



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 305 646**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04027285 .8**

86 Fecha de presentación : **17.11.2004**

87 Número de publicación de la solicitud: **1541697**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **15.06.2005**

54 Título: **Detección de estreptococos del grupo B.**

30 Prioridad: **18.11.2003 US 716005**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.11.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.11.2008**

73 Titular/es: **MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL  
EDUCATION AND RESEARCH  
200 First Street S.W  
Rochester, Minnesota 55905, US**

72 Inventor/es: **Uhl, James R.;  
Cockerill, Franklin R.;  
Aichinger, Christian y  
Reiser, Astrid**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

**ES 2 305 646 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Detección de estreptococos del grupo B.

5 **Campo de la técnica**

Esta invención se relaciona con diagnósticos de bacterias, y más particularmente con la detección de estreptococos del grupo B (GBS).

10 **Antecedentes**

Los Estreptococos del Grupo B (GBS) son unas bacterias Gram positivas comúnmente encontradas en la garganta y en el intestino delgado de adultos, y en la vagina de las mujeres. Normalmente, este organismo no causa enfermedades en el huésped. Durante el parto, sin embargo, un bebé puede llegar a infectarse con GBS. Las infecciones causadas por GBS son la causa principal de morbilidad neonatal y de mortalidad en los Estados Unidos, con tasas de mortalidad tan altas como del 50% en los casos no tratados. En años recientes, los antibióticos administrados durante el parto han reducido grandemente la incidencia de GBS en neonatales.

Las recomendaciones actuales de CDC piden que las mujeres se analicen por GBS durante la semana 35 a la 37 del período de gestación por medio de un cultivo. Las mujeres que se encuentra que están colonizadas con GBS son tratadas con antibióticos intravenosos durante el parto. Este método ha reducido la incidencia de infección neonatal y a pocas pacientes se les suministra un tratamiento innecesario con antibióticos. Sin embargo, el problema de sepsis neonatal por GBS no ha sido eliminado. La colonización con GBS es a menudo transitoria, así que la falta de colonización en la semana 35 de gestación no garantiza que no estará presente el GBS en la semana 40. También, muchas pacientes se presentan por primera vez a los proveedores del servicio médico al momento del parto y no han sido examinadas por GBS. La decisión de tratar con antibióticos en estos casos se debe tomar con base en factores de riesgo tales como gestación < 37 semanas, ruptura de membrana >12 semanas, la corta edad de la paciente, y/o ser de etnia negra o hispana.

Idealmente, la determinación de la colonización por GBS se haría durante el trabajo temprano del parto y los resultados de laboratorio estarían disponibles dentro de unas pocas horas. La identificación convencional de GBS requiere de cultivo. Ya que el cultivo puede requerir hasta 72 horas para una respuesta definitiva, los médicos pueden proporcionar innecesariamente antimicrobianos al momento del suministro en forma empírica. El uso excesivo de antimicrobianos puede predisponer el desarrollo de resistencia antimicrobiana y añade el riesgo de reacciones adversas incluida la anafilaxis letal. Las pruebas rápidas de antígeno (por ejemplo, la aglutinación de látex) también han sido utilizadas para diagnosticar GBS, pero estos análisis carecen de la sensibilidad cuando se los compara con el cultivo. En realidad, la sensibilidad de las pruebas de antígeno para detectar GBS es tan baja que la FDA ha emitido una alerta de que estos tipos de ensayos no pueden ser utilizados para diagnosticar GBS sin el respaldo de un cultivo.

Ke y colaboradores (Ke D y colaboradores, 2000, Clin Chem. 46(3): 324-331) desarrollaron un ensayo con base en la PCR para la detección rápida de GBS con base en el gen *cfb* que codifica al factor Christie-Atkins-Munch-Petersen (CAMP), mientras que Bergeron y colaboradores (Bergeron y colaboradores, 2000, N Engl J Med. 343(3):175-179) describieron un método rápido para la detección de infecciones causadas por estreptococo del Grupo B en mujeres embarazadas al momento del alumbramiento y estudiaron la eficacia de dos ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para análisis de rutina de mujeres embarazadas.

WO 03/025216 se relaciona con métodos moleculares de clasificación de estreptococos del grupo B, los cuales comprenden analizar la secuencia de nucleótidos de una o más regiones dentro de los genes *cpsD*, *cpsE*, *cpsF*, *cpsG* y/o *cpsI/M* de dicha bacteria, dicha(s) región(es) comprendiendo uno o más nucleótidos cuya secuencia varía entre especies, así como polinucleótidos útiles en tales métodos.

La patente estadounidense No. 6.593.093 B1 provee métodos para detectar Estreptococos del Grupo A (GAS) en muestras biológicas utilizando PCR en tiempo real. También se proveen los iniciadores y las sondas para la detección de GAS así como los artículos de manufactura que contienen a tales iniciadores y sondas para detectar GAS.

WO 03/093306 y WO 02/34771 divulgan proteínas de estreptococo del grupo B (*Streptococcus agalactiae*) y de estreptococo del grupo A (*Streptococcus pyogenes*), incluidas las secuencias de aminoácidos y las correspondientes secuencias de nucleótidos. En WO 02/34771 se suministran datos que muestran que las proteínas son antígenos útiles para vacunas, composiciones inmunogénicas, y/o diagnósticas. Las proteínas son también objetivos para los antibióticos.

WO 02/092818 se relaciona con la secuencia del genoma y con las secuencias de nucleótidos que codifican para los polipéptidos de *Streptococcus agalactiae*, tal como los polipéptidos de la envoltura celular, o polipéptidos específicos o secretados, o polipéptidos involucrados en el metabolismo y los procesos de replicación, así como vectores o células que contienen dichas secuencias. La solicitud también se relaciona con el uso de los mismos para desarrollar vacunas, herramientas de diagnóstico, chips de ADN y para identificación de objetivos terapéuticos.

## ES 2 305 646 T3

En WO 00/37646, se identifican una serie de genes en *Streptococos* del Grupo B, cuyos productos se pueden asociar con la superficie exterior del organismo. Los genes, o fragmentos funcionales de los mismos, pueden ser útiles en la preparación de compuestos terapéuticos, por ejemplo, vacunas para inmunizar a un paciente contra una infección microbiana.

5

### Resumen

La invención provee métodos de identificación de estreptococos del grupo B (GBS) en una muestra biológica o en una muestra no biológica. Los iniciadores y las sondas para detectar GBS son suministrados por la invención, en forma de kits que contienen a tales iniciadores y sondas. Los métodos de la invención se pueden utilizar para identificar rápidamente el ADN de GBS a partir de especímenes para diagnosticar la infección con GBS. Para el uso de iniciadores y sondas específicas, los métodos incluyen la amplificación y el monitoreo del desarrollo de productos específicos de amplificación utilizando transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET).

En un aspecto de la invención, se provee un método para detectar la presencia o la ausencia de GBS en una muestra biológica de un individuo o en una muestra no biológica. El método para detectar GBS incluye llevar a cabo una etapa de un ciclo, que incluye una etapa de amplificación y una etapa de hibridación. La etapa de amplificación incluye poner en contacto a la muestra con un par de iniciadores de *pts* para producir un producto de amplificación de *pts* si está presente en la muestra una molécula de ácido nucleico de *pts* de GBS. La etapa de hibridación incluye poner en contacto a la muestra con un par de sondas de *pts*. Generalmente, los miembros del par de sondas de *pts* hibridan dentro de no más de cinco nucleótidos de cada uno de los otros. Una primera sonda de *pts* del par de sondas de *pts* es marcada típicamente con una mitad fluorescente donante y una segunda sonda de *pts* del par de sondas de *pts* es marcada con una mitad fluorescente aceptora correspondiente. El método incluye además detectar la presencia o la ausencia de FRET entre la mitad fluorescente donante de la primera sonda de *pts* y la mitad fluorescente aceptora de la segunda sonda de *pts*. La presencia de FRET es usualmente indicativa de la presencia de GBS en la muestra, mientras que la ausencia de FRET es usualmente indicativa de la ausencia de GBS en la muestra.

Un par de iniciadores de *pts* generalmente incluyen a un primer iniciador de *pts* y a un segundo iniciador de *pts*. El primer iniciador de *pts* incluye la secuencia 5'-TGA GAA GGC AGT AGA AAG CTT AG-3' (SEQ ID NO: 1), y el segundo iniciador de *pts* incluye la secuencia 5'-TGC ATG TAT GGG TTA TCT TCC-3' (SEQ ID NO: 2). Alternativamente, una primera sonda de *pts* incluye la secuencia 5'-CAA ATT AAA GAG ACT ATT CGT GCA A-3' (SEQ ID NO: 3), y la segunda sonda de *pts* incluye la secuencia 5'-CAA GTA AAT GCA GAA ACA GG-3' (SEQ ID NO: 4).

En algunos aspectos, uno de los iniciadores de *pts* puede ser marcado con una mitad fluorescente (ya sea un donante o un aceptor, según sea apropiado) y puede tomar el lugar de una de las sondas de *pts*.

Los miembros del par de sondas de *pts* pueden hibridar dentro de no más de dos nucleótidos de cada uno de los otros, o pueden hibridar dentro de no más de un nucleótido de cada uno de los otros. Una mitad fluorescente donante representativa es fluoresceína, y las mitades fluorescentes aceptoras correspondientes incluyen LC-Red 640, LC-Red 705, Cy5, y Cy5.5. Las mitades fluorescentes donante y aceptora correspondientes adicionales son conocidas en el arte.

En un aspecto, la etapa de detección incluye excitar la muestra a una longitud de onda absorbida por la mitad fluorescente donante y visualización y/o medición de la longitud de onda emitida por la mitad fluorescente aceptora (esto es, visualización y/o medición de FRET). En otro aspecto, la etapa de detección incluye la cuantificación de FRET. En aún otro aspecto, la etapa de detección se puede realizar después de cada etapa de ciclización (por ejemplo, en tiempo real).

Generalmente, la presencia de FRET dentro de 45 ciclos (por ejemplo, 20, 25, 30, 35, ó 40 ciclos) incluye la presencia de una infección de GBS en el individuo. Además, determinar la temperatura de fusión entre una o ambas sondas de *pts* y el producto de amplificación de *pts* puede confirmar la presencia o la ausencia del GBS.

La muestra biológica representativa incluye una muestra anal y/o vaginal. Los métodos anteriormente descritos pueden incluir además prevenir la amplificación de un ácido nucleico contaminante. La prevención de la amplificación puede incluir llevar a cabo la etapa de amplificación en presencia de uracilo y tratar la muestra con uracil-ADN glicosilasa antes de la amplificación.

