

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 644 258**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/22 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)
C12Q 1/25 (2006.01)
C12Q 1/42 (2006.01)
C12Q 1/48 (2006.01)
C12Q 1/68 (2008.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2011 PCT/US2011/032600**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2011 WO11130584**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2011 E 11769633 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **17.06.2020 EP 2558600**

(54) Título: **Métodos de medición de la actividad enzimática útiles para determinar la viabilidad celular en muestras no purificadas**

(30) Prioridad:

16.04.2010 US 324939 P
16.04.2010 US 324949 P
19.04.2010 US 325413 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
02.02.2021

(73) Titular/es:

MOMENTUM BIOSCIENCE LIMITED (100.0%)
Unit 19 Willowbrook Technology Park, Llandogo
Road, St. Mellons, Cardiff, Wales
CF3 0EF, GB

(72) Inventor/es:

O'HARA, SHAWN, MARK y
ZWEITZIG, DANIEL, R.

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

DESCRIPCIÓN

Métodos de medición de la actividad enzimática útiles para determinar la viabilidad celular en muestras no purificadas

5 **Referencia cruzada con solicitudes relacionadas**
10 La presente solicitud es una solicitud no provisional, que reivindica la prioridad, en parte, de la Solicitud Provisional
de EE. UU. N.º 61/324.939, presentada el 15 de abril de 2010, la Solicitud Provisional de EE. UU. N.º 61/324.949,
presentada el 16 de abril de 2010 y la Solicitud Provisional de EE. UU. N.º 61/325.413, presentada el 19 de abril de
2010.

Campo de la invención

15 La presente invención se refiere en general al campo de la detección de microorganismos, y más particularmente a la detección de bacterias. También se proporcionan métodos mejorados de detección de microorganismos que son altamente sensibles, son aplicables a muestras no purificadas, y tienen numerosas aplicaciones, junto con kits de ensayo, que se basan en la presencia de ligasas y/o fosfatases como indicador de la viabilidad bacteriana.

20 El alcance de protección se define por las reivindicaciones adjuntas.

Antecedentes de la invención

25 La medición de la presencia y niveles de ciertas moléculas que se asocian con la viabilidad celular es importante en distintos contextos. Por ejemplo, la medición de los niveles de ATP en las células de mamíferos para los análisis de crecimiento y con fines toxicológicos. El documento WO92/04467 mide la actividad de la polimerasa para detectar microorganismos.

30 Se pueden utilizar estrategias de cultivo para detectar pequeñas cantidades de bacterias pero dichas técnicas necesitan varios días para completarse, especialmente cuando se intenta detectar pocas cantidades de bacterias y también cuando se detectan microorganismos de crecimiento más lento.

De manera alternativa, se pueden llevar a cabo ensayos basados en la medición de la presencia de una molécula que se puede ligar a la presencia en la muestra de una célula u organismo contaminante. La molécula que se detecta más comúnmente es el Trifosfato de Adenosina (ATP). También se ha propuesto la detección de ADN y ARN, aunque la correlación entre la presencia de ADN y ARN y la viabilidad no está clara debido a la persistencia variable de ácidos nucleicos en las células tras la muerte (Keer & Birch, Journal of Microbiological Methods 53 (2003) 175-183). Se ha propuesto la detección de adenilato cinasa como indicador de viabilidad (Squirrell DJ, Murphy MJ, Leslie RL, Green JCD: A comparison of ATP and adenylate kinase as bacterial cell markers: correlation with agar plate counts, in Bioluminescence and Chemiluminescence Progress and Current Applications. Editado por: Stanley RA, Kricka LJ. John Wiley and Sons; 2002 y documento WO 96/02665). Un método de rutina empleado para determinar los niveles de ATP implica el uso de bioluminiscencia y. El método utiliza la dependencia del ATP de la reacción en la que la luciferasa que emite luz cataliza la oxidación de la luciferina. El método se puede utilizar para medir concentraciones relativamente bajas de AT. Los kits útiles para detectar el ATP que utilizan bioluminiscencia están disponibles en el mercado en Roche, New Horizons Diagnostics Corp, Celsis etc. Sin embargo, existen varios problemas con respecto a la detección de bioluminiscencia. Por ejemplo, la detección solo de ATP microbiano, en presencia de ARP de fuentes no microbianas puede ser un problema. Este problema se ha resuelto hasta cierto grado mediante el uso de filtros que pueden separar las fuentes bacterianas de las no bacterianas de ATP, proporcionando de esta manera una señal más precisa.

50 En consecuencia, se puede ver que existen varios problemas con respecto a la técnica convencional de la detección de microbios. Con el fin de afrontar adicionalmente dichos problemas, se ha propuesto la detección de ligasas, tal como los que se describen en la solicitud de patente publicada WO/1996/002665, publicada el 1 de febrero de 1996,
55 donde se describe un método para la determinación de la presencia y/o cantidad de microorganismos y/o su material intracelular presente en una muestra que se caracteriza porque la cantidad de adenilato cinasa en la muestra se estima mezclándola con difosfato de adenosina (ADP), determinando la cantidad de trifosfato de adenosina (ATP) producida en la muestra a partir de este ADP, y relacionando la cantidad de ATP así producido con la presencia y/o cantidad de adenilato cinasa y con los microorganismos y/o su material intracelular, donde la conversión de ADP a ATP se lleva a cabo en presencia de iones de magnesio con una concentración molar suficiente para permitir la máxima conversión de ADP a ATP. La cantidad de magnesio presente es preferente tal que haya suficiente para proporcionar un mol de magnesio por cada mol de ADP de manera que todas las moléculas de ADP se puedan asociar con al menos un ion de magnesio.

65 En la solicitud de patente publicada WO/2009/007719, publicada el 15 de enero de 2009, titulada DETECTION OF MICRO-ORGANISMS BASED ON THEIR NAD-DEPENDENT DNA LIGASE ACTIVITY, se desvelan ligasas, en particular liqasas dependientes de NAD como indicadores útiles de la presencia de un microorganismo (viable) en

una muestra. Las ligasas son enzimas que catalizan la unión de moléculas de ácido nucleico. La reacción de unión necesita o ATP o NAD⁺ como co-factor dependiendo de la ligasa a la que se refiera. En esta divulgación, el uso de la actividad de ligasa dependiente de NAD se utiliza como un indicador de la presencia de un microorganismo (viable) en una muestra. La relación entre la actividad ligasa dependiente de NAD y la viabilidad es el centro de la invención desvelada en esta solicitud, (Korycka-Machala et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Ago. 2007, p. 2888-2897), ya que esto permite que se utilice la actividad de esta enzima como indicador de células microbianas viables, en particular de origen bacteriano, en la muestra. Sin embargo, en los experimentos que dan lugar al desarrollo de la presente invención, se descubrió que las técnicas y enseñanzas descritas en esta solicitud de patente publicada WO/2009/007719 no se podían aplicar para la determinación de microorganismos en muestras sin purificar, tales como los lisados microbianos en bruto, sangre o cultivos sanguíneos, constituyendo de esta manera un obstáculo principal de la tecnología que se describe en esta referencia. Sin embargo, se ha descubierto que estas metodologías, también, tienen problemas. Por ejemplo, se ha descubierto que en general el ensayo de sustrato de ligasa convencional diseñado y la detección de la señal resultante del mismo, como se desvela en la solicitud de patente a la que se ha hecho referencia anteriormente, no es específico de ligasa cuando se aplica a su tipo de muestra que se pretende (lisados celulares microbianos derivados de sangre en bruto). Estos son los problemas que la presente invención busca enfrentar y superar.

