



**Assinado
Digitalmente**

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0806054-1

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0806054-1

(22) Data do Depósito: 03/09/2008

(43) Data da Publicação do Pedido: 21/09/2010

(51) Classificação Internacional: C12Q 1/68; C12N 15/09; C12R 1/01

(54) Título: MÉTODO E KIT PARA DETERMINAÇÃO E/OU CARACTERIZAÇÃO DE AEROMONAS

(73) Titular: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL, Diretor(a). CGC/CPF: 88648761000103. Endereço: Rua Francisco G. Vargas, 1130, CIDADE UNIVERSITÁRIA, Caxias do Sul, RS, BRASIL(BR), 95070560

(72) Inventor: SERGIO ECHEVERRIGARAY LAGUNA; ANA PAULA LONGARAY DELAMARE; SÉRGIO OLAVO PINTO DA COSTA; ROBERTO FRANCISCO LUCENA; GUILHERME THOMAZI; SHANA FERRARINI

Código de Controle: 36AD10993D8C7594 EB75D385C2E8CD66

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 03/09/2008, observadas as condições legais

Expedida em: 03/07/2018

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

Relatório Descritivo de Patente de Invenção

MÉTODO DE DETERMINAÇÃO E/OU CARACTERIZAÇÃO DE *AEROMONAS*

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção situa-se principalmente no campo da biotecnologia. Mais especificamente, a presente invenção descreve um método de determinação e/ou de caracterização rápida de bactérias do gênero *Aeromonas* através de amplificação de sequência de DNA gênero-específica e avaliação de polimorfismo conformacional de fita simples de DNA (SSCP).

Antecedentes da Invenção

Bactérias do gênero *Aeromonas*

[0002] As bactérias do gênero *Aeromonas*, família Aeromonadaceae, são bacilos gram-negativos anaeróbicos facultativos, oxidase e catalase positivos, amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados comumente em ecossistemas aquáticos que englobam desde rios, lagos, reservatórios, até locais de tratamento de água potável e de esgoto. *Aeromonas spp.* são patógenos tanto de animais de sangue frio quanto de sangue quente, sendo atualmente consideradas como patógenos emergentes e incluídos na lista de contaminantes pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA.

[0003] As bactérias do gênero *Aeromonas* são consideradas agentes emergentes de toxinfecções alimentares e oportunistas para o homem e animais (Albert *et al.*, 2000). Nas últimas décadas estas bactérias têm sido reconhecidas como patógenos humanos emergentes, sendo associadas a gastroenterites, endocardites, infecções oculares, meningites, abscessos intra-abdominais, osteomielites, peritonites, infecções dos tratos respiratório e urinário, septicemia (Burke *et al.* 1983; Janda *et al.*, 1995; Albert *et al.*, 2000; Bizani & Brandelli, 2001; Koneman *et al.*, 2001; Tequianes-Bravo *et al.*, 2005), síndrome urêmica hemolítica (Janda *et al.*, 1995), entre outras. Isolados de *Aeromonas* foram detectados em feridas de pacientes que sofreram lesão

seguida de exposição à água (Ghenghesh *et al.*, 2001), sendo *A. hydrophila* o principal agente causal nestes casos (Abbott *et al.*, 2003). Estes fatos tornam o gênero de interesse clínico e de saúde pública. (Janda *et al.*, 1995; Albert *et al.*, 2000).

[0004] A identificação fenotípica dentro do gênero *Aeromonas*, permite a separação de dois grupos: o grupo “*hydrophila*”, representando pelas espécies móveis, e o grupo “*salmonicida*”, que inclui as espécies não móveis associadas a animais de sangue frio. As espécies de maior importância clínica pertencem ao grupo “*hydrophila*”. A virulência em *Aeromonas* é multifatorial, destacando-se toxinas extracelulares e enzimas, incluindo: citotoxinas, enterotoxinas, alfa e beta hemolisinas, proteases, lipases e mecanismos de aderência e secreção (Botarelli e Ossiprandi, 1999, entre outros).

Distribuição e ocorrência de bactérias do gênero *Aeromonas*

[0005] As bactérias do gênero *Aeromonas* são ubíquas em ambientes aquáticos sendo facilmente isoladas em águas doces ou marinhas em praticamente todas as latitudes (Handfield *et al.*, 1996; Holmes *et al.*, 1996; Borrel *et al.*, 1997; Janda & Abbott, 1998; Chacón *et al.*, 2003). Além dos ambientes aquáticos, as *Aeromonas* são encontradas em grande número de alimentos frescos tanto de origem animal como vegetal, e alimentos processados, inclusive naqueles refrigerados (Buchanan & Palumbo, 1985; Saad *et al.*, 1995; Handfield *et al.*, 1996; Altwegg, 1999; Albert *et al.*, 2000). Além de tolerância e capacidade de crescimento em baixas temperaturas, algumas espécies de *Aeromonas* apresentam tolerância à salinidade (Delamare *et al.*, 2000), o que lhes confere o potencial de manter elevada viabilidade ou mesmo, crescer em concentrações salinas comumente utilizadas na conservação de produtos alimentícios de origem animal e vegetal.