Además, la etapa de ciclización se puede llevar a cabo sobre una muestra de control. Una muestra de control puede incluir la misma porción de la molécula de ácido nucleico de *pts* de GBS. Alternativamente, una muestra de control puede incluir una molécula de ácido nucleico diferente a una molécula de ácido nucleico de *pts* de GBS. Las etapas de ciclización se pueden llevar a cabo sobre una muestra de control tal, utilizando un par de iniciadores de control y un par de sondas de control. Los iniciadores y las sondas de control son diferentes a los iniciadores y a las sondas de *pts*. Una o más etapas de amplificación producen un producto de amplificación de control. Cada una de las sondas de control hibrida al producto de amplificación de control.

En otro aspecto de la invención, se proveen artículos de fabricación, o kits. Los kits de la invención pueden incluir un par de iniciadores de *pts*, y un par de sondas de *pts*, y una mitad donante y la correspondiente mitad aceptora

## ES 2 305 646 T3

fluorescentes. El primer iniciador de *pts* suministrado en un kit de la invención comprende la secuencia 5'-TGA GAA GGC AGT AGA AAG CTT AG-3' (SEQ ID NO: 1) y el segundo iniciador de *pts* comprende la secuencia 5'-TGC ATG TAT GGG TTA TCT TCC-3' (SEQ ID NO: 2). La primera sonda de *pts* suministrada en un kit de la invención comprende la secuencia 5'-CAA ATT AAA GAG ACT ATT CGT GCA A-3' (SEQ ID NO: 3) y la segunda sonda de *pts* comprende la secuencia 5'-CAA GTA AAT GCA GAA ACA GG-3' (SEQ ID NO: 4).

Los artículos de fabricación incluyen mitades fluoróforas para marcar las sondas o las sondas ya marcadas con la mitad fluorescente donante y la correspondiente aceptora. El artículo de fabricación puede incluir también un inserto en el paquete con las instrucciones sobre él para la utilización de los iniciadores, sondas, y las mitades fluoróforas para detectar la presencia o la ausencia de GBS en una muestra.

En aún otro aspecto de la invención, se provee un método para detectar la presencia o la ausencia de GBS en una muestra biológica de un individuo o en una muestra no biológica. Tal método incluye llevar a cabo al menos una etapa de ciclización. Una etapa de ciclización puede incluir una etapa de amplificación y una etapa de hibridación. Generalmente, una etapa de amplificación incluye poner en contacto la muestra con un par de iniciadores de *pts* para producir un producto de amplificación de *pts* si está presente una molécula de ácido nucleico de *pts* de GBS en la muestra. Generalmente, una etapa de hibridación incluye poner en contacto a la muestra con una sonda de *pts*. Tal sonda de *pts* es usualmente marcada con una mitad fluorescente donante y una mitad fluorescente aceptora correspondiente. Los iniciadores y las sondas son como se las definió anteriormente. El método incluye adicionalmente la detección de la presencia o la ausencia de transferencia de energía de resonancia por resonancia de fluorescencia (FRET) entre la mitad fluorescente donante y la mitad fluorescente aceptora de la sonda de *pts*. La presencia o la ausencia de fluorescencia son indicativas de la presencia o de la ausencia de GBS en dicha muestra.

En un aspecto, la amplificación puede emplear una enzima polimerasa que tiene actividad de exonucleasa 5' a 3'. De esta forma, la primera y la segunda mitades fluorescentes estarían dentro de no más de 5 nucleótidos de cada uno de los otros a lo largo de la longitud de la sonda. En otro aspecto, la sonda de *pts* incluye una secuencia de ácido nucleico que permite la formación de una estructura secundaria. Tal formación de una estructura secundaria generalmente resulta en una proximidad espacial entre la primera y la segunda mitades fluorescentes. De acuerdo con este método, la segunda mitad fluorescente sobre una sonda puede ser un apagador.

En otro aspecto de la invención, se provee un método para detectar la presencia o la ausencia de GBS en una muestra biológica de un individuo o en una muestra no biológica. Tal método incluye llevar a cabo al menos una etapa de ciclización. Una etapa de ciclización puede incluir una etapa de amplificación y una etapa de enlazamiento de colorante. Una etapa de amplificación generalmente incluye poner en contacto a la muestra con un par de iniciadores de *pts* para producir un producto de amplificación de *pts* si está presente en la muestra una molécula de ácido nucleico de *pts* de GBS. Los iniciadores son como se los definió anteriormente. Una etapa de enlazamiento de colorante generalmente incluye poner en contacto al producto de amplificación de *pts* con un colorante que enlaza al ADN bicatenario dentro del producto de amplificación. De acuerdo con la invención, la presencia de enlazamiento es típicamente indicativa de la presencia de GBS en la muestra, y la ausencia de enlazamiento es típicamente indicativa de la ausencia de GBS en la muestra. Tal método puede incluir además las etapas de determinar la temperatura de fusión entre el producto de amplificación de *pts* y el colorante que enlaza al ADN bicatenario. Generalmente, la temperatura de fusión confirma la presencia o la ausencia de GBS. Los colorantes representativos de enlazamiento al ADN bicatenario incluyen SYBRGreenI<sup>®</sup>, SYBRGoId<sup>®</sup>, y bromuro de etidio.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado como comúnmente los entiende alguien normalmente capacitado en el arte a la cual pertenece esta invención. Aunque se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos aquí en la práctica o el análisis de la presente invención, los métodos y los materiales adecuados son descritos más adelante. Además, los materiales, métodos, y ejemplos son únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes. En caso de conflicto, la presente descripción, incluidas las definiciones, lo controlarán.

Los detalles de una o más modalidades de la invención se exponen con los dibujos acompañantes y la descripción que se da más adelante. Otras características, objetivos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de los dibujos y de la descripción detallada, y de las reivindicaciones.

### 55 Descripción detallada

Se describe aquí un ensayo en tiempo real para detectar GBS en una muestra biológica o en una muestra no biológica, que es más sensible y específico que los ensayos existentes. Los isómeros y las sondas para detectar infecciones de GBS y artículos de fabricación que contienen a tales iniciadores y sondas son proveídos por la invención. La mayor sensibilidad de la PCR en tiempo real para la detección de GBS comparada con otros métodos, así como las características mejoradas de la PCR en tiempo real incluyen la confinación de la muestra y la detección en tiempo real del producto amplificado, hacen posible la implementación de esta tecnología para diagnósticos de rutina de infecciones de GBS en el laboratorio clínico.

65

## ES 2 305 646 T3

### Ácidos nucleicos de GBS y oligonucleótidos

La invención provee métodos para detectar GBS por medio de amplificación, por ejemplo, una porción del ácido nucleico de *pts* de GBS. Los ácidos nucleicos de GBS diferente a aquellos ejemplificados aquí (por ejemplo, diferentes a *pts*) también pueden ser utilizados para detectar GBS en una muestra y son conocidos por aquellos capacitados en el arte. Las secuencias de ácido nucleico de GBS están disponibles (ver, por ejemplo, Nos. De Acceso en el GenBank NC\_004368 y NC\_004116). Específicamente, los iniciadores y las sondas para amplificar y detectar moléculas de ácido nucleico de *pts* de GBS son suministrados por la invención.

Los iniciadores que amplifican a una molécula de ácido nucleico de GBS, por ejemplo, *pts* de GBS se pueden diseñar utilizando, por ejemplo, un programa de computador tal como OLIGO (Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, CO). Las características importantes cuando se diseñan oligonucleótidos que van a ser utilizados como iniciadores de amplificación incluyen, pero no se limitan a, un producto de amplificación de tamaño apropiado para facilitar la detección (por ejemplo, por medio de electroforesis), temperaturas de fusión similares para los miembros de un par de iniciadores, y la longitud de cada iniciador (esto es, los iniciadores necesitan ser lo suficientemente largos para aparearse con especificidad de secuencia y para iniciar la síntesis, pero no tan largos como para que se reduzca la fidelidad durante la síntesis de oligonucleótidos). Típicamente, los iniciadores oligonucleótidos son de 15 a 30 nucleótidos de longitud.

El diseño de los oligonucleótidos que van a ser utilizados como sondas de hibridación se puede llevar a cabo en una forma similar al diseño de iniciadores, aunque los miembros de un par de sondas preferiblemente se aparean con un producto de amplificación dentro de no más de 5 nucleótidos de cada uno de los otros sobre la misma hebra para que pueda ocurrir FRET (por ejemplo, dentro de no más de 1, 2, 3 ó 4 nucleótidos de cada uno de los otros). Este grado mínimo de separación trae típicamente a las mitades fluorescentes respectivas en una proximidad suficiente para que ocurra FRET. Sin embargo, se debe entender que son posibles otras distancias de separación (por ejemplo, 6 o más nucleótidos) siempre que las mitades fluorescentes estén posicionadas relativamente entre sí en forma apropiada (por ejemplo, con un brazo enlazador) para que pueda ocurrir FRET. Además, se pueden diseñar las sondas para hibridar con objetivos que contengan un polimorfismo o mutación, permitiendo por lo tanto detección diferencial de cepas de GBS con base ya sea en hibridación absoluta de pares diferentes de sondas correspondientes a la cepa particular de GBS que va a ser clasificada o las temperaturas diferenciales de fusión, entre, por ejemplo, miembros de un par de sondas y cada producto de amplificación correspondiente a una cepa de GBS que va a ser clasificada. Como con los iniciadores de oligonucleótido, las sondas de oligonucleótido tienen temperaturas de fusión similares, y la longitud de cada sonda debe ser suficiente para que ocurra hibridación específica de la secuencia pero no tan larga para que se reduzca la fidelidad durante la síntesis. Las sondas de oligonucleótido tienen generalmente de 15 a 30 nucleótidos de longitud.