Se describen ensayos para detectar actividad de transcriptasa inversa en: Pyra et al. (Proc Natl Acad Sci U S A. 15 de febrero de 1994; 91(4): 1544-1548); Arnold et al. (Biotechniques. julio de 1998; 25(1): 98-106); WO2001/027318; Brorson et al. (Biologicals. marzo de 2002; 30(1): 15-26); Lugert et al. (Biotechniques. febrero de 1996; 20(2): 210-217); y Maudru et al. (J Virol Methods. julio de 1997; 66(2): 247-61).

Se describen ensayos para detectar actividad de telomerasa en: Gauthier et al. (Br J Cancer. 2 de marzo de 2001; 84(5): 631-5); Lin et al. (Cell. 30 de junio de 1995; 81(7): 1127-35); Cano et al. (Proc Natl Acad Sci U S A. 30 de marzo de 1999; 96(7): 3616-3621); Rubiano et al. (Mem Inst Oswaldo Cruz. julio de 2003; 98(5): 693-5); Raj et al. (Biochem Biophys Res Commun. 26 de septiembre de 2003; 309(3): 685-8); y Kim et al. (Science. 23 de diciembre de 1994; 266(5193): 2011-5).

Vellore et al. (Appl Environ Microbiol. diciembre de 2004; 70(12): 7140-7) describe el descubrimiento de una proteína termoestable con actividad de transcriptasa inversa en el genoma de una bacteria termofílica.

Sumario de la invención

Al contrario que con los métodos convencionales descritos anteriormente, en un aspecto, la presente invención se refiere a la detección de enzimas tales como ADN polimerasas, como indicadores útiles de la presencia de un microorganismo o microbio (viable) en una muestra, en particular una muestra que es, por ejemplo, un lisado microbiano en bruto o sangre o un cultivo sanguíneo sin purificar. La asociación descubierta de acuerdo con la presente invención entre la actividad de ADN polimerasa y la viabilidad de los microorganismos o microbios hace posible que la detección de la actividad de estas enzimas se utilicen como un indicador de células microbianas viables, en particular de origen bacteriano, en la muestra.

La invención proporciona métodos para la detección de ADN polimerasa como indicador de la presencia de un microorganismo en una muestra. Dicho método comprende:

- 45 (a) poner en contacto la muestra con una molécula de ADN que actúa como sustrato de la actividad de ADN polimerasa en la muestra;
- (b) incubar la muestra que se ha puesto en contacto de esta manera en condiciones adecuadas para la actividad polimerasa; y
- 50 (c) determinar específicamente la presencia (y/o la cantidad) de una molécula de ácido nucleico que resulta de la acción de la ADN polimerasa del microorganismo sobre el sustrato por amplificación de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico, indicando de esta manera la presencia del microorganismo.

Además, la presente memoria descriptiva proporciona reactivos útiles en los métodos descritos anteriormente, y kits de ensayo que comprenden dichos reactivos útiles para llevar a cabo los métodos.

55 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona mejoras de los métodos, composiciones y kits descritos en la solicitud de patente publicada WO/2009/007719, publicada el 15 de enero de 2009, titulada DETECTION OF MICROORGANISMS BASED ON THEIR NAD-DEPENDENT DNA LIGASE ACTIVITY, cuya solicitud publicada identifica ligasas, en particular ligasas dependientes de NAD, como indicadores útiles de la presencia de un microorganismo o microbio (viable).

60 La presente divulgación en consecuencia proporciona mejoras en los métodos, y composiciones y kits que se basan en ellos como se desvelan en el documento WO/2009/007719, de detección de una enzima que se selecciona de entre el grupo de ligasa dependiente de NAD, o una fosfatasa, o una mezcla de las anteriores, como indicador de la presencia de un microorganismo en una muestra, cuyos métodos mejorados comprenden:

- (a) poner en contacto la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para la actividad enzimática en la muestra, mientras que no se permiten señales de interferencia de ADN polimerasa,
 (b) incubar la muestra puesta en contacto de esta manera en condiciones adecuadas para la actividad enzimática; y
 5 (c) determinar la presencia (y/o la cantidad) de una molécula de ácido nucleico modificada por la enzima o la mezcla sobre el sustrato de moléculas de ácido nucleico para indicar la presencia del microorganismo.

Por lo tanto, se apreciará que los métodos mejorados de la invención son útiles para identificar todos los microorganismos en los que se expresan (o se han expresado) dichas enzimas o mezclas de las mismas.

10 Como se establece en el presente documento, la primera etapa del método comprende la puesta en contacto de la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato de la actividad enzimática en la muestra, mientras que no se permiten las señales de interferencia de la ADN polimerasa. Por lo tanto se apreciará que se puede utilizar cualquier molécula capaz de unirse que se pueda detectar una vez unida.

15 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1, dibujos A a D, muestran los diagramas de la matriz y las representaciones gráficas de los resultados producidos por los experimentos de acuerdo con la presente invención como se describen en el presente documento.

20 La Figura 2, dibujos A a D, son representaciones gráficas que muestran que los sustratos favorables a la polimerasa incapaces de unirse son sensibles y específicos en lisados celulares en bruto derivados de microbios.

25 La Figura 3 es una representación gráfica que muestra que los sustratos favorables a polimerasa incapaces de unirse son sensibles y específicos de lisados celulares en bruto derivados de un Cultivo sanguíneo con microbios añadidos.

30 Descripción detallada de la invención

35 Por lo tanto, a partir de la descripción anterior se puede apreciar que los métodos de la presente invención son útiles para identificar todos los microorganismos en los que se expresa (o se ha expresado) una ADN polimerasa. En ciertas realizaciones, los métodos de la invención se aplican a la detección de microorganismos viables y por lo tanto se puede considerar como un método para detectar un microorganismo viable en una muestra. En particular, en una 40 realización preferida, los métodos de la invención pueden ser útiles para la identificación de bacterias o microorganismos en los que el ácido nucleico del gen de polimerasa y su polimerasa proteica activa traducida es esencial para la viabilidad. Sin embargo, los microorganismos, tales como las bacterias, que se convirtieron recientemente en no viables (por ejemplo, mediante un tratamiento con antibacterianos) pueden mantener una actividad de ADN polimerasa detectable hasta que se degrade la enzima.