[0006] Os meios disponíveis para a avaliação qualiquantitativa de *Aeromonas* apresentam eficiência limitada, caracterizando-se mais como meios diferenciais do que seletivos. Estes meios incluem geralmente ampicilina como agente

seletivo e produção de ácido a partir de uma fonte de carbono específica como agente diferencial. A semelhança de *Aeromonas* com outras bactérias, particularmente, *Vibrio*, *Plesiomonas*, *Alteromonas* e enterobactérias, dificultam a avaliação quantitativa, o isolamento e a classificação. Além de pouco eficientes, estes métodos são relativamente demorados, limitando a sua aplicação em alguns casos.

[0007] A identificação da espécie *Aeromonas* é complexa. Assim sendo, distintos métodos fenotípicos, imunológicos e moleculares têm sido aplicados visando solucionar os problemas taxonômicos deste gênero (Millership, 1996; Altwegg, 1996). Os métodos fenotípicos envolvem a utilização de uma bateria de testes enzimáticos, de resistência e de capacidade de degradação de fontes de carbono. O número de testes, o tempo necessário para avaliação e principalmente, a variação intra-específica limitam a utilização e a eficiência destes métodos (Abbott et al., 2003). Métodos imunológicos têm permitido a determinação de sorotipos específicos dentro do gênero, mas a sua aplicação é limitada pelo número mínimo de células necessárias e a resposta cruzada com outras bactérias.

[0008] Com base em caracteres bioquímicos, na hibridização DNA-DNA e outros métodos moleculares, 15 genoespécies ou grupos de hibridização e 14 fenoespécies têm sido validadas ou propostas (Popoff *et al*, 1981; Carnahan & Altwegg, 1996; Borrel *et al.*, 1997; Chacón *et al.*, 2003). Entre estas, apenas cinco (*A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* biovar *sobria*, *A. jandaei* e *A. schubertii*) são reconhecidas como os patógenos humanos (Janda & Abbott, 1998). Alguns dos métodos moleculares conhecidos aplicados à classificação e caracterização de isolados de *Aeromonas* compreendem: eletroforese de campo pulsado, RFLP- PCR (em geral do gene 16S rRNA), RAPD, ERIC-PCR, BOX-PCR, ribotipagem, entre outros.

Lipases extracelulares em *Aeromonas*

[0009] A principal lipase extracelular (Lip) de *A. hydrophila*, codificada pelo gene *lipA*, apresenta 80 kDa e possui atividade máxima para hidrólise de

ésteres C₁₀ e C₁₂, e para triacilgliceróis C₈ e C₁₀. Verificou-se que esta lipase apresentou elevada atividade no início da fase estacionária do crescimento celular com uma faixa de pH ótimo entre 7,5 - 8,0. A atividade máxima da enzima foi obtida a uma temperatura de 37°C, sendo que, após 30 minutos de incubação a 55°C, apenas 20% da atividade enzimática permaneceu (Chuang *et al.*, 1997).

[0010] Além da proteína Lip, as *Aeromonas* são capazes de produzir uma outra lipase extracelular, codificada pelo gene *lipH3*. Esta é capaz de degradar derivados do p-nitrofenil que possuem de C₄ até C₁₀ em sua cadeia, bem como triacilgliceróis de C₄ a C₈ (Chuang *et al.*, 1997). Outras duas enzimas com atividade fosfolipídica, foram caracterizadas em *Aeromonas*: a fosfolipase C (codificada pelo gene *apl-1*) e a fosfolipase A1 (codificada pelo gene *pla*) (Watanabe *et al.*, 2004). Embora as propriedades físicas destas enzimas, como, peso molecular, estabilidade térmica e especificidade com substratos diferem uma da outra, a proteína, Lip mostrou forte similaridade com a Lipase H3 (67%) e Apl-1 (65%) (Watanabe *et al.*, 2004).

[0011] Cascón *et al.*(2000) constataram que 100% dos isolados de *Aeromonas* sp. analisados, apresentaram atividade lipolítica. Por sua vez, Chacón *et al.* (2003) relataram elevada prevalência do gene *lipA* em isolados de *Aeromonas* analisados através da técnica da PCR. Em outro estudo, Cascón *et al.*(2000), constataram que 100% dos isolados de *Aeromonas* sp. analisados, apresentaram atividade lipolítica quando plaqueados em meio ágar LB (Lúria Bertani) suplementado com 0,5% de tributirim.

