosfato (Phosphate Buffer Saline, PBS) e centrifugadas a 10.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se novamente as células decantadas em 1 ml de solução salina (0.9% de NaCl) ou em tampão fosfato (PBS). Finalmente, o restante procedimento foi semelhante ao anteriormente referido nas estirpes bacterianas de colecção.

Este crescimento experimental pretende ilustrar a possibilidade de se detectar directamente espécies

Lactobacillus spp. e *Gardnerella spp.* a partir de exsudados vaginais. Uma vez que o objectivo da presente invenção é a identificação/quantificação rápida de espécies *Lactobacillus spp.* e *Gardnerella spp.* em amostras clínicas, entre outras.

Resultados:

Os resultados foram obtidos através de observação ao microscópio de fluorescência com filtros adequados para a detecção dos fluorocromos ligados às sondas.

Tabela 4 - Resultados das amostras mistas ao microscópio de fluorescência com filtros adequados para a detecção dos fluorocromos ligados às sondas.

Espécies presentes nas amostras mistas	Código das estirpes nas amostras mistas	Multiplex com sondas PNA	
		Lac663 Probe efficiency	Gard162 Probe efficiency
<i>L. pentosus</i> ; <i>G. vaginalis</i> 51	CECT4023; -	++++	++++
<i>L. casei</i> ; <i>G. vaginalis</i> 101	CECT5275; -	++++	++++
<i>L. rhamnosus</i> ; <i>G. vaginalis</i> AMD	CECT288; -	++++	++++
<i>L. crispatus</i> ; <i>G. vaginalis</i> ATCC	ATCC33820; -	++++	++++
<i>L. delbrueckii</i> sub. <i>delbrueckii</i> ; <i>Atopobium</i> <i>vaginae</i>	ATCC9649; CCUG 38953T	+++	-
<i>L. acidophilus</i> ; <i>A. vaginae</i>	ATCC4356; CCUG 42099	++++	-
<i>L. gasseri</i> ; <i>A. vaginae</i>	ATCC9857; CCUG 44116	++++	-

<i>L. paracasei</i> <i>sub. paracasei</i> ; <i>L. lactis</i> 53	CCUG27320; -	+++	-/+
<i>L. rhamnosus</i> ; <i>E. faecium</i>	ATCC7469; CECT410	++++	-
<i>L. reuteri</i> ; <i>E. coli</i> O157:H7	NCFB2656; NCTC 12900	+++	-
<i>S. aureus</i> ; <i>G. vaginalis</i> 51	CECT 976; -	-	++++
<i>Shigella</i> ; <i>G. vaginalis</i> 101	ATCC 12022; -	-	++++
<i>E. aerogenes</i> ; <i>G. vaginalis</i> ATCC	CECT 684; -	-	++++
<i>L. pentosus</i> ; <i>G. vaginalis</i> ATCC; <i>E. faecalis</i>	CECT4023; -; CECT184	++++	++++
<i>L. casei</i> ; <i>G. vaginalis</i> AMD; <i>A. vaginae</i>	CECT5275; -; CCUG 38953T	++++	++++
<i>L. rhamnosus</i> ; <i>G. vaginalis</i> 101; <i>A. vaginae</i>	CECT288; -; CCUG 42099	++++	++++
<i>L. crispatus</i> ; <i>G. vaginalis</i> 51; <i>A. vaginae</i>	ATCC33820; -; CCUG 44116	++++	++++
<i>L. casei</i> ; <i>L.</i> <i>mesenteroides</i> ; <i>A. vaginae</i>	CECT5275; -; CCUG 38953T	++++	-

Legenda - Esta eficiência de hibridação foi avaliada qualitativamente da seguinte forma: (-) hibridação ausente; (+) hibridação fraca; (++) hibridação moderada; (+++) hibridação eficiente; (++++) hibridação excelente. A tabela revela o valor médio obtido nas experiências em triplicado para cada uma das espécies bacterianas analisadas.

Tabela 5 - Resultados das amostras de exsudados vaginais ao microscópio de fluorescência com filtros adequados para a detecção dos fluorocromos ligados às sondas.

No de amostras vaginais	Código de amostra	Lac663 Probe efficiency	Gard162 Probe efficiency
1	S01	+++	+++
2	S02	++++	-
3	S03	+++	+++
4	S04	++	+++
5	S05	++++	-
6	S06	++	++
7	S07	++	++
8	S08	+++	+++
9	S09	++	++
10	S10	++	-

Legenda - Esta eficiência de hibridação foi avaliada qualitativamente da seguinte forma: (-) hibridação ausente; (+) hibridação fraca; (++) hibridação moderada; (+++) hibridação eficiente; (++++) hibridação excelente. A tabela revela o valor médio obtido nas experiências em triplicado para cada uma das espécies bacterianas analisadas.