45 En el desarrollo de la presente invención, se descubrió un cambio de paradigma en la preparación de la muestra de componentes bioquímicos celulares funcionales que hace posible que los ensayos de la presente invención se lleven a cabo directamente en las muestras de células lisadas suavemente, sin las caras complicaciones que se añaden en los protocolos de aislamiento basados en la desnaturalización tradicional, y a menudo extrema. Por lo tanto, se ha descubierto que la presente invención hace posible la detección de organismos viables en muestras tales como los lisados clínicos en bruto, incluyendo sin limitación fracciones celulares de sangre completa y/o cultivos sanguíneos y a partir de grandes volúmenes de las mismas, que son normalmente de 10-20 ml, preferentemente en el intervalo de 0,1-100 ml. La invención es particularmente útil para la detección de todos los organismos asociados con septicemia y los asociados con afecciones que incluyen, pero no se limitan a bacteriemia, fungemia, y afecciones víricas y parasitarias. Se ha descubierto inesperadamente que de acuerdo con la presente invención, la detección de dichos organismos se puede conseguir en dichas muestras no purificadas como se ha descrito anteriormente, al contrario que en las enseñanzas de la técnica convencional en las que la inhibición de la polimerasa derivada de la muestra, así como la presencia de proteinasas y nucleasas de interferencia, ha sido una barrera para dichos métodos de ensayo cuando se llevaban a cabo en muestras no purificadas.

55 Como se ha descrito anteriormente, se han descritos ligasas, en particular ligasas dependientes de NAD como indicadores supuestamente útiles de la presencia de un microorganismo (viable) en una muestra. Sin embargo, por el contrario, la presente invención proporciona ADN polimerasas derivadas de células microbianas viables, más útiles que las ligasas, que pueden utilizarse, de manera similar, para ligar su actividad de las células viables a un generador de señal de alta sensibilidad tal como la amplificación por técnicas tales como la PCR y similares. Esta característica de la invención también hace potencialmente posible la diferenciación entre bacterias y hongos. Ejemplos adicionales de enzimas que se puede utilizar incluyen:

- a. Se podrían utilizar cinasas con adición de PO4 para capacitar una ligasa o parar una polimerasa
- b. Se pueden utilizar fosfatos para eliminar el PO4 y capacitar las polimerasas
- c. Se pueden utilizar ARN polimerasas para extender los sustratos para facilitar las amplificaciones corriente

- abajo de PCR tradicional o isotérmicas
- d. Las amplificaciones isotérmicas se pueden ejecutar sin actividad enzimática de endonucleasas
 - e. Ribosomas
 - f. Mecanismos de ARNm
 - 5 g. Girasa
 - h. Helicasa
 - i. Exonucleasas, 5'-3', 3'-5' es decir, eliminando grupos de bloqueo tales como PO4, TaqMan, etc.
 - j. Endonucleasas
 - k. Proteasas
 - 10 l. DNAsas
 - m. RNAsas
 - n. UDGlicosolasas
 - o. Enzimas de reparación
- 15 En una realización preferida de la presente invención, se ha descubierto que la medición de la actividad de ADN polimerasa, de acuerdo con la invención, hace posible la determinación de la viabilidad celular a partir de lisados microbianos en bruto. Esto se puede verificar utilizando oligosustratos modificados más selectivos en combinación con muy selectivos con "arranque en caliente" (como se conocen bien en la técnica) y que controlan actividades a TA, 37 °C, 60 °C.
- 20 En una realización de la invención, la invención se aplica a la exploración de un producto sanguíneo, especialmente de plaquetas ya que en la presente solicitud cualquier crecimiento bacteriano causa el desecho de productos, y la diferenciación entre bacterias y hongos no es necesaria. En una realización adicional de la invención, se pueden emplear fosfatasas y probablemente son otra enzima candidata excelente para hacer posible la actividad polimerasa, ya que eliminan un fosfato 5' o 3' dejando un -OH pudiendo capacitar de esta manera cualquier polimerasa mediante la retirada de un Taq 5' que esté incluido, o una ligasa (por eliminación del 3'). Además, las fosfatasas son robustas y pueden diferenciar entre levaduras y bacterias mediante la optimización del pH. Por lo tanto se apreciará que cualquier enzima adecuada que facilite la polimerasa como se contempla por las enseñanzas del presente documento puede ser útil en la práctica de la presente invención.
- 25 En la práctica de la presente invención, la detección de microorganismos puede incluir microorganismos recientemente viables, hasta el punto en el que se ha degradado la ADN polimerasa, según sea apropiado. Si es necesaria una distinción entre microorganismos viables y recientemente viables, debería ser suficiente un simple transcurso del tiempo o comparación de la actividad de ADN polimerasa entre dos o más puntos de tiempo, en 30 condiciones apropiadas, para determinar si la actividad de ADN polimerasa aumenta, persiste o disminuye con el tiempo. En una realización preferida, si se descubre que la actividad de ADN polimerasa persiste, o aumenta durante un extenso periodo o un punto de tiempo posterior (en comparación con la medición inicial), puede indicar que los microorganismos son viables. Si la actividad de ADN polimerasa disminuye en un punto de tiempo posterior, puede indicar que la actividad detectada era de microorganismos recientemente viables. Esta estrategia de medición en el 35 transcurso del tiempo puede ser especialmente útil cuando se aplica en el ensayo de susceptibilidad a antibióticos (AST) y así como en la determinación de otras terapias apropiadas. Los métodos de detección se exponen con detalle en el presente documento, y los métodos de la invención se pueden aplicar más generalmente (Wilkinson et al., Molecular Microbiology (2001) 40(6), 1241-1248). Las bacterias pueden, también, ser bacterias mesófilas y/o termófilas, por ejemplo.
- 40 45 Una "muestra" en el contexto de la presente invención se define para incluir cualquier muestra en la que es deseable ensayar la presencia de un microorganismo, en particular una bacteria. Por lo tanto, la muestra puede consistir en un lisado microbiano en bruto proporcionado clínicamente, o puede comprender una muestra clínica de sangre o cultivo sanguíneo, o comprende una muestra adecuada para un sistema de ensayo in vitro, por ejemplo. Las muestras también pueden comprender muestras de bebidas o alimentos o preparaciones de los mismos, o productos farmacéuticos o cosméticos tales como productos de higiene personal que incluyen champús, acondicionadores, hidratantes, etc., los cuales se ensayan en cuanto a contaminación microbiana de manera rutinaria. La muestra puede comprender tejidos o células y puede comprender esputo o una muestra de plaquetas. Además, los métodos y kits de la invención se pueden utilizar para controlar la contaminación de superficies, tales como por ejemplo, en 50 55 localizaciones en las que se prepara un alimento. En una realización preferida, la contaminación se indica por la presencia de actividad de polimerasa. La contaminación puede ser de cualquier fuente microbiana, en particular contaminación bacteriana. Además, la invención también es útil para controlar condiciones ambientales tales como el suministro de agua, aguas residuales, ambientes marinos, etc. La invención también es útil para controlar el crecimiento bacteriano en procedimientos de fermentación y en el muestreo del aire cuando se puede evaluar el contenido de bacterias o esporas en un hospital, instalaciones industriales o en aplicaciones de biodefensa.
- 60 Los métodos de la invención se basan en el hecho de que si hay uno o más microorganismos (viables), en particular bacterias, presentes en una muestra, estará presente una actividad de ADN polimerasa. La ADN polimerasa por lo tanto, puede, en condiciones adecuadas, catalizar una reacción para generar una nueva molécula de ácido nucleico (en un procedimiento posterior). La nueva molécula de ácido nucleico se puede detectar por cualquier medio adecuado tal como se describe posteriormente en el presente documento, permitiendo de esta manera la 65

determinación de la presencia de los microorganismos en la muestra en ensayo.