SSCP (single strand conformational polymorphism) na caracterização de bactérias

[0012] A utilização de SSCP de segmentos amplificados do gene 16S rRNA na identificação molecular e caracterização bacteriana foi proposta por distintos autores, entre os quais Widjoatmodjo *et al.* (1995), Lee *et al.* (1996), Turenne *et al.* (2000) e Oto *et al.* (2006).

[0013] Em *Aeromonas* poucos trabalhos referem à utilização de SSCP. Xuanxian et al. (2000) e Ji et al. (2004) utilizaram SSCP do gene 16S rRNA para caracterização de isolados de peixes e isolados clínicos, respectivamente. Por sua vez, Rakus et al. (2008) utilizaram SSCP dos genes *Cyca-DAB1* e *Cyca-DAB2* na caracterização de isolados de *Aeromonas* obtidos de carpas.

[0014] Apesar do gene *lipA* estar seqüenciado e a amplificação de parte do mesmo ter sido utilizada para fins de avaliação de patogenicidade, nenhum artigo até o momento associa a amplificação de genes específicos de *Aeromonas*, entre eles *lipA*, na detecção de bactérias deste gênero com análise de polimorfismo conformacional de cadeia simples de DNA para caracterização de isolados ou de amostras.

[0015] No âmbito patentário, alguns documentos descrevem métodos de detecção e/ou caracterização de bactérias como *Aeromonas*.

[0016] O documento EP 0 618 982 descreve uma sonda de DNA específica para *Aeromonas salmonicida*, compreendendo utilizar a sonda para verificar o material biológico suspeito de contaminação. A presente invenção difere desse documento pelo reconhecimento especificamente do gene *lipA* e por ser aplicável à identificação de todo o gênero *Aeromonas* e não somente *Aeromonas salmonicida*, conforme citado no referido documento.

[0017] O documento US 7,247,463 descreve seqüências nucleotídicas e enzimas isoladas de microorganismos com atividade lipase/aciltransferase que catalizam uma reação, compreendendo alcoólises e aminólises, entre outros. Em especial, um dos microorganismos é *Aeromonas aerophila*. A presente invenção difere desse documento por não se tratar somente de seqüências relacionadas a lipase, como no referido documento, mas, sim, por se tratar de um método de detecção e/ou caracterização envolvendo seqüências (*primers*) que reconhecem um gene relacionado a lipases (*lipA*), capaz de detectar e/ou caracterizar todo o gênero *Aeromonas*.

[0018] O documento WO 2001/066571 descreve agentes profiláticos e terapêuticos derivados das proteínas de superfície de *Aeromonas hydrophila*.

Especialmente, essas proteínas codificam adesinas e variantes dos mesmos que podem ser utilizados para diagnósticos, tratamento e prevenção de infecção por *Aeromonas*. A presente invenção difere desse documento por não identificar e/ou utilizar proteínas de *Aeromonas hydrophila*, mas, sim, permitir a identificação de *Aeromonas* através do reconhecimento do gene *lipA* em amostras biológicas.

[0019] O documento WO 80/02433 descreve um método para rápida identificação de bactérias compreendendo a determinação das enzimas das bactérias, preferencialmente por análise de fluxo contínua. A presente invenção difere desse documento por utilizar determinadas sequências para o reconhecimento específico do gene *lipA*, não descritas no referido documento.

[0020] Portanto, as referências aqui listadas circunscrevem a presente invenção, sem, contudo, antecipá-la ou sequer sugerir seus objetos.

Sumário da Invenção

[0021] É um objeto da presente invenção proporcionar um método de determinação e/ou caracterização de *Aeromonas* compreendendo as etapas de:

- a) coletar uma amostra biológica;
- b) preparar a amostra de a); e
- c) utilizar os conjuntos de sequências iniciadoras SEQ ID nº1, SEQ ID nº2, SEQ ID nº3 e/ou SEQ ID nº 4 para determinar a presença do gene *lipA* na amostra de b).

[0022] Em uma realização preferencial, o método adicionalmente compreende uma etapa de:

- d) determinar a presença de polimorfismos (SSCP) no gene *lipA*.

[0023] Em uma realização preferencial, a presença de polimorfismos é realizada através da identificação de perfis diferentes de bandas após a separação eletroforética dos arranjos de fita simples dos amplicons.

[0024] Em uma realização preferencial, os primers proporcionam a

amplificação de seqüências de DNA de aproximadamente 280pb a 350pb nas distintas espécies do gênero *Aeromonas*, sem, entretanto, amplificar DNA de outras bactérias.

[0025] Em uma realização preferencial, as amostras para PCR podem ser preparadas diretamente ou com enriquecimento prévio (4 a 12 horas a 37°C em água alcalina peptonada) se o número de microrganismos estimado ou esperado for inferior a 3000 células de *Aeromonas* por mililitro.

[0026] Em uma realização preferencial, as amostras podem ser plaqueadas em meio seletivo e diferencial adequado para posterior análise molecular de colônias suspeitas.