Las construcciones incluyen vectores que contienen una molécula de ácido nucleico de GBS, por ejemplo, *pts* de GBS o un fragmento del mismo. Las construcciones pueden ser utilizadas, por ejemplo, como moléculas molde de control de ácido nucleico. Los vectores adecuados para uso en la presente invención son comercialmente disponibles y/o producidos por métodos de rutina en el estado del arte de tecnología de ADN recombinante. Las moléculas de ácido nucleico de *pts* de GBS pueden ser obtenidas, por ejemplo, por medio de síntesis química, por clonación directa de GBS, o por medio de amplificación por PCR. Una molécula de ácido nucleico de GBS o un fragmento de la misma puede ser operativamente enlazada a un promotor o a otros elementos reguladores tales como una secuencia reforzadora, un elemento de respuesta, o un elemento inducible que modula la expresión de la molécula de ácido nucleico de GBS. Como se lo utiliza aquí, operativamente enlazado se refiere a la conexión de un promotor y/o otros elementos reguladores a una molécula de ácido nucleico de GBS de tal manera que permita y/o regule la expresión de la molécula de ácido nucleico de GBS. Un promotor que normalmente no dirija la expresión de *pts* de GBS puede ser utilizado para dirigir la transcripción de un ácido nucleico de *pts* utilizando, por ejemplo, una polimerasa viral, una polimerasa bacteriana, o una ARN polimerasa II de eucariota. Alternativamente, se puede utilizar el promotor nativo de *pts* para dirigir la transcripción de un ácido nucleico de *pts*. Además, operativamente enlazado se puede referir a una conexión apropiada entre un promotor de *pts* de GBS o elemento regulador y una secuencia heteróloga de codificación (esto es, una secuencia no codificadora de *pts*, por ejemplo, un gen reportero) en forma tal de permitir la expresión de la secuencia heteróloga de codificación.

Las construcciones adecuadas para uso en los métodos de la invención típicamente incluyen, además de las moléculas de ácido nucleico de *pts* de GBS, secuencias que codifican a un marcador seleccionable (por ejemplo, un gen de resistencia antibiótica) para seleccionar construcciones deseadas y/o transformantes, y un origen de replicación. La escogencia de sistemas de vectores usualmente depende de varios factores, incluyendo, pero sin limitarse a, la escogencia de células huésped, la eficiencia de replicación, la capacidad de selección, la inducibilidad, y la facilidad de recuperación.

Las construcciones que contienen moléculas de ácido nucleico de *pts* de GBS se pueden propagar en una célula huésped. Como se lo utiliza aquí, el término célula huésped significa que incluye células procariontas y eucariotas tales como células de levadura, de planta y de animal. Los huéspedes procariontas pueden incluir *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* y *Bacillus subtilis*. Los huéspedes eucariotas incluyen levaduras tales como *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Pichia pastoris*, células de mamífero tales como células COS o células de ovario de hámster chino (CHO), células de insecto, y células de planta tales como *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum*. Se puede introducir una construcción dentro de una célula huésped utilizando cualquiera de las técnicas comúnmente conocidas por aquellos

## ES 2 305 646 T3

ordinariamente capacitados en el arte. Por ejemplo, la precipitación con fosfato de calcio, electroporación, choque térmico, lipofección, microinyección, y transferencia de ácido nucleico mediada por virus son métodos comunes para la introducción de ácidos nucleicos en células huésped. Además, se puede suministrar directamente a las células ADN desnudo (ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos. 5.580.859 y 5.589.466).

5

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las patentes estadounidenses Nos. 4.683.202, 4.683.195, 4.800.159, y 4.965.188 divulgan técnicas convencionales de PCR. La PCR emplea típicamente dos iniciadores de oligonucleótido que se enlazan a un molde seleccionado de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN). Los iniciadores útiles en la presente invención incluyen oligonucleótidos capaces de actuar como un punto de iniciación de síntesis de ácido nucleico dentro de secuencias de ácido nucleico de *pts* de GBS. Un iniciador puede ser purificado a partir de una digestión de restricción por medio de métodos convencionales, o puede ser producido en forma sintética. El iniciador es preferiblemente monocatenario para máxima eficiencia en amplificación, pero el iniciador puede ser bicatenario. Los iniciadores bicatenarios son primero desnaturados, esto es, tratados para separar las hebras. Un método para desnaturar ácidos nucleicos bicatenarios es por medio de calentamiento.

15

El término “polimerasa termoestable” se refiere a una enzima de polimerasa que es estable al calor, esto es, la enzima cataliza la formación de productos de extensión del iniciador en forma complementaria a un molde y no se desnaturaliza en forma irreversible cuando es sometida a las elevadas temperaturas durante el tiempo necesario para efectuar la desnaturalización de los ácidos nucleicos de molde bicatenario. Generalmente, se inicia la síntesis en el extremo 3' de cada iniciador y procede en dirección 5' a 3' a lo largo de la hebra del molde. Las polimerasas termoestables han sido aisladas de *Thermus flavus*, *T. ruber*, *T. thermophilus*, *T. aquaticus*, *T. lacteus*, *T. rubens*, *Bacillus stearothermophilus*, y de *Methanothermus fervidus*. Sin embargo, las polimerasas que no son termoestables también pueden ser empleadas en ensayos de PCR siempre que la enzima sea reabastecida.

20

25

Si el ácido nucleico molde de GBS es bicatenario, es necesario separar las dos hebras antes de que pueda ser utilizado como molde en PCR. La separación de la hebra se puede lograr por medio de cualquier método de desnaturalización adecuado incluido un medio físico, un medio químico o un medio enzimático. Un método para separar las hebras de ácido nucleico involucra el calentamiento del ácido nucleico hasta que esté predominantemente desnaturado (por ejemplo, una desnaturalización superior al 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95%). Las condiciones de calentamiento necesarias para desnaturar ácido nucleico de molde dependerán, por ejemplo, de la concentración de la sal amortiguadora y de la longitud y composición de nucleótidos de los ácidos nucleicos que están siendo desnaturados, pero típicamente está en el rango desde aproximadamente 90°C hasta aproximadamente 105°C durante un tiempo que depende de las características de la reacción tales como la temperatura y la longitud del ácido nucleico. La desnaturalización típicamente se lleva a cabo aproximadamente entre los 30 segundos y los 4 minutos.

30

35

Si el ácido nucleico bicatenario es desnaturado por calor, se le permita a la mezcla de reacción enfriarse hasta una temperatura que promueva el apareamiento de cada iniciador a su secuencia objetivo sobre el ácido nucleico de GBS. La temperatura para apareamiento es usualmente aproximadamente de 35°C hasta aproximadamente 65°C. Los tiempos de apareamiento pueden ser aproximadamente desde 10 segundos hasta aproximadamente 1 minuto. Se ajusta luego la mezcla de reacción hasta una temperatura a la cual la actividad de la polimerasa es promovida u optimizada, esto es, una temperatura suficiente para que ocurra la extensión desde el iniciador apareado para generar productos complementarios al ácido nucleico del molde. La temperatura debe ser suficiente para sintetizar un producto de extensión de cada iniciador que esté apareado a un molde de ácido nucleico pero no debe ser tan alta para desnaturar un producto de extensión de su molde complementario (por ejemplo, la temperatura de extensión generalmente está en el rango aproximadamente desde 40°C hasta 80°C). Los tiempos de extensión pueden ser aproximadamente desde 10 segundos hasta aproximadamente 5 minutos.

40

45

Los ensayos de PCR pueden emplear ácido nucleico de GBS tal como ADN o ARN, incluido ARN mensajero (ARNm). El molde de ácido nucleico no necesita ser purificado; puede ser una fracción menor de una mezcla compleja, tal como ácido nucleico de GBS contenido en células humanas. El ADN o el ARN pueden ser extraídos de una muestra biológica tal como de una muestra anal y/o vaginal por medio de técnicas de rutina tal como aquellas descritas en *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications* (Persing y colaboradores (eds), 1993, American Society for Microbiology, Washington D.C). Los ácidos nucleicos se pueden obtener de cualquier cantidad de fuentes, tal como plásmidos, o fuentes naturales incluidas bacterias, levaduras, virus, organelos, u organismos superiores tales como plantas o animales.

50

55

Los iniciadores de oligonucleótido se combinan con reactivos de PCR bajo condiciones de reacción que induzcan la extensión del iniciador. Por ejemplo, las reacciones de extensión de la cadena generalmente incluyen KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), MgCl<sub>2</sub> 15 mM, gelatina al 0,001% (p/v), 0,5 - 1,0 µg de ADN de molde desnaturado, 50 pmoles de cada iniciador de oligonucleótido, 2,5 U de Taq polimerasa, y DMSO al 10%). Las reacciones contienen usualmente 150 a 320 µM cada una de dATP, dCTP, dTTP, dGTP, y uno o más análogos de los mismos.

60

Las hebras recientemente sintetizadas de una molécula bicatenaria que pueden ser utilizadas en las etapas sucesivas de la reacción. Las etapas de separación de las hebras, apareamiento, y alargamiento se pueden repetir tan a menudo como se requiera para producir la cantidad deseada de productos de amplificación correspondientes a la molécula objetivo de ácido nucleico de GBS. Los factores limitantes en la reacción son las cantidades de iniciadores, la enzima

65

## ES 2 305 646 T3

termoestable, y los trifosfatos de nucleósido presentes en la reacción. Las etapas de ciclización (esto es, de desnaturación, de apareamiento, y de extensión) se repiten preferiblemente al menos una vez. Para uso en detección, el número de etapas de ciclización dependerá, por ejemplo, de la naturaleza de la muestra. Si la muestra es una muestra compleja de ácidos nucleicos, se requerirán más etapas de ciclización para amplificar la secuencia objetivo, suficientes para detección. Generalmente, las etapas de ciclización se repiten aproximadamente al menos 20 veces, pero se pueden repetir tantas veces como 40, 60 o inclusive 100 veces.

### *Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET)*

La tecnología FRET (ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos. 4.996.143, 5.565.322, 5.849.489 y 6.162.603) se basa en el concepto de que cuando una mitad fluorescente donante y una correspondiente aceptora se ubican dentro de una cierta distancia una de otra, la transferencia de energía tiene lugar entre las dos mitades fluorescentes que pueden ser visualizadas o bien detectadas y/o cuantificadas. Dos sondas de oligonucleótido, cada una conteniendo una mitad fluorescente, pueden hibridar a un producto de amplificación en posiciones particulares determinadas por la complementariedad de las sondas de oligonucleótido con la secuencia de ácido nucleico objetivo de GBS. Por hibridación de las sondas de oligonucleótido con el ácido nucleico del producto de amplificación en las posiciones apropiadas, se genera una señal de FRET. Las temperaturas de hibridación pueden estar en el rango aproximadamente desde 35 hasta aproximadamente 65°C aproximadamente durante 10 segundos hasta aproximadamente 1 minuto.