Por lo tanto, si el microorganismo no está presente en la muestra, no habrá actividad de ADN polimerasa en la muestra y por lo tanto no se generará una nueva molécula de ácido nucleico detectable.

5 Los métodos de la presente invención proporcionan ventajas técnicas significativas, debido en gran parte al hecho de que la nueva molécula de ácido nucleico se genera como parte del método. En los métodos de la presente invención, la molécula de ácido nucleico que no reacciona no contribuirá a la señal, y como resultado no se deberían producir de señales positivas falsas cuando se lleven a cabo los métodos.

10 Además, los métodos proporcionados por la invención son altamente sensibles, y pueden proporcionar la detección de la ADN polimerasa presente en la muestra por debajo de femtogramos y posiblemente incluso a niveles de atogramos. La sensibilidad se deriva del hecho de que cada célula bacteriana contiene miles de moléculas enzimáticas, y por lo tanto cada una puede catalizar múltiples eventos en condiciones adecuadas. A diferencia de 15 las estrategias de PCR directas, que pueden dirigirse a una o pocas copias de un gen por célula o el uso de etapas o reactivos adicionales para detectar el ARN ribosómico o mensajero, la estrategia descrita en el presente documento se dirige a la detección de múltiples copias de la enzima por célula en un simple formato de ensayo.

20 Como se establece en el presente documento, la primera etapa en un método de acuerdo con la invención comprende poner en contacto la muestra con una molécula de ADN que actúa como sustrato para la actividad de ADN polimerasa en la muestra.

25 Las moléculas de ADN del sustrato adecuado para el uso en la invención se describen posteriormente con más detalle. Las moléculas de ADN pueden incorporar análogos sintéticos de nucleótidos según sea apropiado. Se pueden marcar, tal como utilizando un marcador fluorescente, o un par FRET, en ciertas realizaciones para facilitar la detección. Los métodos de detección adecuados se describen en el presente documento.

30 "Ácido nucleico" se define en el presente documento para incluir cualquier ácido nucleico natural o análogos naturales o sintéticos que son capaces de generar una molécula de ácido nucleico por acción de la polimerasa. Las moléculas de ácido nucleico adecuadas pueden estar compuestas, por ejemplo, por ADN de cadena doble o sencilla y ARN de cadena doble o sencilla.

35 Aunque el sustrato de ácido nucleico puede comprender una molécula de ADN de doble cadena con los extremos romos, en una realización de la invención el ADN sustrato de la polimerasa puede comprender moléculas de ADN de doble cadena con una protuberancia complementaria y grupos fosfato 5' en los extremos que se van a unir. En una realización específica, la protuberancia complementaria tiene entre 2 y 10, tal como 3 o 5 pares de bases. En una realización alternativa, el sustrato de ácido nucleico comprende una molécula de ADN con una muesca que contiene un fosfato 5'. Las moléculas de ácido nucleico sintetizadas están disponibles en el mercado y se pueden fabricar a medida con un grupo fosfato unido en el extremo 5'. Esto tiene la ventaja técnica de que el 100 % de las moléculas 40 de ácido nucleico que se utilizan en los métodos de la invención se marcarán con un grupo fosfato en 5'.

45 En la invención, si la ADN polimerasa está presente en la muestra, catalizará y se formará una nueva molécula de ácido nucleico (que se incorpora a la nueva secuencia total) que se pueda detectar por un procedimiento posterior, como se detalla en el presente documento (tal como por ejemplo PCR).

50 Por lo tanto, el sustrato de molécula de ADN, en hecho, puede comprender dos o más moléculas de ADN según sea apropiado. Esto se aplica en general a los métodos y kits.

55 En ciertas realizaciones, el sustrato de ADN comprende dos moléculas de ADN de doble cadena con protuberancias complementarias de cadena sencilla.

Se tiene que apreciar que los nuevos métodos de la presente invención se pueden utilizar para diferenciar la ligasa de la polimerasa tomando una muestra sospechosa de contener ambas y ensayando la polimerasa y ligasa en paralelo en vasos de reacción separados, entonces se restan las señales, determinando de hecho los niveles verdaderos de ligasa que se encuentran en la muestra. Esto puede representarse por la siguiente ecuación:

$$[\text{señal de polimerasa} - \text{señal de ligasa (polimerasa + ligasa)}] = \text{señal verdadera de ligasa}$$

60 También se tiene que apreciar que en cualquier realización de la presente invención, la acción de las ADN polimerasas sobre las moléculas de ADN es bien conocida y por lo tanto se puede ver que se pueden seleccionar muchos tipos diferentes de sustratos de molécula de ADN para su uso y tendrán las ventajas de la utilización en los nuevos métodos de la invención, como se describen en el presente documento. Preferentemente, el sustrato de molécula de ADN está presente en exceso, y en particular en un gran exceso molar, sobre la ADN polimerasa de la muestra. Esto es una importante distinción técnica respecto a los métodos de la técnica anterior. Debido a que se detecta solamente una nueva molécula de ácido nucleico polimerizado es esencial la presencia de esta molécula en la muestra para que los métodos de detección funcionen eficazmente. Por lo tanto, no es perjudicial para los 65

métodos de la invención si están presentes otras moléculas de ácido nucleico en la muestra tales como de bacterias que se van a detectar o de fuentes de mamífero u hongos que se pueden encontrar en la muestra que por ejemplo se va a ensayar.

5 La presente invención se puede describir completamente en referencia a los siguientes ejemplos del trabajo experimental que se lleva a cabo de acuerdo con la invención. También, aunque ciertas de las realizaciones preferidas de la presente invención se han descrito y ejemplificado anteriormente, no se tiene la intención de que la invención se limite a dichas realizaciones.

10 **Ejemplo 1. Descubrimiento de un mecanismo independiente de la ligasa:**

Se incubaron tres sustratos de ADN diferentes (A) con ligasa de *E. coli* o sin ligasa y se sometió a una PCR que contenía los cebadores de PCR específicos del sustrato de ADN de ligasa en presencia/ausencia de UNG. Se controló la PCR mediante SYBR verde (qPCR) y las reacciones resultantes se sometieron a análisis en gel (B). Se incubaron tres sustratos de ADN diferentes (A) con ligasas de *E. coli* o sin ligasa y se sometió a una PCR que contenía cebadores de detección de la Extensión S1 en presencia/ausencia de UNG. Se controló la PCR mediante la metodología de sonda Zeus disponible en el mercado (Zeus Scientific, Inc., Raritan, NJ) y las reacciones resultantes se sometieron a análisis en gel (C). Se incubaron cantidades menguantes de un sustrato de ADN no ligable (S1/AS solo) con tres ADN polimerasas diferentes disponibles en el mercado y se sometieron a un análisis de qPCR con sonda Zeus. Los resultados de estos experimentos se ilustran gráficamente en la Figura 1.