[0027] Em uma realização preferencial, as amostras originais ou enriquecidas são pré-diluídas e posteriormente submetidas a diluição seriada.

[0028] Em uma realização preferencial, amostras pré-diluídas e diluições seriadas são amplificadas e os amplicons separados através de eletroforese para análise quali-quantitativa de *Aeromonas*.

[0029] Em uma realização preferencial, as duas fitas de DNA de amplicons obtidos de amostras ou colônias isoladas são separadas por tratamento térmico e/ou químico.

[0030] Em uma realização preferencial, as confirmações de fita simples dos amplicons são avaliadas em géis de poliacrilamida para caracterização dos isolados ou das amostras.

[0031] É um objeto adicional da presente invenção um kit compreendendo o método de determinação e/ou caracterização previamente descrito.

[0032] Esses e outros objetos da invenção serão valorizados e melhor compreendidos pelos versados na arte a partir da descrição detalhada a seguir.

Breve Descrição das Figuras

[0033] A Figura 1 mostra: (A) a posição dos conjuntos de seqüências iniciadoras (primers) A (PA) e B (PB) em relação às seqüências do gene ortólogos lipA (gi117558854) (G1) e alt (gi84105180) de *A. hydrophila* (G2).

[0034] A Figura 2 mostra a especificidade do PCR do gene *lipA* na determinação de *Aeromonas*, no qual: 1- *Salmonella thyphimurium*, 2- *Aeromonas caviae*, 3- *Escherichia coli*, 4- *Staphylococcus aureus*, 5- *Bacillus subtilis*, 6- *Staphylococcus epidermidis*, 7- *Aeromonas sobria*, 8- *Bacillus megatherium*, 9- *Enterococcus faecalis*, 10- *Pseudomonas fluorescens*, 11- *Sarcina sp.*, 12- *Citrobacter sp.*, 13- *Escherichia coli*, 14- *Lactococcus lactis*, 15- Controle negativo.

[0035] A Figura 3 mostra a amplificação pela PCR do gene *lipA* com distintas quantidades de *Aeromonas* na amostra. Legenda: 1- 10^4 células/reação, 2- 10^3 células/reação, 3- 10^2 células/reação, 4- 10^1 células/reação, 5- 1 células/reação, B- controle negativo.

[0036] A Figura 4 mostra o perfis de SSCP de segmento do gene *lipA* de: *A. hydrophila* IBAer 109 (colunas 1 e 2), *A. hydrophila* IBAer114 (colunas 4 e 5), *A. hydrophila* IBAer 145 (colunas 7 e 8) e *A. salmonicida* IBAer121 (coluna 10).

Descrição Detalhada da Invenção

[0037] Os exemplos a seguir não têm a intenção de limitar a invenção, mas somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de concretizá-la. Diversas variantes podem ser obtidas a partir das construções da presente invenção.

Aeromonas

[0038] As *Aeromonas* da presente invenção compreendem todas as espécies do gênero *Aeromonas*. Em uma realização preferencial, a presente invenção utiliza representantes das seguintes espécies: *A. hydrophila* (ATCC7966), *A. sobria* (ATCC 43979), *A. caviae* (ATCC 15468), *A. euchrenophila*, *A. allosaccharophila*, *A. veronii*, *A. schubertii*, *A. media*, *A. trota*, *A. salmonicida*, *A. ichtiosmia*, e *A. encheleia*. Além destas, a presente invenção utiliza isolados clínicos de *A. hydrophila*, *A. sobria* e *A. caviae*, e isolados de origem animal de *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. media*, *A. trota*, *A. schubertii*, *A. veronii*, *A. sobria* e

A. salmonicida.

Amostras biológicas

[0039] As amostras biológicas da presente invenção incluem amostras de origem animal, humano, ambiental ou de alimentos. Em uma realização preferencial, a presente invenção utiliza amostras de fezes humanas de pacientes sintomáticos e assintomáticos, de fezes de aves, de pele de suínos, de fezes de suínos, e de carne suína e de aves.

Preparação das amostras

[0040] A preparação das amostras da presente invenção compreende quaisquer métodos, materiais e etapas necessários para permitir que o material biológico das *Aeromonas* (DNA, RNA, proteínas, inteiros ou parciais) sejam analisados em amostras biológicas.

[0041] Em uma realização preferencial, as amostras são coletadas em recipiente apropriado com o uso de espátula esterilizada ou de suabes esterilizados, dependendo da amostra. As amostras de fezes são homogeneizadas (vortex) em salina (0,9%). As amostras de pele são coletadas com suabe cobrindo uma área de 100 cm² ou três áreas (pernil dianteiro, ventre e pernil traseiro) perfazendo 300 cm². As amostras de carne (25g) são pesadas e homogeneizadas em 225 ml de salina (0,9%).