El análisis de fluorescencia se puede llevar a cabo utilizando, por ejemplo, un sistema de microscopio de epifluorescencia de recuento de fotones (que contiene el espejo dicróico apropiado y filtros para monitoreo de la emisión fluorescente en el rango particular), un sistema fotomultiplicador para recuento de fotones o un fluorómetro. La excitación para iniciar la transferencia de energía se puede llevar a cabo con un láser de ion argón, una lámpara de arco de mercurio (Hg) de alta intensidad, una fuente de luz por fibra óptica, u otra fuente de luz de alta intensidad apropiadamente filtrada para excitación en el rango deseado.

Como se lo utiliza aquí con respecto a las mitades fluorescentes donante y aceptora correspondiente, “correspondiente” se refiere a una mitad fluorescente aceptora que tiene un espectro de emisión que traslapa al espectro de excitación de la mitad fluorescente donante. La longitud de onda máxima del espectro de emisión de la mitad fluorescente aceptora debe ser al menos 100 nm superior a la longitud de onda máxima del espectro de excitación de la mitad fluorescente donante. Por lo tanto, se puede producir allí entre ellas una transferencia eficiente de energía no radioactiva.

Las mitades fluorescentes tanto donante como la aceptora correspondiente se escogen generalmente para (a) transferencia de energía Förster de alta eficiencia; (b) un gran desplazamiento final de Stokes (>100 nm); (c) desplazamiento de la emisión lo más lejos posible dentro de la porción roja del espectro visible (>600 nm); y (d) desplazamiento de la emisión a una longitud de onda más alta que la emisión fluorescente Raman del agua producida por excitación a la longitud de la onda de excitación del donante. Por ejemplo, se puede escoger una mitad fluorescente donante que tenga su máxima excitación cerca de una línea láser (por ejemplo, 442 nm del Helio-Cadmio o 488 nm del Argón), un coeficiente de extinción alto, una alta producción de cuantos, y un buen traslapamiento de su emisión fluorescente con el espectro de excitación de la mitad fluorescente aceptora correspondiente. Se puede escoger una mitad fluorescente aceptora correspondiente que tenga un alto coeficiente de extinción, una alta producción de cuantos, un buen traslapamiento de su excitación con la emisión de la mitad fluorescente donante, y de emisión en la parte roja del espectro visible (>600 nm).

Las mitades fluorescentes donantes representativas que pueden ser utilizadas con diferentes mitades fluorescentes aceptoras en tecnología de FRET incluyen fluoresceína, Amarillo Lucifer, B-ficoeritrina, 9-acridinaisotiocianato, Amarillo Lucifer VS, ácido 4-acetamido-4'-isotio-cianatostilbeno-2,2'-disulfónico, 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcoumarina, succinimidi-dil 1-pirenobutirato, y derivados del ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatostilbeno-2,2'-disulfónico. Las mitades fluorescentes aceptoras representativas, que depende de la mitad fluorescente donante utilizada, incluyen LC<sup>TM</sup>-Red 640, LC<sup>TM</sup>-Red 705, Cy5, Cy5.5, cloruro de sulfonil rodamina B de Lisamina, isotiocianato de tetrametil rodamina, rodamina x isotiocianato, eritrosina isotiocianato, fluoresceína, dietilenetriamina pentaacetato u otros quelatos de iones de Lantánido (por ejemplo, Europio, o Terbio). Las mitades fluorescentes Donante y aceptora se pueden obtener, por ejemplo, de Molecular Probes (Junction City, OR) o de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Las mitades fluorescentes donante y aceptora pueden ser unidas a la sonda apropiada de oligonucleótido a través de un brazo enlazador. La longitud de cada brazo enlazador es importante, ya que los brazos enlazadores afectarán la distancia entre las mitades fluorescentes donante y aceptora. La longitud de un brazo enlazador para los propósitos de la presente invención es la distancia en Angstroms (Å) desde la base del nucleótido hasta la mitad fluorescente. En general, un brazo enlazador es aproximadamente de 10 hasta aproximadamente 25 Å. El brazo enlazador puede ser del tipo descrito en WO 84/03285. WO 84/03285 también divulga métodos para unir brazos enlazadores a una base nucleotídica particular, y también para unir mitades fluorescentes a un brazo enlazador.

Una mitad fluorescente aceptora tal como un LC<sup>TM</sup>-Red 640-NHS-éster puede ser combinada con C6-Fosforamiditas (disponibles con ABI (Foster City, CA) o Glen Research (Sterling, VA)) para producir, por ejemplo, LC<sup>TM</sup>-Red 640-Fosforamidita. Los enlazadores frecuentemente utilizados para acoplar una mitad fluorescente donante tal co-

mo fluoresceína a un oligonucleótido incluyen enlazadores de tiourea (derivados de FITC, por ejemplo, fluoresceína-CPG's de Glen Research o de ChemGene (Ashland, MA)), enlazadores de amida (derivados de fluoresceína-NHS-éster, tales como fluoresceína-CPG de BioGenex (San Ramon, CA)), o 3'-amino-CPG's que requieren acoplamiento de un fluoresceína-NHS-éster después de la síntesis de oligonucleótidos.

#### 5 *Detección de Estreptococos del Grupo B*

La presencia de GBS ha sido detectada por medio de cultivo de organismos así como por análisis rápidos de antígeno. También se han utilizado métodos convencionales de PCR para detectar GBS. La amplificación con base en  
10 PCR convencional es generalmente seguida por transferencia de los productos de amplificación a un soporte sólido y detección utilizando una sonda marcada (por ejemplo, un Southern o un Northern blot). Estos métodos son de trabajo intensivo y frecuentemente requieren más de un día para completarse. Adicionalmente, la manipulación de productos de amplificación con el propósito de detección (por ejemplo, por medio de las manchas) incrementan el riesgo de introducir contaminación y de dar falsos positivos.

15 Por medio de uso de instrumentación para PCR en tiempo real comercialmente disponible (por ejemplo, LightCycler™, Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN), se puede combinar la amplificación por PCR y la detección del producto de amplificación en una cubeta individual cerrada con un tiempo de ciclización dramáticamente reducido. Ya que la detección ocurre en forma concomitante con la amplificación, los métodos de PCR en  
20 tiempo real obvian la necesidad de manipulación del producto de amplificación, y disminuyen el riesgo de contaminación cruzada entre los productos de amplificación. La PCR en tiempo real reduce grandemente el tiempo de respuesta y es una alternativa atractiva para las técnicas convencionales de PCR en el laboratorio clínico.

La presente invención provee métodos para detectar la presencia o la ausencia de GBS en una muestra biológica  
25 de un individuo o en una muestra no biológica. Los métodos suministrados por la invención evitan problemas de contaminación de la muestra, falsos negativos, y falsos positivos. Los métodos incluyen llevar a cabo al menos una etapa de ciclización que incluye la amplificación de una porción de GBS de una molécula de ácido nucleico de *pts* de una muestra, utilizando un par de iniciadores de *pts*. Cada uno de los iniciadores de *pts* se aparea a un objetivo dentro o adyacente a una molécula de ácido nucleico de *pts* de GBS de tal manera que al menos una porción de cada  
30 producto de amplificación contiene una secuencia de ácido nucleico correspondiente a *pts*. Más importante aún, el producto de amplificación debe contener las secuencias de ácido nucleico que son complementarias a las sondas de *pts*. Se produce el producto de amplificación de *pts* siempre que esté presente el ácido nucleico de GBS. Cada etapa de ciclización incluye además poner en contacto a la muestra con un par de sondas de *pts*. De acuerdo con la invención, se marca un miembro de cada par de las sondas de *pts* con una mitad fluorescente donante y la otra es marcada con una  
35 mitad fluorescente aceptora correspondiente. La presencia o la ausencia de FRET entre la mitad fluorescente donante de la primera sonda de *pts* y la mitad fluorescente aceptora correspondiente de la segunda sonda de *pts* se detecta por hibridación de las sondas de *pts* al producto de amplificación de *pts*.

Cada etapa de ciclización incluye una etapa de amplificación y una etapa de hibridación, y cada etapa de ciclización  
40 es usualmente seguida por una etapa de detección de FRET. Se llevan a cabo múltiples etapas de ciclización, preferiblemente en un termociclador. Los métodos de la invención se pueden llevar a cabo utilizando al iniciador de *pts* y al juego de sondas para detectar la presencia de GBS. La detección de FRET en la reacción de *pts* indica la presencia de un GBS.

45 Como se lo utiliza aquí, "amplificación" se refiere al proceso de sintetizar moléculas de ácido nucleico que son complementarias a una o ambas hebras de una molécula molde de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico de *pts* de GBS). La amplificación de una molécula de ácido nucleico incluye típicamente la desnaturalización del molde de ácido nucleico, el apareamiento de los iniciadores con el molde de ácido nucleico a una temperatura por debajo de las temperaturas de fusión de los iniciadores, y el alargamiento enzimático de los iniciadores para generar  
50 un producto de amplificación. La amplificación típicamente requiere de la presencia de trifosfatos de desoxirribonucleósidos, una enzima de ADN polimerasa (por ejemplo, Platinum® Taq) y un amortiguador apropiado y/o cofactores para actividad óptima de la enzima polimerasa (por ejemplo, MgCl<sub>2</sub> y KCl).

Si ocurre la amplificación de ácido nucleico de GBS y se produce el producto de amplificación, la etapa de hibridación  
55 resulta en una señal detectable con base en FRET entre las membranas del par de sondas. Como se lo utiliza aquí, "hibridación" se refiere al apareamiento de sondas con un producto de amplificación. Las condiciones de hibridación típicamente incluyen una temperatura que está por debajo de la temperatura de fusión de las sondas, pero que evita la hibridación no específica de las sondas.

60 Generalmente, la presencia de FRET indica la presencia de GBS en la muestra, y la ausencia de FRET indica la ausencia de GBS en la muestra. La inadecuada recolección del espécimen, los retrasos en el transporte, las condiciones inapropiadas de transporte, o el uso de ciertos hisopos para recolección (alginato de calcio o mango de aluminio) son todas condiciones que pueden sin embargo, afectar el éxito y/o la precisión del resultado de una prueba. Utilizando los métodos divulgados aquí, la detección de FRET dentro de etapas de 45 ciclos es indicativa de una infección con GBS.

65 Los métodos de la invención también pueden ser utilizados para estudios de la eficacia de la vacuna de GBS o para estudios de epidemiología. Por ejemplo, una GBS atenuada en una vacuna de ántrax puede ser detectada utilizando los métodos de la invención durante el tiempo cuando la bacteria está aún presente en un individuo. Para tales estudios de

la eficacia de una vacuna, se pueden utilizar los métodos de la invención para determinar, por ejemplo, la persistencia de una cepa atenuada de GBS usada en una vacuna, o se pueden llevar a cabo junto con un ensayo adicional tal como un ensayo serológico para monitorear la respuesta inmune de un individuo a tal vacuna. Además, se pueden utilizar los métodos de la invención para distinguir una cepa de GBS de otra para estudios de epidemiología, por ejemplo, del origen o severidad de un brote de GBS.