Ejemplo 2. Se descubrió que los sustratos favorables a polimerasas incapaces de unirse eran sensibles y específicos en lisados celulares en bruto derivados de microbios

25 Se lisaron en una moledora de lecho cantidades menguantes de microbios y se incubaron con un sustrato de ADN (S1/AS solo) en presencia de tampón de ADN polimerasa y dNTP a 37 °C durante 30 min. (A). Los lisados se sometieron entonces a qPCR con sonda Zeus que contenían cebadores específicos de extensión de S1. Los resultados se representan gráficamente en la Figura 2.

30 **Ejemplo 3.**

Se descubrió que los sustratos favorables a polimerasa, incapaces de unirse eran sensibles y específicos en lisados celulares en bruto derivados de un cultivo sanguíneo con microbios añadidos.

35 Se añadieron cantidades menguantes de microbios en 10 ml de un caldo sanguíneo. Los microbios se recuperaron posteriormente, se sometieron a lisis en una moledora y se incubaron con un sustrato de ADN (S1/AS solo) en presencia de tampón de ADN polimerasa y dNTP a 37 °C durante 30 min. (A). Los lisados se sometieron entonces a qPCR con sonda Zeus que contenía cebadores específicos de extensión S1. Los resultados se representan gráficamente en la Figura 3.

40 En consecuencia, en otro aspecto más la presente invención mejora la invención descrita y reivindicada en el documento WO/2009/007719. De acuerdo con la presente invención, se había descubierto que el supuesto sustrato específico de ADN ligasa de acuerdo con la divulgación de dicho documento WO/2009/007719 produce señales robustas de ADN polimerasa purificada o ADN ligasa purificada, de manera que los métodos expuestos no hacían 45 que la ADN ligasa fuera específica cuando se aplicaba al tipo de muestra que se pretendía, tal como las muestras de septicemia. Por ejemplo, en el desarrollo de la presente invención, se introdujeron muestras de septicemia utilizando los métodos de preparación de muestras que se enseñan en el documento WO/2009/007719 en los protocolos de ensayo como se enseña en el mismo como lisados celulares microbianos en bruto que contenían una alta abundancia de ADN polimerasas. Las ADN polimerasas son abundantes en todas las células vías. Se descubrió que 50 los ensayos que se desvelan en el documento WO/2009/007719 son incapaces de discriminar entre señales derivadas de ADN polimerasa y ADN ligasa, cuando se introducen en muestras sin ligasa purificada, que desde un punto de vista práctico incluyen todas las introducciones de muestras clínicas, debido a que el aislamiento de ligasa no es ni un procedimiento práctico no de rutina como se desvela en esta referencia, cuando se intentan obtener resultados de muestras clínicas. Además, se descubrió que los experimentos que se llevan a cabo de acuerdo con lo 55 que se enseña en esta referencia producían una señal de ensayo contaminada con ADN polimerasa, no una señal específica de ADN ligasa, que es el resultado claramente deseado de acuerdo con la presente referencia.

Estos hallazgos descritos anteriormente son contrarios a la capacidad de un sistema, que se produce de acuerdo 60 con las enseñanzas del documento WO/2009/007719, para detectar específicamente la ADN ligasa de células viables. Además se descarta la capacidad que se pretende en el ensayo desvelado en esta referencia para diferenciar la ligasa bacteriana dependiente de NAD derivada de células viables de la ligasa fúngica dependiente de ATP, ya que las polimerasas activas son comunes en todas las células viables y no se pueden diferenciar de las ligasas en dicho sistema de ensayo. Teniendo identificado por tanto este problema crítico, que claramente no se preveía en esa referencia o en cualquier otra técnica conocida, la presente invención proporciona mejoras que hacen posibles las señales de ligasa que se van a detectar de muestras con ligasa no purificadas, tal como los lisados microbianos en bruto, proporcionando sustratos de ADN alternativos, sustitutivos, como se describe

posteriormente en el presente documento, que no permiten que se detecten las señales de interferencia de las ADN polimerasas.

5 La presente divulgación por lo tanto también proporciona métodos mejorados, y composiciones i kits que se basan en los mismos, de detección de una enzima que se selecciona de entre el grupo que consiste en ligasa dependiente de NAD, o fosfatasa, o una mezcla de las mismas como indicador de la presencia de un microorganismo en una muestra, comprendiendo los métodos:

10 (a) poner en contacto la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como un sustrato para la actividad enzimática en la muestra mientras que no se periten las señales de interferencia de la ADN polimerasa.,

15 (b) incubar la muestra que se ha puesto en contacto de esta manera en condiciones adecuadas para la actividad enzimática; y

(c) determinar la presencia (y/o la cantidad) de una molécula de ácido nucleico modificada por la enzima que resulta de la acción de la enzima seleccionada o una mezcla sobre el sustrato de molécula de ácido nucleico para indicar la presencia del microorganismo.

20 Por lo tanto, los métodos mejorados son útiles para la identificación de todos los microorganismos en los que se expresa (o se ha expresado) una ligasa dependiente de NAD, o una fosfatasa, o mezclas de las mismas.

En un ejemplo preferido la primera etapa en el método mejorado desvelado en el presente documento comprende poner en contacto la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para la actividad de ligasa dependiente de NAD en la muestra, mientras que no se permiten las señales interferentes de ADN polimerasa. Cualquier molécula de enzima adecuada, o ligable, que se pueda detectar específicamente, una vez ligada, se puede utilizar en los métodos que se describen en el presente documento.

30 El sustrato de moléculas de ácido nucleico para su uso en los métodos, y la inclusión en los kits, debe ser de una secuencia y estructura de manera que la ligasa dependiente de NAD pueda actuar sobre las moléculas para producir una (nueva) molécula de ácido nucleico modificada por una enzima o ligada detectable, y de manera que no permite señales de interferencia de ADN polimerasa.

35 Se tiene que apreciar que en el desarrollo de la presente invención, se señala que la eliminación de la señal de fondo derivada de la ADN polimerasa Taq en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) no era una solución viable para la falta de especificidad que se había encontrado en el sustrato actual como se desvela en el documento WO/2009/007719, ya que se determinó como un sistema de detección separado que tendría que abordarse por separado y está por lo tanto fuera del alcance de la presente divulgación.