[0042] As amostras são imediatamente analisadas, conservadas em freezer (-20°C ou -80°C) até o momento da análise, ou submetidas a enriquecimento.

[0043] Para plaqueamento e isolamento de *Aeromonas*, duas rotinas são utilizadas: (1) as amostras são diluídas 10, 100 e 1000 vezes, e 100µl da amostra não diluída e das diluições são plaqueadas em meio seletivo e diferencial, e/ou (2) as amostras são inoculadas 1ml em água alcalina peptonada e crescidas por 4 a 12 horas a 37°C, antes da diluição e plaqueamento conforme a rotina (1).

[0044] Em uma realização preferencial, a presente invenção utiliza os meios

seletivos e diferenciais GSP (Pseudomonas Aeromonas Selective Agar acc. to Kielwein, Glutamate Starch Phenol Red Agar) comercialmente disponível – Sigma –Aldrich N° 50875), AS (AEROMONAS MEDIUM BASE (RYAN) – Thermo Fisher N° 0833) e MAer (M-Aeromonas Selective Agar Base (Havelaar) – Himedia N° M1283).

Exemplo 1 – Análise da amostra de Aeromonas

Desenho de sequências iniciadoras e análise de bioinformática

[0045] Nos exemplos a seguir foram utilizadas sequências iniciadoras desenhadas a partir do alinhamento das sequências completas ou parciais depositadas (GeneBank) do gene *lipA* (*pla*, fosfolipase ou lípase) de *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. encheleia*, *A. salmonicida*, *A. eucrenophila*, *A. enteropelogenes*, *A. punctata* e *A. bestiarum*. Estas sequências foram selecionadas a partir da análise inicial de BLAST utilizando a sequência do gene *lipA* de *A. hydrophila* H3. A lista das sequências utilizadas para o desenho das sequências iniciadoras consta no quadro a seguir.

Tabela 1 – Lista de sequências utilizadas para o desenho das sequências iniciadoras

Código	Descrição	Tamanho (pb)
gi117558854	115445-117862 lipase (<i>A. hydrophila</i> ATCC7966)	2418
gi410653	<i>lipA</i> – lípase extracelular (<i>A. hydrophila</i> H3)	2055
gi3746950	<i>pla</i> – fosfolipase A1 (<i>A. hydrophila</i>)	2418
gi1938254	Lípase extracelular (<i>A. hydrophila</i>)	2256
gi537628	Fosfolipase C (<i>A. hdyrdophila</i>)	2055
gi60458504	Lípase like protein (<i>A. sobria</i> AS228)	2442
gi60458502	Lípase like protein (<i>A. sóbria</i> AS008)	2445
gi77021101	Seq. parcial lipase (<i>A. eucrenophila</i>)	383
gi77021099	Seq. parcial lipase (<i>A. encheleia</i>)	386
gi77021095	Seq. parcial lipase (<i>A. enteropelogenes</i>)	389
gi77021093	Seq. parcial lipase (<i>A. bestiarum</i>)	383
gi77021105	Seq. parcial lipase (<i>A. punctata</i>)	383
gi77021107	Seq. parcial lipase (<i>A. salmonicida</i>)	380
gi1261619	<i>alt</i> - Enterotoxina citotônica (<i>A. hydrophila</i>)	1107
gi84105180	<i>alt</i> - Enterotoxina citotônica (<i>A. hydrophila</i>)	1107
gi84105188	<i>alt</i> - Enterotoxina citotônica (<i>A. hydrophila</i>)	1107
gi73293832	<i>alt</i> - Enterotoxina citotônica (<i>A. hydrophila</i>)	1107

[0046] As sequências iniciadoras (Conjunto A e B) foram desenhadas para amplificar uma região de aproximadamente 280 e 350pb, respectivamente, dentro da sequência de aproximadamente 1030pb correspondente aos genes da lipase, mas não complementares com a sequência da toxina citotônica, conforme figura 1.

[0047] Com base em análise de BLAST, a região amplificada pelas sequências de iniciação desenhadas é específica de bactérias do gênero *Aeromonas*, enquanto que a região correspondente à toxina citotônica apresenta elevada homologia em *Vibrio*.

Análise semi-quantitativa de *Aeromonas* através de PCR

[0048] O método de avaliação semi-quantitativa de *Aeromonas* através de PCR compreende as seguintes etapas:

- a) realizar a pré-diluição inicial das amostras;
- b) realizar a diluição das amostras pré-diluídas;
- c) amplificar as amostras via PCR com sequências de iniciação (primers) específicos;
- d) separar os segmentos amplificados através de eletroforese;
- e) avaliar a quantidade de *Aeromonas* pela diluição máxima com amplificação.

Pré-diluição das amostras

[0049] Dados experimentais permitiram estabelecer a necessidade de pré-diluição de 1:5 a 1:20 das amostras originais ou enriquecidas para evitar o efeito inibitório sobre as reações de PCR causados por componentes presentes no material coletado.