Las muestras biológicas representativas que pueden ser utilizadas para practicar los métodos de la invención incluyen frotis dérmico, fluido cerebroespinal, sangre, esputo, lavado bronco-alveolar, aspirados bronquiales, tejido de pulmón y heces. Los métodos de recolección y almacenamiento de muestras biológicas son conocidos por aquellos capacitados en el arte. Las muestras biológicas pueden ser procesadas (por ejemplo, por medio de métodos de extracción de ácido nucleico y/o de kits conocidos en el estado del arte) para liberar al ácido nucleico de GBS o en algunos casos, se puede poner en contacto a la muestra biológica directamente con los componentes de la reacción PCR y los oligonucleótidos apropiados.

Las muestras biológicas pueden ser cultivadas en un medio adecuado para crecimiento de GBS. El medio de cultivo puede ser analizado entonces por la presencia o ausencia de GBS utilizando los métodos de la invención como se describió aquí. Por ejemplo, las muestras que llegan a un laboratorio clínico para detección de GBS utilizando los métodos de la invención, pueden estar en la forma de un cultivo líquido que ha sido inoculado con una muestra biológica de un individuo.

El análisis de la curva de fusión es una etapa adicional que puede ser incluida en un perfil de ciclización. El análisis de la curva de fusión se basa en el hecho de que los fundidos de ADN a una temperatura característica llamada la temperatura de fusión ( $T_m$ ), que es definida como la temperatura a la cual la mitad de los dobletes de ADN se ha separado en las hebras individuales. La temperatura de fusión de un ADN depende principalmente de su composición de nucleótidos. De esta forma, las moléculas de ADN ricas en nucleótidos G y C tienen  $T_m$  más alto que aquellas que tienen una abundancia de nucleótidos A y T. Por medio de la detección de la temperatura a la cual se pierde la señal, se puede determinar la temperatura de fusión de las sondas. En forma similar, por medio de la detección de la temperatura a la cual se genera la señal, se puede determinar la temperatura de apareamiento de las sondas. La(s) temperatura(s) de fusión de las sondas de *pts* del producto de amplificación de *pts* puede(n) confirmar la presencia o la ausencia de GBS en la muestra.

Dentro de cada corrida del termociclador, se ciclizan también las muestras de control. Las muestras de control positivo pueden amplificar un molde de control de ácido nucleico de GBS (diferente de *pts*) utilizando, por ejemplo, iniciadores de control y sondas de control. Las muestras de control positivo pueden amplificar también, por ejemplo, una construcción de plásmido que contiene moléculas de ácido nucleico de *pts* de GBS. Tal plásmido de control puede ser amplificado internamente (por ejemplo, dentro de la muestra) o en una muestra separada que corre al mismo tiempo con las muestras de los pacientes. Cada corrida del termociclador debe incluir también un control negativo que, por ejemplo, carece del ADN molde de GBS. Tales controles son indicadores del éxito o del fracaso de la amplificación, hibridación y/o reacción de FRET. Por lo tanto, las reacciones de control pueden determinar fácilmente, por ejemplo, la habilidad de los iniciadores para aparearse con especificidad a la secuencia y para iniciar el alargamiento, así como la habilidad de las sondas para hibridar con especificidad a la secuencia y para que ocurra FRET.

En una modalidad, los métodos de la invención incluyen etapas para evitar la contaminación. Por ejemplo, se describe un método enzimático que utiliza uracil-ADN glicosilasa en las patentes estadounidenses Nos. 5.035.996, 5.683.896 y 5.945.313 para reducir o eliminar la contaminación entre una corrida de termociclador y la siguiente. Además, son deseables las prácticas y procedimientos estándar de contención de laboratorio cuando se llevan a cabo los métodos de la invención. Las prácticas y procedimientos de contención incluyen, pero no se limitan a, áreas de trabajo separadas para diferentes etapas de un método, campanas de contención, puntas de pipeta con filtros de barrera y pipetas dedicadas por desplazamiento de aire. Las prácticas y los procedimientos consistentes de contención por parte del personal son necesarios para lograr precisión en el manejo en un laboratorio de diagnóstico de muestras clínicas.

Los métodos convencionales de PCR junto con tecnología FRET pueden ser utilizados para llevar a cabo los métodos de la invención. En una modalidad, se utiliza un instrumento LightCycler™. Una descripción detallada del Sistema LightCycler™ y de monitoreo en línea y en tiempo real de la PCR puede ser encontrada en <http://biochem.roche.com/lihtcycler>. Las siguientes solicitudes de patente describen una PCR en tiempo real como la utilizada en la tecnología LightCycler™: WO 97/46707, WO 97/46714 y WO 97/46712. El instrumento LightCycler™ es un termociclador rápido combinado con un fluorómetro de microvolumen utilizando óptica de alta calidad. Esta técnica de termociclado rápido utiliza cubetas de vidrio delgado como recipientes de reacción. El calentamiento y el enfriamiento de la cámara de reacción se controlan alternando aire calentado y aire a temperatura ambiente. Debido a la baja masa de aire y a la alta proporción de área superficial para el volumen de las cubetas, se pueden lograr velocidades muy rápidas de intercambio de temperatura dentro de la cámara térmica LightCycler™. La adición de colorantes fluorescentes seleccionados a los componentes de la reacción permiten que la PCR sea monitoreada en tiempo real y en línea. Además, las cubetas sirven como un elemento óptico para la recolección de señales (similar a la óptica de la fibra de vidrio), concentrando la señal en la parte superior de la cubeta. El efecto es una iluminación eficiente y un monitoreo de la fluorescencia de las muestras de microvolumen.

## ES 2 305 646 T3

El carrusel del LightCycler™ que alberga a las cubetas puede ser removido del instrumento. Por lo tanto, las muestras pueden ser cargadas por fuera del instrumento (en un Cuarto Limpio para PCR, por ejemplo). Además, esta característica permite que el carrusel para muestras pueda ser limpiado y esterilizado en forma fácil. El fluorómetro, como parte del aparato LightCycler™, alberga la fuente de luz. La luz emitida es filtrada y enfocada por medio de una lente de epi-iluminación sobre la parte superior de la cubeta. La luz fluorescente emitida desde la muestra es luego enfocada por medio de la misma lente, pasada a través de un espejo dicróico, filtrada apropiadamente, y enfocada sobre fotohíbridos para recolección de datos. La unidad óptica actualmente disponible en el instrumento LightCycler™ (Roche Molecular Biochemicals, Catálogo No. 2011468) incluye tres filtros de paso de banda (350 nm, 640 nm, y 710 nm), proveyendo detección de tres colores y varias opciones de adquisición de fluorescencia. Las opciones de recolección de datos incluyen el monitoreo una vez por etapa de ciclización, adquisición completamente continua de una muestra única para análisis de la curva de fusión, muestreo continuo (en el cual la frecuencia de muestreo depende del número de la muestra) y/o la medición gradual de todas las muestras después de un intervalo definido de temperatura.

El LightCycler™ puede ser operado utilizando una estación de trabajo de un PC y puede utilizar un sistema operativo Windows NT. Las señales de las muestras se obtienen en la medida en que la máquina posiciona los capilares secuencialmente sobre la unidad óptica. El software puede mostrar las señales de fluorescencia en tiempo real inmediatamente después de cada medición. El tiempo de adquisición de fluorescencia es de 10 - 100 milisegundos (ms). Después de cada etapa de ciclización, se puede actualizar continuamente una visualización cuantitativa de la fluorescencia versus el número de ciclos para todas las muestras. Los datos generados se pueden almacenar para análisis adicionales.

Como una alternativa para FRET, se puede detectar un producto de amplificación utilizando un colorante para enlazamiento del ADN bicatenario tal como un colorante fluorescente de enlazamiento del ADN (por ejemplo, SYBRGreen® o SYBRGold® (Molecular Probes)). Por interacción con el ácido nucleico bicatenario, tales colorantes fluorescentes para enlazamiento del ADN emiten una señal de fluorescencia después de excitación con luz a una longitud de onda adecuada. Un colorante para enlazamiento del ADN bicatenario tal como un ácido nucleico que intercala al colorante, puede ser también utilizado. Cuando se utilizan colorantes para enlazamiento del ADN bicatenario, se realiza usualmente un análisis de la curva de fusión para la confirmación de la presencia del producto de amplificación.

Como se describió aquí, también se pueden detectar los productos de amplificación utilizando sondas marcadas de hibridación que toman ventaja de la tecnología de FRET. Un formato común de la tecnología de FRET utiliza dos sondas de hibridación. Cada sonda puede ser marcada con una mitad fluorescente diferente y son generalmente diseñadas para hibridar en forma muy próxima entre sí en una molécula de ADN objetivo (por ejemplo, un producto de amplificación). Una mitad fluorescente donante, por ejemplo, fluoresceína, es excitada a 470 nm por medio de una fuente de la fuente de luz del instrumento LightCycler™. Durante la FRET, la fluoresceína transfiere su energía a una mitad fluorescente aceptora tal como LightCycler™-Red 640 (LC™-Red 640) o LightCycler™-Red 705 (LC™-Red 705). La mitad fluorescente aceptora que emite luz de una longitud de onda más larga, que es detectada por un sistema de detección óptico del instrumento LightCycler™. La FRET eficiente únicamente tiene lugar cuando las mitades fluorescentes están en una proximidad local directa y cuando el espectro de emisión de la mitad fluorescente donante traslapa con el espectro de absorción de la mitad fluorescente aceptora. La intensidad de la señal emitida puede ser correlacionada con el número de moléculas originales de ADN objetivo (por ejemplo, el número de genomas de GBS).