40 En consecuencia, en el presente caso para los experimentos que dan lugar a los presentes métodos se fijaba específicamente como un objetivo bloquear toda la actividad de ADN polimerasas con un aditivo inhibidor que no interfiera con la ligasa. Con el fin de conseguir esto, se señaló que las ADN polimerasas tenían funciones enzimáticas bien documentadas que se necesitan neutralizar/controlar:

45 (a) actividad de ADN polimerasa 5'-3'

(b) actividad exonucleasa 3'-5'

(c) actividad exonucleasa 5'-3'

50 (d) actividad esterasa inherente

Se ha determinado de acuerdo con los presentes métodos que las estrategias de sustrato adecuado de molécula de ácido nucleico para su uso en nuevos métodos, que son adecuados en sustitución de las moléculas de sustrato desveladas como se utilizan en los métodos del documento WO/2009/007719 puede incluir, pero no se limita lo siguiente:

1. Nucleótidos modificados que inhiben cualquier actividad de la polimerasa

2. Didesoxinucleótidos ddCTP, ddGTP que detienen la polimerasa al añadir la primera base y secuestra – neutraliza su actividad mientras que la ligasa disfruta de reacciones productivas utilizando el dATP.

3. Didesoxinucleótidos que evitan que se extienda el oligo AS

4. Oligos S1 con bases modificadas para la inhibición de polimerasa que se incorporan para bloquear su actividad en este sustrato de ADN.

5. Anticuerpos específicos de ADN polimerasa que inhiben esta actividad – estos se conocen bien en la técnica del PCR

6. Complejos inhibidores de oligos aptámeros

7. Estrategias de sustrato de ADN que impide que se detecten los sustratos de polimerasa extendidos en amplificaciones corriente abajo tales como acortamiento de AS por PCR en el lado 5' combinadas con un verdadero "arranque en caliente", como se conoce dicho término en la técnica
- 5 8. Las estrategias de hibridación del sustrato de ADN que eliminan la unión de polimerasa y la extensión por acortamiento de AS en el lado 3' pero no el efecto de ligasa
9. Índice cinético relativo combinado con la extensión de la longitud de polimerasa inclinado a favor de la ligasa.
- 10 10. Competición Per-PCR S1 3'-didesoxi (de longitud completa, o un 13mero que es el complementario al 3' de la AS)
11. Competición Pre-PCR S1 3' fosfato
12. Retirada completa de AS utilizando condiciones óptimas de UNG (enzima UNG convencional)
13. Retirada completa de AS utilizando UNG termoestable (NEB). Hará posible el tratamiento por calor de UNG para eliminar la ligasa/polimerasa contaminante, la PCRmm debe tener dTTP
14. Hacer una AS que tenga desoxiuridina (retirada de UNG) y el resto de bases de ARN para permitir el co-tratamiento de UNG/RNasa antes de la PCR
- 15 15. Se necesita obtener didesoxi 3' AS
16. Acortamiento del extremo 30 de la AS para reducir el ataque de Taq a altas temperaturas (es decir 68 grados)
17. AS unido covalentemente a un soporte sólido durante la etapa de unión/extensión
18. complemento inverso 3'-didesoxi S2 (longitud completa, o puede ser solo un 13mero que es complementario de la extensión S1 Pol)
- 20 19. Para la reducción del fondo – Se conocen bien en la técnica estrategias de "arranque en caliente" – 100 % de eliminación de oligos o hibridaciones de oligos extendidos no deseados
- 25 a. Física verdadera – no es fácil de hacer todos los materiales que contacten deben estar a una temperatura caliente de aproximadamente 90 grados C, y nunca debe caer por debajo de aproximadamente 65 grados C, siendo el problema que el proceso de transferencia crea una bajada de temperatura que se debería evitar.
- b. Sin arranque en caliente enzimático, por ejemplo dejar en 2 mM de MgCl (0,1 mM de EDTA protegido), cebadores, dNTP u otros componentes esenciales.
- c. Químico- cebador de arranque en caliente
- 30 Aunque se ha demostrado que las mejoras de la presente invención se pueden realizar por la sustitución de sustrato adecuado de moléculas de ácido nucleico que se describen en el presente documento para los descritos en el documento WO/2009/007719, se tiene que apreciar que la presente invención no se limita al alcance de las realizaciones específicas descritas en el presente documento. Además, distintas modificaciones de la invención además de las descritas en el presente documento serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior. Se tiene la intención que dichas modificaciones se encuentren en el alcance de la presente invención. Además, todas las realizaciones descritas en el presente documento se pueden aplicar ampliamente y combinar con cualquiera de otras realizaciones consistentes, según sea apropiado.
- 35 35
- 40 40 Se apreciará para los expertos habituados en la técnica que los principios fundamentales amplios y las enseñanzas de la presente invención son capaces de aplicarse para optimizar todas las variaciones de análisis PCR-SYBR/de sonda directa-lisado en bruto (por moledora o ultrasonidos)-capacitados pos desnaturizante de distintas muestras biológicas tisulares (incluyendo pero sin limitarse a, sangre, fluidos corporales y tejidos blandos) para no solo microorganismos o microbios como se ha descrito anteriormente específicamente, sino también para distintos agentes patógenos, tales como cualquier bacteria, hongos, virus, parásitos, etc.
- 45 Aunque se han hecho referencias específicas a la PCR en el presente documento, se apreciará adicionalmente que las mejoras de la presente invención no se limitan a la PCR o metodologías similares. Los ensayos de amplificación contemplados para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, otras técnicas basadas en ácidos nucleicos bien conocidas tales como ensayos de amplificación de ADN, ensayos de PCR que incorporan polimerasas termoestables, y métodos de amplificación isotérmica. Se tiene que apreciar que un experto en la técnica puede concebir distintos métodos de amplificación adecuados que serán útiles en la práctica de la presente invención, y que por lo tanto la invención no tiene la intención de limitarse por estos.
- 55 55 También se tiene que apreciar que la presente invención tiene aplicaciones en todos y cada uno de los métodos, procedimientos y procesamientos que implica el diagnóstico de ADN. Ejemplos de dichas aplicaciones incluyen pero no se limitan a los que implican seguridad alimentaria y del agua, bioterrorismo, detecciones médicas/de medicamentos y/o cualquier cosa que implique la detección de agentes patógenos. En la industria alimentaria, la presente invención se puede utilizar para controlar la eficacia de los conservantes. El método de la invención tiene el potencial de aplicarse a todas las células. Aunque las células bacterianas se ejemplifican en el ejemplo, un experto en la técnica puede ver fácilmente que los métodos de la invención se pueden aplicar a otros muchos tipos celulares. La invención se puede utilizar también para la identificación de sustancias que pueden alterar las membranas y/o destruir células, por ejemplo, células bacterianas. La identificación de nuevos desinfectantes y/o antibióticos son actualmente una prioridad debido a organismos con resistencia multifármaco que florecen y se diseminan en las instituciones de salud y los pacientes.
- 60
- 65

Se apreciará adicionalmente que los métodos de la invención, en combinación con una PCR cuantitativa es una herramienta que identifica rápida y satisfactoriamente el impacto de un desinfectante y/o un antibiótico sin tener que perder tiempo en cultivar las células y esperar su crecimiento. En algunos casos, los organismos pueden necesitar días a semanas para cultivarse, y por lo tanto pueden gastar un tiempo significativo para ver si la sustancia candidata ha sido capaz de eliminar células, tales como microorganismos. En otros casos, ciertos organismos no crecerán en un cultivo celular, haciendo por lo tanto difícil determinar si una sustancia era eficaz. Por lo tanto, la aplicación de los nuevos métodos de la invención puede ahorrar tiempo y recursos para la identificación de nuevos desinfectantes o antibióticos.