[0050] Em uma realização preferencial, a presente invenção utiliza pré-diluições 1:5 a 1:10 em amostras originais e 1:10 a 1:20 em amostras enriquecidas.

Diluição das amostras pré-diluídas

[0051] Diluições seriadas de base 10 (10^{-1} a 10^{-4}), prévias à amplificação, são utilizadas para determinação semi-quantitativa de *Aeromonas*.

Amplificação via PCR

[0052] A determinação quali-quantitativa e caracterização de *Aeromonas* na presente invenção utiliza sequências iniciadoras (primers) correspondentes a sequências específicas do gênero *Aeromonas* para gerar amplicons característicos destas bactérias.

[0053] Em uma realização preferencial, a presente invenção utiliza sequências iniciadoras (primers) desenhados para amplificação do gene *lipA* em *Aeromonas*.

Conjunto de Primers

- A) Flip1 (AYCTGGTKCCGCTCAAGCCG)
e Rlip1 (TCACSGCCANCAGCACRTC);
- B) Flip2 (GAYGTGCTGNTGGCSGTGAA)
e Rlip2 (CCGTGCCAGGAYTGGGTYTT).

Onde: N= A, G, T ou C; Y= C ou T; K= T ou G; S= G ou C; R= A ou G.

[0054] Tais primers foram desenhados para regiões conservadas e características do gene *lipA* com base nas sequências depositadas no GeneBank, e permitem amplificar sequências de aproximadamente 280pb a 350pb com os primers A e B, respectivamente, nas distintas espécies do gênero, sem entretanto, amplificar DNA de outras bactérias.

[0055] Utilizando como exemplo o genoma completo de *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* ATCC 7966 (gi|117558854:115445-117862), pode ser visto que a sequência Flip1 irá se alinhar na região 115887- 115907 (ACCTGGTGCCGCTCAAGCCG), as sequências Rlip1 e Flip2 na região 116144-116164 (GATGTGCTGGTGGCGGTGA) e a sequência Rlip2 na região 116471-116491 (AAGACCCAGTCCTGGCACGG).

Determinação da especificidade da detecção/caracterização de *Aeromonas*

[0056] As bactérias utilizadas na determinação de especificidade do sistema molecular de detecção incluem: *A. hydrophila* (ATCC 7699), *A. caviae* (ATCC 15468), *A. sobria* (ATCC 43979), *Salmonella typhimurium* (IBSal101), *Escherichia coli* (IBEsc 101), *Enterococcus faecalis* (IBEnc101), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *Bacillus subtilis* (IBBac101), *B. cereus* (IBBac 102), *B. megaterium* (IBBac 103), *Pseudomonas aeruginosa* (IBPse101 e 102), *P. fluorescens* (IBPse103), *Enterobacter cloacae* (IBEnt101), *Sarcina sp* (IBSar101), *Shigella sp* (IBShi101), *Serratia marcenscens* (IBSer101), *Klebsiella oxytoca* (IBKle 101), *Klebsiella pneumoniae* (IBKle 102), *Enterococcus sp* (IBEnt 101), *Proteus mirabilis* (IBPro101), *Micrococcus sp* (IBMic101), *Lactobacillus casei* (IBLac01), *Lactococcus lactis* (IBLac02) e *Citrobacter sp.* (IBCit101).

[0057] As bactérias foram crescidas em meio Luria-Bertani por 18 horas a 30 ou 37°C, dependendo da espécie bacteriana. As amostras assim obtidas foram diluídas 1:50 em água destilada autoclavada e utilizadas nas reações de PCR.

[0058] As reações de amplificação foram realizadas em volumes de 25µl, contendo 10mM de Tris HCl (pH 8,3), 50mM de KCl, 3mM de MgCl₂, 0,25% de Triton-X-100, 1,25mM de cada um dos desoxirribonucleotídios (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 1µl de cada *primer*, 0,15µl (5U/µl) de enzima Taq polimerase, e 4µl de suspensão bacteriana de cada um dos isolados.

[0059] As amplificações foram realizadas em termociclador Eppendorf, programado para 5 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de um minuto a 94°C, para a desnaturação das fitas do DNA, um minuto a temperaturas que variaram de 56°C para o anelamento de cada um dos pares de *primers* ao DNA, e dois minutos a 72°C para extensão das fitas do DNA. Ao final dos 35 ciclos, realizou-se uma extensão suplementar por 10 minutos a 72°C. Um controle negativo contendo todos os componentes, exceto a suspensão bacteriana foi realizado.