Otro formato de FRET utiliza tecnología TaqMan® para detectar la presencia o la ausencia de un producto de aplicación, y por lo tanto, la presencia o la ausencia de GBS. La tecnología TaqMan® utiliza una sonda de hibridación monocatenaria marcada con dos mitades fluorescentes. Cuando se excita una primera mitad fluorescente con luz de una longitud de onda adecuada, la energía absorbida es transferida a una segunda mitad fluorescente de acuerdo con los principios de la FRET. La segunda mitad fluorescente es generalmente una molécula apagadora. Durante la etapa apareamiento de la reacción de la PCR, la sonda de hibridación marcada enlaza al ADN objetivo (esto es, el producto de amplificación) y es degradada por medio de la actividad de la exonucleasa 5' a 3' de la Taq Polimerasa durante la fase subsiguiente de alargamiento. Como resultado, la mitad fluorescente excitada y la mitad apagadora se separan espacialmente una de otra. Como consecuencia, por excitación de la primera mitad fluorescente en ausencia del apagador, se puede detectar la emisión de fluorescencia de la primera mitad de fluorescencia. A manera de ejemplo, un Sistema de Detección de Secuencia ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) utiliza tecnología TaqMan®, y es adecuado para realizar los métodos descritos aquí para detectar GBS. La información sobre amplificación y detección de la PCR utiliza un sistema ABI PRISM® 7700 puede ser encontrada en <http://www.appliedbiosystems.com/products>.

Las guías moleculares junto con FRET también pueden ser utilizadas para detectar la presencia de un producto de amplificación utilizando los métodos de PCR en tiempo real de la invención. La tecnología de guías moleculares utiliza una sonda de hibridación marcada como una primera mitad fluorescente y una segunda mitad fluorescente. La segunda mitad fluorescente es generalmente un apagador, y las marcas de fluorescencia se localizan típicamente en cada extremo de la sonda. La tecnología de guías moleculares utiliza un oligonucleótido como sonda que tiene secuencias que permiten la formación de una estructura secundaria (por ejemplo, una horquilla). Como resultado de la formación de la estructura secundaria dentro de la sonda, ambas mitades fluorescentes están en proximidad espacial cuando la sonda está en solución. Después de hibridación a los ácidos nucleicos objetivo (esto es, productos de amplificación), se rompe la estructura secundaria de la sonda y las mitades fluorescentes se separan una de la otra de tal manera que después de la excitación con luz de una longitud de onda adecuada, se puede detectar la emisión de la primera mitad fluorescente.

Se entiende que la presente invención no está limitada por la configuración de uno o más instrumentos comercialmente disponibles.

Artículos de fabricación

La invención provee además artículos de fabricación para detectar GBS. Un artículo de fabricación de acuerdo con la presente invención incluye iniciadores y sondas como se definió anteriormente y se los utiliza para detectar GBS, opcionalmente junto con materiales de empaque adecuados. Los iniciadores y las sondas representativas para detección de GBS son capaces de hibridar a las moléculas de ácido nucleico de pts de GBS. Los métodos para diseñar iniciadores y sondas son divulgados aquí, y se proveen iniciadores y sondas representativos que amplifican e hibridan a las moléculas de ácido nucleico de pts de GBS.

Los artículos de fabricación de la invención también incluyen una o más mitades fluorescentes para marcar a las sondas o, alternativamente, se pueden marcar las sondas suministradas con el kit. Por ejemplo, un artículo de fabricación puede incluir una mitad fluorescente donante para marcar a una de las sondas de pts y una mitad fluorescente aceptora para marcar a las otras sondas de pts, respectivamente. Los ejemplos de mitades fluorescentes donantes adecuadas de FRET y las mitades fluorescentesceptoras correspondientes son proveídas mas arriba.

Los artículos de fabricación de la invención pueden contener también un inserto dentro del paquete o marca sobre el paquete que tiene instrucciones sobre él para utilizar a los iniciadores y las sondas de pts para detectar GBS en una muestra. Los artículos de fabricación pueden incluir adicionalmente reactivos para llevar a cabo los métodos divulgados aquí (por ejemplo, amortiguadores, enzimas de polimerasa, cofactores, o agentes para evitar la contaminación). Tales reactivos pueden ser específicos para uno de los instrumentos comercialmente disponibles descritos aquí.

La invención será descrita adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1

Detección con el LightCycler de Streptococos del Grupo B

Se utilizó un ensayo con un LightCycler para detectar patógenos bacterianos de estreptococos del grupo B (GBS) de frotis vaginal/anal. Se utilizó una región conservada del gen de la fosfotransferasa (pts) de GBS como un objetivo para la detección por el ensayo de la PCR.

Las secuencias del iniciador fueron las siguientes: iniciador 1: 5'-TGA GAA GGC AGT AGA AAG CTT AG-3' (SEQ ID NO: 1); e iniciador 2: 5'-TGC ATG TAT GGG TTA TCT TCC-3' (SEQ ID NO: 2). Las secuencias de la sonda y de las etiquetas fueron las siguientes: sonda 1: 5'-CAA ATT AAA GAG ACT ATT CGT GCA A-fluoresceína-3' (SEQ ID NO: 3); y sonda 2: 5'-LCRed640-CAA GTA AAT GCA GAA ACA GG-fosfato-3' (SEQ ID NO: 4).

Los iniciadores fueron ajustados a 50 µM midiendo la A<sub>260</sub> de una dilución 1/50 (196 µl de agua + 4 µl, Factor de Dilución (DF) = 50). Se estimó la concentración por medio de la siguiente fórmula:

$$((\mu\text{M encontrada}/50) \times \mu\text{l restante}) - \mu\text{l restante} = \text{agua para añadir}$$

Se disolvieron las sondas en TE' hasta una concentración de 20 µM (suministrada con las sondas y resuspendidas de acuerdo con las instrucciones del fabricante). La concentración de los oligonucleótidos y del colorante fue chequeada dos veces por medio de absorción UV utilizando las siguientes ecuaciones de Biochemica, 1999, 1:5-8:

$$[\text{colorante}] = \frac{A_{\text{colorante}}}{E_{\text{colorante}}} \quad [\text{oligo}] = \frac{A_{260} - \left( A_{260} \times \frac{E_{260(\text{col.})}}{E_{\text{col.}}} \right)}{10^6} \text{ nmol}/A_{260}$$

Colorante	Absorbancia			Emisión
	Abs max. (nm)	E <sub>colorante</sub> (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	E <sub>260(colorante)</sub> (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	Max. (nm)
Fluoresceína	494	68.000	2.000	524
LC Red 640	622	110.000	31.000	638

## ES 2 305 646 T3

La Tabla 1 muestra la Mezcla de Reacción para la PCR

Ingrediente	Concentración Patrón	$\mu\text{l}$
Agua		11
$\text{MgCl}_2$	50 mM	1,2
LC-FS-DNAMHP*	10X	2
Iniciador 1	25 mM	0,24
Iniciador 2	25 mM	0,24
Sonda de Fluoresceína	20 $\mu\text{M}$	0,2
Sonda Red640	20 $\mu\text{M}$	0,2
Volumen Total		15
* LC-FS-DNA MHP=LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes (Roche, Catálogo No. 3003248)		

Se mezclaron 5  $\mu\text{l}$  de la muestra de frotis con 15  $\mu\text{l}$  de la Mezcla de Reacción de la PCR y se añadió a la cubeta del LightCycler para termociclado. Se amplificaron las muestras por PCR y se detectaron los productos en un instrumento LightCycler (Roche Applied Science, catálogo 2011468). El procedimiento de ciclización utilizado para la PCR es mostrado en la Tabla 2.

TABLA 2

Programa de la PCR	Ciclos	Tiempo de Permanencia (segundos)	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Pendiente ( $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ )	Adquisición de la señal
Inicial	1	600	95	20	Ninguna
PCR	45	10	95	20	Ninguna
		15	55	20	Sencilla
		15	72	20	Ninguna
Análisis de la curva de fusión	1	0	95	20	Ninguna
		20	59	20	Ninguna
		20	45	0,2	Ninguna
		0	85	0,2	Continua
Enfriar	1	10	40	20	Ninguna

Se analizó la señal detectada en el canal de 640 nm del instrumento LightCycler. El análisis de la curva de fusión, realizada después de la amplificación de la PCR, fue utilizado para confirmar la detección de GBS. Las muestras positivas para GBS demuestran un  $T_m$  de  $58^{\circ}\text{C}$  más o menos  $2^{\circ}\text{C}$ , y fueron comparadas directamente con el control positivo. Las muestras negativas no tuvieron curva de fusión.

Se produjeron controles de plásmido por medio de la clonación del producto de *pts* amplificado por medio del iniciador de *pts* dentro de un plásmido (TA Cloning<sup>®</sup> Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA). Se utilizó al plásmido que contiene al inserto objetivo para determinar la sensibilidad analítica de los ensayos. La concentración de plásmido o el número de copia del inserto del gen objetivo se determinó con la siguiente fórmula:

$$\text{DS ADN, } A_{260} \text{ para las moléculas/}\mu\text{l}$$

## ES 2 305 646 T3

Dado:

1.

$$(A_{260} \times \text{Factor de Dilución})/20 = \text{mg/ml} = \mu\text{g}/\mu\text{l DS ADN}$$

$$1 \ A_{260} = 50 \ \mu\text{g/ml}$$

$$1 \ A_{260} (50) = \mu\text{g/ml}$$

$$1 \ A_{260} (50)/1000 = \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

2.

$$(6,02 \times 10^{23} \text{ moléculas/mol}) / (10^{12} \text{ pmol/mol}) = 6,02 \times 10^{11} \text{ moléculas/pmol}$$

3. Pares de bases de ADN por molécula = N

Entonces:

$$(A_{260} \times \text{DF})/20 \ \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10^6 \ \text{pg}/\mu\text{g} \times 1 \ \text{pmol}/660 \ \text{pg} \times 1/\text{N} \times 6,02 \times 10^{11} \ \text{moléculas}/\text{pmol} = \text{moléculas}/\mu\text{l}$$

Cálculo abreviado:

$$(A_{260} \times \text{DF})/20 \times (9,12 \times 10^{14} / \text{N}) = \text{moléculas}/\mu\text{l}$$

### Ejemplo 2

#### *Especificidad del Ensayo con el LightCycler de GBS*

El ADN extraído de los cultivos de una variedad de organismos diferentes fue utilizado para determinar si el ensayo de GBS reaccionaría en forma cruzada con organismos que no son GBS. Los organismos similares a GBS fueron analizados así como los organismos comúnmente encontrados en una muestra de frotis anal o vaginal. La Tabla 3 muestra organismos similares analizados y los resultados. La Tabla 4 muestra a los otros especímenes analizados y esos resultados.