- 5 Una ventaja adicional de los nuevos métodos de acuerdo con la invención es su uso fácil. Por ejemplo, utilizando estos métodos, se pueden ensayar grandes cantidades de muestra en cuanto a la presencia de células viables, por ejemplo, bacterias. Por ejemplo, se pueden ensayar muestras en cuanto a la presencia de bacterias potencialmente vivas con membranas intactas. En otra realización las muestras ambientales se pueden ensayar en cuanto a la presencia de células viables, por ejemplo, bacterias. Estas muestras pueden recolectarse, por ejemplo, del suelo o ser parte de las plantas. Los métodos de acuerdo con la invención se pueden utilizar adicionalmente para ensayar aguas residuales tratadas tanto antes como después de la liberación.
- 10 Una ventaja adicional de los nuevos métodos de acuerdo con la invención es su uso fácil. Por ejemplo, utilizando estos métodos, se pueden ensayar grandes cantidades de muestra en cuanto a la presencia de células viables, por ejemplo, bacterias. Por ejemplo, se pueden ensayar muestras en cuanto a la presencia de bacterias potencialmente vivas con membranas intactas. En otra realización las muestras ambientales se pueden ensayar en cuanto a la presencia de células viables, por ejemplo, bacterias. Estas muestras pueden recolectarse, por ejemplo, del suelo o ser parte de las plantas. Los métodos de acuerdo con la invención se pueden utilizar adicionalmente para ensayar aguas residuales tratadas tanto antes como después de la liberación.
- 15 Una ventaja adicional de los nuevos métodos de acuerdo con la invención es su uso fácil. Por ejemplo, utilizando estos métodos, se pueden ensayar grandes cantidades de muestra en cuanto a la presencia de células viables, por ejemplo, bacterias. Por ejemplo, se pueden ensayar muestras en cuanto a la presencia de bacterias potencialmente vivas con membranas intactas. En otra realización las muestras ambientales se pueden ensayar en cuanto a la presencia de células viables, por ejemplo, bacterias. Estas muestras pueden recolectarse, por ejemplo, del suelo o ser parte de las plantas. Los métodos de acuerdo con la invención se pueden utilizar adicionalmente para ensayar aguas residuales tratadas tanto antes como después de la liberación.

- 20 Los métodos de acuerdo con la invención se pueden utilizar adicionalmente para ensayar muestras medicinales, por ejemplo, muestras de heces, cultivos de sangre, esputo, muestras tisulares (también cortes), material de heridas, orina y muestras del tracto respiratorio, superficies de implantes y catéteres.

- 25 Otro campo de aplicación de los métodos de acuerdo con la invención puede ser el control de productos alimentarios. En otras realizaciones, las muestras de alimento se obtienen de la leche o productos lácteos (yogur, queso, mantequilla, y suero de mantequilla), agua potable, bebidas (limonadas, cerveza, y zumos), productos de panadería y productos cárnicos. El método de la invención puede determinar si los conservantes de la comida o el tratamiento antimicrobiano de la comida (tal como la pasteurización) ha evitado el crecimiento celular. Un campo adicional de aplicación del método de acuerdo con la invención es el análisis de productos farmacéuticos y cosméticos, por ejemplo, ungüentos, cremas, tintes, extractos, soluciones, gotas, etc.

- 30 Además, los métodos de la invención pueden identificar miembros potencialmente viables de una comunidad microbiana para estudios ecológicos, la salud de suelos específicos para los sistemas agrícolas y/o ecológicos. Tradicionalmente, la identificación de una comunidad bacteriana se llevaba a cabo utilizando estrategias basadas en el cultivo o recuentos en placas. Cuanto más colonias se cuentan más bacteria se estima que están en la muestra original. Sin embargo, surgen problemas de algunas veces la larga incubación (en el intervalo de días) haciendo este método no adecuado para unos resultados adecuados y precisos. Estos inconvenientes son utilizando los métodos de la invención.

- 35 Ejemplos no limitantes de bacterias que se pueden someter a análisis utilizando los métodos de la invención o para detectar la viabilidad potencial en una muestra utilizando el método de la invención comprenden, por ejemplo: *B. pertussis*, *Leptospira pomona*, *S. paratyphi A* y *B*, *C. diphtheriae*, *C. tetani*, *C. botulinum*, *C. perfringens*, *C. feseri* y otras bacterias de gangrena gaseosa, *B. anthracis*, *P. pestis*, *P. multocida*, *Neisseria meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *Hemophilus influenzae*, *Actinomyces* (por ejemplo, *Nocardia*), *Acinetobacter*, *Bacillaceae* (por ejemplo, *Bacillus anthracis*), *Bacteroides* (por ejemplo, *Bacteroides fragilis*), *Blastomycosis*, *Bordetella*, *Borrelia* (por ejemplo, *Borrelia burgdorferi*), *Brucella*, *Campylobacter*, *Chlamydia*, *Coccidioides*, *Co-rynebacterium* (por ejemplo, *Corynebacterium diphtheriae*), *E. coli* (por ejemplo, *E. coli* Enterotoxigenica y *E. coli* Enterohemorrágica), *Enterobacter* (por ejemplo *Enterobacter aerogenes*), *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella*, *Salmonella* (por ejemplo, *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *Serratia*, *Yersinia*, *Shigella*), *Erysipelothrix*, *Haemophilus* (por ejemplo, *Haemophilus influenza tipo B*), *Helicobacter*, *Legionella* (por ejemplo, *Legionella pneumophila*), *Leptospira*, *Listeria* (por ejemplo, *Listeria monocytogenes*), *Mycoplasma*, *Mycobacterium* (por ejemplo, *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium tuberculosis*), *Vibrio* (por ejemplo, *Vibrio cholerae*), *Pasteurellaceae*, *Proteus*, *Pseudomonas* (por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*), *Rickettsiaceae*, *Espiroquetas* (por ejemplo, *Treponema spp.*, *Leptospira spp.*, *Borrelia spp.*), *Shigella spp.*, *Meningococcus*, *Pneumococcus* y todos los *Streptococcus* (por ejemplo, *Streptococcus pneumoniae* y Grupos A3 B, y C de Streptococos), *Ureaplasmas*. *Treponema pallidum*, *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella haemolytica*, toxoide de *Corynebacterium diphtheriae*, polisacáridos meningocócicos, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus pneumoniae*, toxoide de *Clostridium tetani*, y *Mycobacterium bovis*.