No caso das amostras de exsudados vaginais, os resultados dos ensaios FISH (tabela 5) foram confirmados por PCR (ver a figura 1). Mais especificamente, a presença de espécies *Lactobacillus spp.* foi confirmada pela banda de ≈ 62 bp na figura 1(a), enquanto que a presença de espécies *Gardnerella spp.* foi comprovada pela banda de ≈ 111 bp na figura 1(b). Todas as amostras sofreram um pré-tratamento por choque térmico, o qual consistiu em 5 minutos a 100°C seguido de 5 minutos em gelo, antes da realização do PCR com 30 ciclos a 50°C (temperatura de melting, t_m).

Os resultados de PCR foram concordantes com os resultados obtidos anteriormente por FISH (tabela 5).

LISTA DE SEQUENCIAS

<110> UNIVERSIDADE DO MINHO

<120> **"SONDAS DE ÁCIDO PÉPTIDO NUCLEICO, ESTOJO E MÉTODO PARA DETECTAR ESPÉCIES DO GÉNERO *LACTOBACILLUS SPP.* E/OU *GARDNERELLA SPP.* E RESPECTIVAS APLICAÇÕES"**

<210> SEQ ID NO 1

5'-ACA TGG AGT TCC ACT-3' (SEQ ID No. 1),
e ter um comprimento entre 8 a 18 nucleótidos

<210> SEQ ID NO 2

5'-AGG CTC GAA AGC ATG-3' (SEQ ID No. 2),
e ter um comprimento entre 8 a 18 nucleótidos

<210> SEQ ID NO 3

5'-TTC TCA GTT CGG ACT-3' (SEQ ID No. 3),
e ter um comprimento entre 8 a 18 nucleótidos

<210> SEQ ID NO 4

5'-CAG CAT TAC CAC CCG-3' (SEQ ID No. 4),
e ter um comprimento entre 8 a 18 nucleótidos

<210> SEQ ID NO 5

5'-ATG CTC CAG AAT AGC-3' (SEQ ID No. 5),
e ter um comprimento entre 8 a 18 nucleótidos

<210> SEQ ID NO 6

5'-GCT CCA GAA TAG CTC-3' (SEQ ID No. 6),
e ter um comprimento entre 8 a 18 nucleótidos

Referências

Nugent R., Krohn M. and Hillier S. Reliability of Diagnosing Bacterial Vaginosis Is Improved by a Standardized Method of Gram Stain Interpretation. *Journal of Clinical Microbiology* 1991, 29(2):297-301.

Fredricks, D., Fiedler, T. and Marrazzo, J. Molecular Identification of Bacteria Associated with Bacterial Vaginosis. *N Engl J Med* 2005, 353:1899-911.

Cole, J. R., Q. Wang, E. Cardenas, J. Fish, B. Chai, R. J. Farris, A. S. Kulam-Syed-Mohideen, D. M. McGarrell, T. Marsh, G. M. Garrity, and J. M. Tiedje. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 2009, 37 (Database issue): D141-D145; doi: 10.1093/nar/gkn879.

Lisboa, 17 de Março de 2014

REIVINDICAÇÕES

1. Sonda de PNA caracterizada por detectar/quantificar a presença de espécies do género *Lactobacillus spp.* e/ou *Gardnerella spp.*, a qual compreende pelo menos uma das sequências de nucleótidos pelo menos 80% idêntica às SEQ ID Nos. 1 a 6.

2. Sonda de PNA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por detectar a sequência alvo no rARN, no rADN ou nas sequências complementares do rARN de espécies do género *Lactobacillus spp.* e/ou *Gardnerella spp.*.

3. Sonda de PNA, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 2, caracterizada por se encontrar ligada a pelo menos um tipo de fracção detectável.

4. Sonda de PNA, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo tipo de fracção detectável da sonda ser seleccionada a partir de um dos seguintes grupos: um conjugado, um sistema de detecção ramificado, um cromóforo, um fluoróforo, radioisótopo, uma enzima, um hapteno ou um composto luminescente.

5. Sonda de PNA, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada por o grupo fluorofo ser pelo menos um dos seguintes: fluoróforos de Alexa series, Alexa Fluor series, cianinas, 5-(e -6) Carboxi-2',7'-diclorofluoresceína, o 5-ROX (5-carboxi-X-rodamina, sal trietilamónio).

6. Estojo de detecção de espécies do género *Lactobacillus spp.* e/ou *Gardnerella spp.* em amostras biológicas,

REIVINDICAÇÕES

1. Sonda de PNA **caracterizada por** detectar/quantificar a presença de espécies do género *Lactobacillus spp.* e/ou *Gardnerella spp.*, a qual compreende pelo menos uma das sequências de nucleótidos pelo menos 80% estruturalmente semelhante às SEQ ID Nos. 1 a 6.
2. Sonda de PNA, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** detectar a sequência alvo no rARN, no rADN ou nas sequências complementares do rARN de espécies do género *Lactobacillus spp.* e/ou *Gardnerella spp.*.
3. Sonda de PNA, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 2, **caracterizada por** se encontrar ligada a pelo menos um tipo de fracção detectável.
4. Sonda de PNA, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada** pelo tipo de fracção detectável da sonda ser seleccionada a partir de um dos seguintes grupos: um conjugado, um sistema de detecção ramificado, um cromóforo, um fluoróforo, radioisótopo, uma enzima, um hapteno ou um composto luminescente.
5. Sonda de PNA, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizada por** o grupo fluorofo ser pelo menos um dos seguintes: fluoróforos de Alexa series, Alexa Fluor series, cianinas, 5-(e -6) Carboxi-2',7'-diclorofluoresceína, o 5-ROX (5-carboxi-X-rodamina, sal trietilamónio).

caracterizado por compreender pelo menos uma das sondas descritas em qualquer uma das reivindicações de 1 a 5.