[0060] Os produtos de amplificação, acrescidos de 5 µl de tampão de amostra

(250mg de Azul de Bromofenol e 15g de Ficoll em 100ml de água destilada), foram submetidos à eletroforese (3V/cm), em géis horizontais de agarose 1,5% em tampão TBE (89mM Trisma, 89mM de Ácido Bórico e 8mM de EDTA), e acrescidos de solução de Brometo de Etídio (10mg/ml). Como tampão de corrida utilizou-se também o TBE. Os géis de agarose foram visualizados e fotografados sob luz ultravioleta.

[0061] Conforme pode ser evidenciado na Figura 2, os primers desenhados para amplificação do gene *lipA* de *Aeromonas* são específicos, amplificando apenas amostras contendo bactérias deste gênero.

Capacidade de detecção de *Aeromonas* por PCR do gene *lipA*

[0062] A fim de determinar o limite de detecção da amplificação pela PCR do gene *lipA* foram avaliadas amostras contendo distintas quantidades de células bacterianas (*A. hydrophila* ATCC7966). As reações de PCR e a separação dos amplicons foram realizadas conforme descrito no Exemplo 1. Como pode ser observado na Figura 3, amplificações consistentes foram obtidas em amostras contendo 10.000 a 100 células. Amostras contendo 100 a 1 células apresentaram uma banda tênue de difícil visualização. Assim sendo, o sistema da PCR utilizado apresenta como limite de detecção aproximadamente 1 célula por amostra de 4µl utilizados na reação da PCR ou $2,5 \times 10^2$ células por ml. Entretanto, visando assegurar a presença de DNA bacteriano na amostra, 10 cels/amostra são recomendáveis. Nesta base, a capacidade de detecção segura é de $2,5 \times 10^3$ células por ml.

Prevalência de *Aeromonas* em carcaças suínas usando PCR e plaqueamento

[0063] Amostras de superfície de carcaças de suínos (60 animais), coletadas logo após a sangria, foram avaliadas quanto à presença de *Aeromonas* através de plaqueamento direto em meio M-Aer e pela amplificação pela PCR do gene *lipA* após enriquecimento por 12h a 37°C em água alcalina peptonada e diluídas em 1:10. As amostras foram amplificadas conforme previamente

descrito.

[0064] Um total de 58 amostras (97%) exibiram a presença de segmentos amplificados com os conjuntos de primers A e B correspondentes ao gene *lipA*, enquanto 86,7% apresentaram *Aeromonas* quando analisadas diretamente através de plaqueamento em meio M-Aer, evidenciando a eficiência do sistema molecular reivindicado na presente invenção, frente ao sistema tradicional de plaqueamento e contagem.

Identificação de SSCPs

[0065] Dois sistemas podem ser utilizados para caracterização de *Aeromonas*, (1) caracterização de isolados, ou (2) caracterização de amostras. No primeiro caso, colônias isoladas em meio sólido são transferidas para meio LB líquido e crescidas por 8 h a 37°C. Já no segundo caso, amostras diretamente enriquecidas em água alcalina peptonada por 8 a 12h a 37°C são utilizadas.

[0066] As culturas bacterianas são diluídas 1/10 a 1/20 em água deionizada esterilizada e utilizadas diretamente para a amplificação do segmento de DNA escolhido. No caso deste exemplo, um fragmento do gene *lipA*. A amplificação é realizada de acordo com o procedimento detalhado no exemplo (b).

[0067] Após a amplificação, 10µl do amplificado são misturados com 10µl de tampão de desnaturação (95% formamida, 500mM EDTA, 0,005% azul de bromofenol e 0,005% de xileno cianol). As amostras assim preparadas são desnaturadas a 95°C por 10 minutos, sendo imediatamente transferidas para banho de gelo. As amostras são colocadas em gel de poliacrilamida 10% (29:1 acrilamida:bisacrilamida) em tampão TBE contendo 5% de glicerol e submetidas a eletroforese (70 V) por aproximadamente 3h ou até a frente de corrida do azul de bromofenol atingir a parte inferior do gel.

[0068] A revelação dos géis é realizada com nitrato de prata seguindo o seguinte protocolo: (1) transferência do gel para ácido acético 10% por 20 minutos; (2) três lavagens com água destilada; (3) adição de 0,5g de nitrato de prata em 500ml de água destilada e incubação por 45 minutos; (4) lavagem

rápida com água destilada; (5) revelação através da adição de 100ml de solução contendo hidróxido de sódio 3% e 150µl de formaldeído e incubação até o surgimento das bandas; (6) retirar o revelador e adicionar ácido acético 10%.

[0069] Os géis são avaliados visualmente calculando a movimentação relativa (RM) de cada uma das bandas conformacionais. Os perfis de bandas obtidos podem ser comparados entre si para caracterização dos isolados ou das amostras.

[0070] Os resultados obtidos experimentalmente mostraram que os perfis de SSCP, utilizando tanto o conjunto de primers A quanto B, permitem diferenciar mais de 90% dos isolados de *Aeromonas* sp. Entretanto, estes perfis raramente são característicos de uma dada espécie, limitando a sua utilização para classificação dos isolados ou das amostras.