(Tabla pasa a página siguiente)

## ES 2 305 646 T3

TABLA 3

Organismo	Grupo Lancefield	Fuente		Ensayo LC
		ATCC	Otra	
<i>S. pyogenes</i>	A	19615		Neg
<i>S. agalactiae</i>	B		CAPXL36	Pos
<i>S. suis</i>		43765		Neg
<i>L. lactis</i>		19435		Neg
<i>S. equi ss equi</i>	C	33398		Neg fusión 51°C
<i>S. uberis</i>		19436		Neg
<i>S. canis</i>	G	43496		Neg fusión 51°C
<i>E. faecium</i>			CAP-D-18-83	Neg
<i>S. bovis</i>			CAP-D-16-83	Neg
<i>E. faecalis</i>		29212		Neg
<i>S. dysgalactiae</i>	C	43078		Neg fusión 51°C
<i>S. salivarius</i>		7073		Neg
<i>S. equinus</i>		9812		Neg
<i>S. pneumoniae</i>		49619		Neg
<i>S. porciuns</i>		43138		Neg
<i>S. iniae</i>		29178		Neg
<i>S. anginosus</i>		33397		Neg
<i>S. MG-intermedius</i>			CAP-D-17-87	Neg
Group F strep	F		SCB-21-89	Neg
<i>S. sanguis</i>			SCB-33-83	Neg
<i>S. mitis</i>		49456		Neg
<i>S. oralis</i>		35037		Neg
<i>S. gordonii</i>		10558		Neg
<i>S. mutans</i>			Cepa QC-Mayo	Neg
<i>S. intermdius</i>		27335		Neg
<i>S. anginosus</i>		33397		Neg

ES 2 305 646 T3

TABLA 4

Respiratoria

	Organismo	Fuente	Resultado por LC
5	<i>Acinetobacter baumannii</i>	paciente aislado	Neg
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Cepa QC	Neg
10	<i>Aeromonas hydrophilia</i>	CAP-D-1-82	Neg
	<i>Bordetella bronchioseptica</i>	paciente aislado	Neg
	<i>Bordetella parapertussis</i>	ATCC 15311	Neg
15	<i>Campylobacter jejuni</i>	CDC-AB2-C 15-82	Neg
	<i>Corynebacterium</i> ( <i>Archanobacterium</i> )		Neg
	<i>haemolyticum</i>	paciente aislado	
20	<i>Corynebacterium diptheriae</i>	SCB-25-86	Neg
	<i>Corynebacterium</i> <i>pseudodiptheriae</i>	NY-4-88	Neg
25	<i>Escherichia coli</i>	paciente aislado	Neg
	ADN Humano	ATCC 49766	Neg
	<i>Haemophilus influenza</i>	paciente aislado	Neg
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	células MRC-5	Neg
30	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	paciente aislado	Neg
	<i>Legionella jordanis</i>	ATCC 33623	Neg
	<i>Legionella pneumophila</i>	ATCC 33152	Neg
35	<i>Listeria monocytogenes</i>	paciente aislado	Neg
	<i>Moraxella catarrhalis</i>	paciente aislado	Neg
	<i>Morganella morganii</i>	CAP-D-S-79	Neg
40	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	paciente aislado	Neg
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	paciente aislado	Neg
	<i>Neisseria meningitidis</i>	paciente aislado	Neg
	<i>Proteus vulgaris</i>	paciente aislado	Neg
45	<i>Pseudomonas cepacia</i>	paciente aislado	Neg
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	paciente aislado	Neg
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Neg
50	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	paciente aislado	Neg
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	SOB-33-77	Neg
	<i>Citrobacter freundii</i>	paciente aislado	Neg
55	<i>Bordetella bronchioseptica</i>	ATCC 19395	Neg

60

65

ES 2 305 646 T3

Panel de material fecal			
Organismo	Fuente	Análisis por LC	
5	<i>Actinomyces pyogenes</i>	clínica	Neg
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	CAP-D-1-82	Neg
	<i>Bacteroides distasonis</i>	ATCC 8503	Neg
	<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC 25285	Neg
10	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	ATCC 29741	Neg
	<i>Bacteroides vulgatus</i>	ATCC 29327	Neg
	<i>Citrobacter freundii</i>	clínica	Neg
15		ATCC 13124	Neg
	<i>Clostridium perfringens</i>	C1417	
	<i>E. coli</i> O70:K:H42	ATCC 23533	Neg
	<i>Enterobacter cloacae</i>	clínica - 1004	Neg
20	<i>Enterococcus faecalis</i>	clínica V583	Neg
	<i>Enterococcus faecium</i>	clínica B7641	Neg
	<i>Escherichia hermannii</i>	clínica	Neg
25	<i>Escherichia vulneris</i>	clínica	Neg
	<i>Eubacterium lentum</i>	ATCC 43055	Neg
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	ATCC 25559	Neg
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603	Neg
30	<i>Proteus mirabilis</i>	Cepa QC	Neg
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Neg
Panel Genital-Urinario			
Organismo	Fuente	Resultado por LC	
35	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	clínica	Neg
	<i>Candida albicans</i>	clínica	Neg
40	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	clínica	Neg
	<i>Corynebacterium pseudotubercuolsis</i>	ATCC 10700	Neg
	<i>Gardnerella vaginalis</i>	clínica	Neg
45	<i>Mobiluncus curtissi</i>	clínica	Neg
	<i>Mycoplasma</i>	clínica	Neg
	<i>Neisseria lactamica</i>	clínica	Neg
50	<i>Peptostreptococcus magnus</i>	clínica	Neg
	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	clínica	Neg
	<i>Prevotella bivia</i>	clínica	Neg
55	<i>Ureoplasma</i>	clínica	Neg

Ejemplo 3

60 *Sensibilidad Analítica del Ensayo con el LightCycler*

Se detectaron solamente 5 copias del ADN objetivo de GBS por reacción, por medio del ensayo con el LightCycler de GBS.

65

## ES 2 305 646 T3

### Ejemplo 4

#### *Sensibilidad Clínica del Ensayo con el LightCycler*

5 Antes de la tecnología con el LightCycler, se cultivó es estándar dorado para detección de GBS. Los resultados del cultivo de los especímenes de frotis vaginal/anal de mujeres, recolectados durante la semana 35 a 37 del embarazo fueron comparados con el análisis de GBS con un LightCycler.

10

Cultivo			
LC	Presente	Ausente	Totales
Positivo	37	4	41
Negativo	0	134	134
15 Totales	37	138	175

20 Los resultados más abajo se calcularon utilizando el software StatsDirect versión 1.9.15 (StatsDirect Ltd, Cheshire, Reino Unido) e incluyen intervalos de confianza del 95% (mostrados entre paréntesis). Una explicación de los valores mostrados más abajo y de cómo se calculan estos valores puede ser encontrada en <http://www.musc.edu/dc/icrebm/sensitivity.html>.

25

Enfermedad			
		Presente	Ausente
<u>Prueba</u>	+	a (verdadero)	b (falso)
	-	c (falso)	d (verdadero)

30 Prevalencia (porcentaje de pacientes afectados analizados; [a+c/d]):

21,14% (15,34% a 27,95%)

35 Valor predictivo positivo (porcentaje de pacientes con prueba positiva que tienen la enfermedad; [a/a+b]):

90,24% (76,87% a 97,28%)

40 Valor predictivo negativo (porcentaje de pacientes con prueba negativa sin la enfermedad; [d/d+c]):

100% (97,28% a \*%)

45 Sensibilidad (positivos verdaderos detectados para los pacientes afectados totales analizados; [a/a+c]):

100% (90,51% a \*%)

50 Especificidad (negativos verdaderos para los pacientes no afectados analizados; [d/b+d]):

97,1% (92,74% a 99,2%)

#### 55 *Otras modalidades*

60 Se debe entender que mientras que la invención ha sido descrita junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que está definida por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas, y modificaciones están dentro del alcance de las reivindicaciones siguientes.

#### **Referencias citadas en la descripción**

65 Este listado de referencias citado por el solicitante es únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento europeo de la patente. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación, no se pueden excluir los errores o las omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad en este sentido.

## ES 2 305 646 T3

### Documentos de patente citados en la descripción

- WO 03025216 A [0006]
- US 4996143 A [0041]
- 5 • US 6593093 B [0007]
- US 5565322 A [0041]
- WO 03093306 A [0008]
- US 5849489 A [0041]
- 10 • WO 0234771 A [0008] [0008]
- US 6162603 A [0041]
- WO 02092818 A [0009]
- WO 8403285 A [0046] [0046]
- WO 0037646 A [0010]
- US 5035996 A [0060]
- 15 • US 5580859 A [0033]
- US 5683896 A [0060]
- US 5589466 A [0033]
- US 5945313 A [0060]
- 20 • US 4683202 A [0034]
- WO 9746707 A [0061]
- US 4683195 A [0034]
- WO 9746714 A [0061]
- US 4800159 A [0034]
- WO 9746712 A [0061]
- 25 • US 4965188 A [0034]

### Literatura citada en la descripción que no es de patente

- **KE D** y colaboradores, *Clin Chem.*, 2000, vol. 46 (3), 324-331 [0005]
- 30 • **BERGERON**. *N Engl J Med.*, 2000, vol. 343 (3), 175-179 [0005]
- Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications. American Society for Microbiology, 1993 [0038]
- 35 • *Biochemica*, 1999, vol. 1, 5-8 [0076]

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar la presencia o la ausencia de Estreptococos del Grupo B (GBS) en una muestra biológica de un individuo, dicho método comprendiendo:

llevar a cabo al menos una etapa de ciclización, en donde una etapa de ciclización comprende una etapa de amplificación y una etapa de hibridación, en donde dicha etapa de amplificación comprende poner en contacto a dicha muestra con un par de iniciadores de *pts* para producir un producto de amplificación de *pts* si está presente una molécula de ácido nucleico de *pts* de GBS en dicha muestra, en donde dicha etapa de hibridación comprende poner en contacto a dicha muestra con un par de sondas de *pts*, en donde una de las sondas de *pts* está marcada con una mitad fluorescente donante y la otra sonda de *pts* está marcada con una mitad fluorescente aceptora correspondiente; y

detectar la presencia o la ausencia de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) entre dicha mitad fluorescente donante y dicha mitad fluorescente aceptora de dicha sonda de *pts*.

(i) en donde la presencia o la ausencia de fluorescencia es indicativa de la presencia o la ausencia de GBS en dicha muestra, y

(ii) en donde dicho par de iniciadores de *pts* comprende un primer iniciador de *pts* y un segundo iniciador de *pts*, en donde dicho primer iniciador de *pts* comprende la secuencia 5'-TGA GAA GGC AGT AGA AAG CTT AG-3' (SEQ ID NO: 1), y en donde dicho segundo iniciador de *pts* comprende la secuencia 5'-TGC ATG TAT GGG TTA TCT TCC-3' (SEQ ID NO: 2); o

en donde dicho par de sondas de *pts* comprende una primera sonda de *pts* y una segunda sonda de *pts*, en donde dicha primera sonda de *pts* comprende la secuencia 5'-CAA ATT AAA GAG ACT ATT CGT GCA A-3' (SEQ ID NO: 3), y en donde dicha segunda sonda de *pts* comprende la secuencia 5'-CAA GTA AAT GCA GAA ACA GG-3' (SEQ ID NO: 4).