7. Estojo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por compreender ainda pelo menos uma das seguintes soluções: uma solução de fixação, uma solução de hibridação e uma solução de lavagem.

8. Estojo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pela solução de fixação compreender paraformaldeído e etanol, nomeadamente 2-8% (peso/vol) de paraformaldeído e 25-75% (vol/vol) de etanol.

9. Estojo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pela solução de hibridação compreender formamida.

10. Método de detecção de espécies do género *Lactobacillus spp.* e/ou *Gardnerella spp.* em amostras biológicas, caracterizado por utilizar pelo menos uma das sondas de PNA descrita em qualquer uma das reivindicações anteriores e por compreender os seguintes passos:

- a. contacto da sonda de PNA com nas referidas amostras;
- b. hibridação da sonda de PNA com a sequência alvo dos microrganismos presentes nas referidas amostras;
- c. detecção da hibridação como indicativo da referida detecção e quantificação nas referidas amostras.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pela referida amostra biológica ser proveniente de exsudados vaginais, sangue, alimentos, água ou biopsias.

12. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pela hibridação ser por fluorescência.

13. Utilização das sondas de PNA como descritas em qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizada por ser aplicada numa metodologia de detecção espécies do género *Lactobacillus spp.* e/ou *Gardnerella spp.* em amostras biológicas.

14. Utilização do estojo descrito em qualquer uma das reivindicações de 6 a 9, caracterizado por ser aplicado na detecção d espécies do género *Lactobacillus spp.* e/ou *Gardnerella spp.* em amostras biológicas.

15. Utilização do método descrito em qualquer uma das reivindicações de 10 a 12, caracterizado por ser aplicado na detecção de espécies do género *Lactobacillus spp.* e/ou *Gardnerella spp.* em amostras biológicas.

Lisboa, 17 de Março de 2014

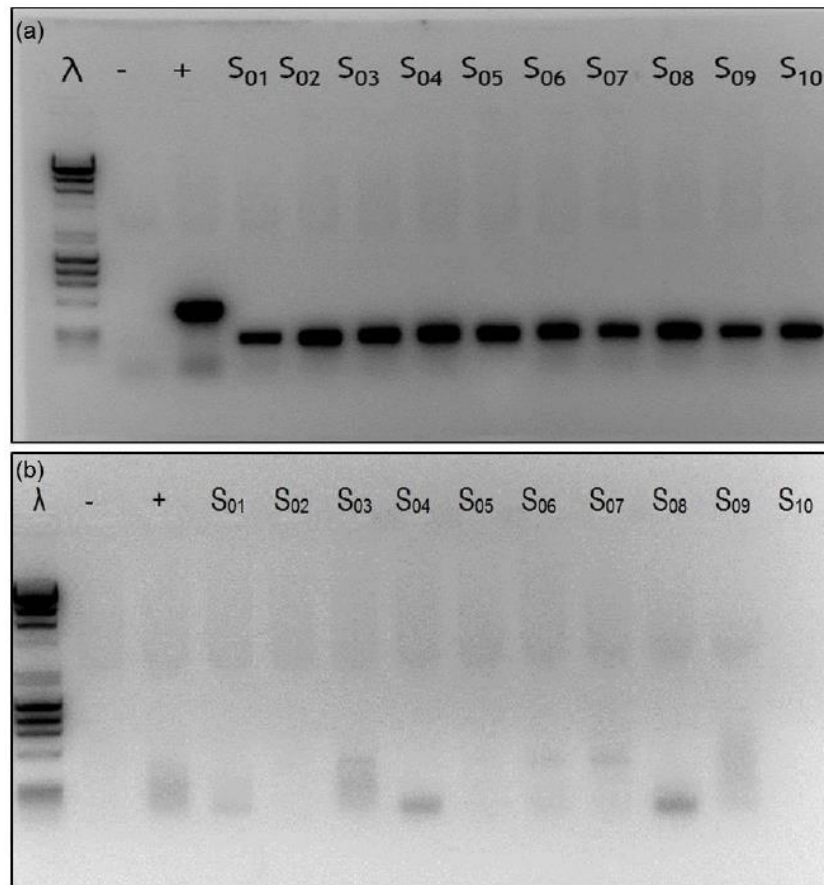


Figura 1