[0071] Os versados na arte valorizarão imediatamente os importantes benefícios decorrentes do uso da presente invenção. Pequenas variações na forma de concretizá-la devem ser compreendidas como dentro do espírito da invenção e das reivindicações anexas.

Reivindicações

1. Método de determinação e/ou caracterização de *Aeromonas* caracterizado por compreender as etapas de:
 - a) coletar uma amostra biológica;
 - b) preparar a amostra de a); e
 - c) utilizar os conjuntos de sequências iniciadoras selecionadas do grupo que consiste de SEQ ID nº1, SEQ ID nº2, SEQ ID nº3, SEQ ID nº 4 e combinações das mesmas, para determinar a presença do gene localizado entre as posições 115445 e 117862 do genoma de *A. hydrophyla* (ATCC7966) através de PCR utilizando os *primers* (Flip1 e Rlip1; e Flip2 e Rlip2) na amostra de b).
2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por opcionalmente compreender a etapa de: d) determinar a presença de polimorfismos (Polimorfismo Conformacional de Fita Simples) no gene localizado entre as posições 115445 e 117862 do genoma de *A. hydrophyla* (ATCC7966).
3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelas SEQ ID nº1 e/ou SEQ ID nº2, SEQ ID nº3 e/ou SEQ ID nº 4 proporcionarem a amplificação de sequências de DNA de aproximadamente 280pb (*primers* Flip1 e Rlip1) e 350pb (*primers* Flip2 e Rlip2) nas distintas espécies do gênero *Aeromonas*, sendo específicos para bactérias desse gênero.
4. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelas amostras serem preparadas com enriquecimento prévio quando o número de microrganismos estimado e/ou esperado é inferior a 3000 células de *Aeromonas* por mililitro.
5. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo enriquecimento prévio ser realizado de 4 a 12 horas a 37°C em água alcalina peptonada.
6. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelas amostras serem plaqueadas em meio seletivo e diferencial adequado para posterior análise molecular de colônias suspeitas.
7. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelas amostras originais ou enriquecidas serem pré-diluídas e posteriormente submetidas a

diluição seriada.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelas amostras pré-diluídas e diluições seriadas serem amplificadas e os amplicons separados através de eletroforese para análise quali-quantitativa de *Aeromonas*.

9. Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelas duas fitas de DNA de amplicons obtidos de amostras ou colônias isoladas serem separadas por tratamento térmico e/ou químico.

10. Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelas configurações de fita simples dos amplicons serem avaliadas em géis de poliacrilamida para caracterização dos isolados ou das amostras.

FIGURAS

FIGURA 1

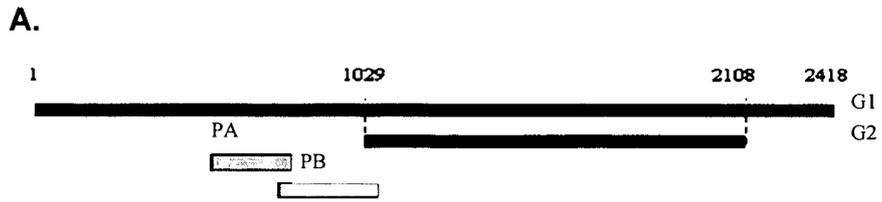


FIGURA 2

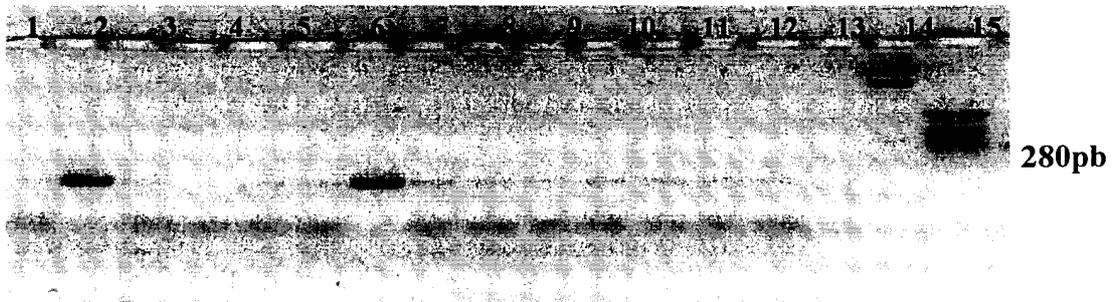


FIGURA 3

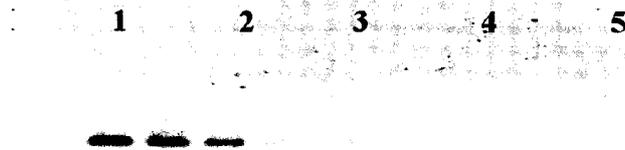


FIGURA 4