2. El método de la reivindicación 1, en donde dicha amplificación emplea una enzima polimerasa que tiene actividad de exonucleasa de 5' a 3'.

3. El método de la reivindicación 2, en donde dicha primera y segunda mitades fluorescentes están dentro de no más de 5 nucleótidos de cada uno de los otros sobre dicha sonda.

4. El método de la reivindicación 3, en donde dicha segunda mitad fluorescente es un apagador.

5. El método de la reivindicación 1, en donde dicha sonda de *pts* comprende una secuencia de ácido nucleico que permite la formación de una estructura secundaria, en donde, dicha formación de una estructura secundaria resulta en una proximidad espacial entre dicha primera y dicha segunda mitades fluorescentes.

6. El método de la reivindicación 5, en donde dicha segunda mitad fluorescente es un apagador.

7. El método de la reivindicación 1, en donde los miembros de dicho par de sondas de *pts* hibridan dentro de no más de cinco nucleótidos de cada uno de los otros, en donde dicha primera sonda de *pts* de dicho par de sondas de *pts* está marcada con una mitad fluorescente donante y dicha segunda sonda de *pts* de dicho par de sondas de *pts* está marcada con una mitad fluorescente aceptora correspondiente; y en donde la presencia de FRET es indicativa de la presencia de GBS en dicha muestra, y en donde la ausencia de FRET es indicativa de la ausencia de GBS en dicha muestra.

8. El método de la reivindicación 7, en donde los miembros de dicho par de sondas de *pts* hibridan dentro de no más de dos nucleótidos de cada uno de los otros.

9. El método de la reivindicación 7, en donde los miembros de dicho par de sondas de *pts* hibridan dentro de no más de un nucleótido de cada uno de los otros.

10. El método de la reivindicación 7, en donde dicha mitad fluorescente donante es fluoresceína.

11. El método de la reivindicación 7, en donde dicha mitad fluorescente aceptora correspondiente es seleccionada del grupo que consiste de LC-Red 640, LC-Red 705, Cy5, y Cy5.5.

12. El método de la reivindicación 7, en donde dicha etapa de detección comprende excitar a dicha muestra a una longitud de onda absorbida por dicha mitad fluorescente donante y visualizar y/o medir la longitud de onda emitida por dicha mitad fluorescente aceptora.

13. El método de la reivindicación 7, en donde dicha detección comprende cuantificar dicha FRET.

## ES 2 305 646 T3

14. El método de la reivindicación 7, en donde dicha etapa de detección se lleva a cabo después de cada etapa de ciclización.
15. El método de la reivindicación 7, en donde dicha etapa de detección se lleva a cabo en tiempo real.
16. El método de la reivindicación 7, que comprende además determinar la temperatura de fusión entre una o ambas de dichas sonda(s) de *pts* y dicho producto de amplificación de *pts*, en donde dicha temperatura de fusión confirma dicha presencia o dicha ausencia de dicho GBS.
17. El método de la reivindicación 7, en donde la presencia de dicha FRET dentro de etapas de 45 ciclos es indicativa de la presencia de una infección de GBS en dicho individuo.
18. El método de la reivindicación 7, en donde la presencia de dicha FRET dentro de etapas de 40 ciclos es indicativa de la presencia de una infección de GBS endicho individuo.
19. El método de la reivindicación 7, en donde la presencia de dicha FRET dentro de etapas de 30 ciclos es indicativa de la presencia de una infección de GBS endicho individuo.
20. El método de la reivindicación 7, que comprende además: prevenir la amplificación de un ácido nucleico concomitante.
21. El método de la reivindicación 20, en donde dicha prevención comprende llevar a cabo dicha etapa de amplificación en presencia de uracilo.
22. El método de la reivindicación 21, en donde dicha prevención comprende además tratar dicha muestra con uracil-ADN glicosilasa antes de una primera etapa de amplificación.
23. El método de la reivindicación 7, en donde dicha muestra biológica es seleccionada del grupo que consiste de frotis anal y/o vaginal.
24. El método de la reivindicación 7, en donde dicha etapa de ciclización se lleva a cabo sobre una muestra de control.
25. El método de la reivindicación 24, en donde dicha muestra de control comprende a dicha porción de dicha molécula de ácido nucleico de *pts* de GBS.
26. El método de la reivindicación 7, En donde dicha etapa de ciclización utiliza un par de iniciadores de control y un par de sondas de control, en donde dichos iniciadores de control y dichas sondas de control son distintas a dichos iniciadores de *pts* y a dichas sondas de *pts*, en donde dicha etapa de amplificación produce un producto de amplificación de control, en donde dichas sondas de control hibridan a dicho producto de amplificación de control.
27. Un artículo de fabricación, que comprende:
- un par de iniciadores de *pts*, en donde dicho par de iniciadores de *pts* comprenden un primer iniciador de *pts* y un segundo iniciador de *pts*, en donde dicho primer iniciador de *pts* comprende la secuencia 5'-TGA GAA GGC AGT AGA AAG CTT AG-3' (SEQ ID NO: 1), y en donde dicho segundo iniciador de *pts* comprende la secuencia 5'-TGC ATG TAT GGG TTA TCT TCC-3' (SEQ ID NO: 2);
  - un par de sondas de *pts*, en donde dicho par de sondas de *pts* comprenden una primera sonda de *pts* y una segunda sonda de *pts*, en donde dicha primera sonda de *pts* comprende la secuencia 5'-CAA ATT AAA GAG ACT ATT CGT GCAA-3' (SEQ ID NO: 3), y en donde dicha segunda sonda de *pts* comprende la secuencia 5'-CAA GTAAAT GCA GAAACA GG-3' (SEQ ID NO: 4); y
  - una mitad fluorescente donante y una mitad fluorescente aceptora correspondiente.
28. El artículo de fabricación de la reivindicación 27, en donde dicha primera sonda de *pts* está marcada con dicha mitad fluorescente donante y en donde dicha segunda sonda de *pts* está marcada con dicha mitad fluorescente aceptora correspondiente.
29. El artículo de fabricación de la reivindicación 27, que comprende además un inserto en el empaque que tiene instrucciones sobre el mismo para utilizar a dicho par de iniciadores de *pts* y a dicho par de sondas de *pts* para detectar la presencia o la ausencia de GBS en una muestra.
30. Un método para detectar la presencia o la ausencia de GBS en una muestra biológica de un individuo, dicho método comprendiendo:
- llevar a cabo al menos una etapa de ciclización, en donde una etapa de ciclización comprende una etapa de amplificación y una etapa de enlazamiento de colorante, en donde dicha etapa de amplificación comprende

## ES 2 305 646 T3

poner en contacto a dicha muestra con un par de iniciadores de *pts* para producir un producto de amplificación de *pts* si está presente una molécula de ácido nucleico de *pts* de GBS en dicha muestra, en donde dicha etapa de enlazamiento de colorante comprende poner en contacto a dicho producto de amplificación de *pts*, con un colorante que enlaza al ADN bicatenario; y

5

detectar la presencia o la ausencia de enlazamiento de dicho colorante que enlaza al ADN bicatenario dentro de dicho producto de amplificación,

10

(i) en donde la presencia de enlazamiento es indicativa de la presencia de GBS en dicha muestra, y en donde la ausencia de enlazamiento es indicativa de la ausencia de GBS en dicha muestra, y

15

(ii) en donde dicho par de iniciadores de *pts* comprende un primer iniciador de *pts* y un segundo iniciador de *pts*, en donde dicho primer iniciador de *pts* comprende la secuencia 5'-TGA GAA GGC AGT AGA AAG CTT AG-3' (SEQ ID NO: 1), y en donde dicho segundo iniciador de *pts* comprende la secuencia 5'-TGC ATG TAT GGG TTA TCT TCC-3' (SEQ ID NO: 2)

31. El método de la reivindicación 30, en donde dicho colorante que enlaza al ADN bicatenario se selecciona del grupo que consiste de SYBRGreenI, SYBRGold, y bromuro de etidio.

20

32. El método de la reivindicación 30, que comprende además determinar la temperatura de fusión entre dicho producto de amplificación de *pts* y dicho colorante que enlaza al ADN bicatenario, en donde dicha temperatura de fusión confirma dicha presencia o ausencia de dicho GBS.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 305 646 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Uhl, James R.  
Cockerill III, Franklin R.  
5 Aichinger, Christian  
Reiser, Astrid
- <120> Detección de Estreptococos del Grupo B
- <130> 07039/460001
- 10 <140> 10/716,005  
<141> 2003-11-18  
<160> 4
- 15 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0  
<210> 1  
<211> 23  
<212> ADN
- 20 <213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido
- 25 <400> 1
- tgagaaggca gtagaaagct tag 23
- 30 <210> 2  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- 35 <220>  
<223> Oligonucleótido
- 40 <400> 2
- tgcatgtatg gggtatcttc c 21
- 45 <210> 3  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- 50 <220>  
<223> Oligonucleótido
- <400> 3
- 55 caaattaaag agactattcg tgcaa 25
- <210> 4
- 60 <211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>
- 65 <223> Oligonucleótido

## ES 2 305 646 T3

<400> 4

caagtaaag cagaacagg

20

5

### LISTADO DE SECUENCIA

10 <110> Uhl, James R.  
Cockerill III, Franklin R.  
Aichinger, Christian  
Reiser, Astrid

15 <120> Detección de Estreptococos del Grupo B

<130> 07039/460001

<140> 10/716,005

<141> 2003-11-18

20 <160> 4

<170> FastSEQ paraWindows Versión 4.0

<210> 1

<211> 23

25 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Oligonucleótido

<400> 1

35 tgagaaggca gtagaaagct tag

23

<210> 2

<211> 21

40 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

45

<400> 2

50 tgcattgatg ggttatcttc c

21

<210> 3

<211> 25

<212> ADN

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

60

<400> 3

caaattaaag agactattcg tgcaa

25

65 <210> 4

<211> 20

<212> ADN

# ES 2 305 646 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

5

<400> 4

caagtaaatg cagaaacagg

20

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65