- 40 Una realización particularmente preferida de la presente invención utiliza la PCR. Los procedimientos generales se enseñan en la Pat de EE. UU. N.º 4.683.195 (Mullis, et al.) y Pat de EE. UU. N.º 4.683.202 (Mullis, et al.). Sin embargo, las condiciones óptimas de PCR que se utilizan para cada reacción de amplificación se determinan en general de manera empírica o se estima con un software de computadora que se emplea comúnmente por los expertos en el campo. Varios parámetros tienen influencia en el éxito de la reacción. Entre estos están la temperatura de hibridación y el tiempo, el tiempo de extensión, el Mg²⁺, pH y la concentración relativa de cebadores, matrices y desoxirribonucleótidos. En general, la matriz de ácido nucleico se desnaturiza por calor hasta de al menos aproximadamente 95 °C durante 1 a 10 minutos antes de la reacción de polimerasa. Aproximadamente se ejecutaron 20-99 ciclos de amplificación utilizando la desnaturización a un intervalo de 90 °C a 96 °C durante 0,05 a 1 minuto, hibridación a una temperatura que varía desde 48 °C a 72 °C durante 0,05 a 2 minutos, y de extensión a

68 °C a 75 °C durante al menos 0,1 minutos con un ciclo final óptimo. En una realización, una reacción PCR puede contener aproximadamente 100 ng de matriz de ácido nucleico, 20 uM de cebadores corriente arriba y corriente abajo, y 0,05 a 0,5 mm de dNTP de cada tipo, y 0,5 a 5 unidades de ADN polimerasas termoestables disponibles en el mercado.

- 5 Una variación de la PCR convencional es la reacción PCR de transcripción inversa (RT-PCR), en la que primero una transcriptasa inversa convierte moléculas de ARN en moléculas de ADNc de cadena sencilla, que se emplea entonces como la matriz para la amplificación posterior en la reacción en cadena de la polimerasa. El aislamiento de ARN se conoce bien en la técnica. Para llevar a cabo la RT-PCR, la transcriptasa inversa se añade generalmente a la muestra de reacción tras desnaturalizarse el ácido nucleico diana por calor. La reacción se mantiene entonces a una temperatura adecuada (por ejemplo, de 30-45 °C) durante una cantidad de tiempo suficiente (10-60 minutos) para generar la matriz de ADNc antes de que tuvieran lugar los ciclos de amplificación programados. Un experto habituado en la técnica apreciará que si se desea un resultado cuantitativo, se tiene que tener cuidado de utilizar un método que mantenga o controle las copias relativas del ácido nucleico amplificado. Los métodos de amplificación cuantitativa" se conocen bien por los expertos en la técnica. Por ejemplo, una PCR cuantitativa puede implicar simultáneamente la co-amplificación de una cantidad conocida de una secuencia de control utilizando los mismos cebadores. Esto proporciona una referencia interna que se puede utilizar para calibrar la reacción de PCR.
- 10 Otra alternativa de PCR es la PCR cuantitativa (qPCR). La qPCR se puede ejecutar por técnicas competitivas que emplean un control homólogo interno que se diferencia de tamaño de la diana por una pequeña eliminación o inserción. Sin embargo, también se pueden utilizar las PCR cuantitativas no competitivas y cinéticas. La combinación de detección por PCR cinética, en tiempo real junto con un control interno homólogo que se pueden detectar simultáneamente junto con las secuencias diana puede ser ventajosa.
- 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65
- Los cebadores para la PCR, RT-PCR y/o PCR se seleccionan de regiones o bacterias específicas que solo amplificarán una región de ADN que se selecciona para ese organismo específico. De manera alternativa, se seleccionan cebadores que se hibridarán y amplificarán una sección de ADN que es común para todos los organismos. La selección y construcción de cebadores se conoce en general en la técnica. En general, un cebador se localiza en cada extremo de la secuencia que se va a amplificar. Dichos cebadores normalmente tendrán entre 10 a 35 nucleótidos de longitud y tienen una longitud preferida de entre 18 a 22 nucleótidos. La secuencia menor que se puede amplificar es aproximadamente de 50 nucleótidos de longitud (por ejemplo, un cebador directo e inverso, ambos de 20 nucleótidos de longitud, cuya localización en las secuencias se separa por al menos 10 nucleótidos). Se pueden amplificar secuencias mucho más largas. Un cebador se denomina "cebador directo" y se localiza en el extremo izquierdo de la región que se va a amplificar. El cebador directo es idéntico en secuencia a una región en la cadena superior del ADN (cuando se representa un ADN de doble cadena utilizando la convención en la que la cadena superior se muestra con polaridad en la dirección 5' a 3'). La secuencia del cebador directo es de tal manera que se hibrida a la cadena del ADN que es complementaria a la cadena superior del ADN. El otro cebador se denomina "cebador inverso" y se localiza en el extremo derecho de la región que se va a amplificar. La secuencia de la región en la cadena superior del ADN es complementaria en secuencia a, es decir, es la complementaria inversa de una secuencia en, una región de la cadena superior del ADN. El cebador inverso se hibrida al extremo superior del ADN. Los cebadores de PCR deberían escogerse según varias de otras condiciones. Los cebadores de PCR deberían ser suficientemente largos (preferentemente de 10 a 30 nucleótidos de longitud) para minimizar la hibridación mayor que una región de la matriz. Los cebadores con largas repeticiones de una única base se deberían evitar, si es posible. Los cebadores deberían tener preferentemente un porcentaje de contenido G+C de entre 40 y 60 %. Si es posible, el porcentaje de contenido en G+C del extremo 3' del cebador debería ser mayor que el porcentaje de G+C en el extremo 5' del cebador. Los cebadores no deberían contener secuencias que puedan hibridarse con otras secuencias del cebador (es decir, palíndromos). Dos cebadores que se utilicen en la misma reacción de PCR no deberían ser capaces de hibridarse entre ellos. Aunque los cebadores de PCR se escogen preferentemente según las recomendaciones anteriores, no es necesario que los cebadores cumplan estas condiciones. Otros cebadores pueden funcionar, pero tienen una oportunidad menor de producir buenos resultados.
- Los cebadores de PCR que se pueden utilizar para amplificar ADN en una secuencia determinada se pueden escoger utilizando uno de varios programas de computadora que están disponibles. Dichos programas escogen cebadores que son óptimos para la amplificación de una determinada secuencia (es decir, dichos programas escogen cebadores según las condiciones establecidas anteriormente, más otras condiciones que pueden maximizar la funcionalidad de los cebadores de PCR). Un programa de computadora es el paquete de análisis Genetics Computer Group (GCG convertido recientemente en Accelrys) que tiene una rutina para la selección de cebadores de PCR.
- Los cebadores o sondas oligonucleotídicos desvelados posteriormente se pueden fabricar de distintas maneras. Una manera para fabricar estos oligonucleótidos es sintetizarlos utilizando un sintetizador de ácidos nucleicos disponible en el mercado. Existe una variedad de dichos sintetizadores y son bien conocidos por los expertos en la técnica.
- También se pueden detectar ácidos nucleicos por métodos de hibridación. En estos métodos, el ácido nucleico marcado se puede añadir a un sustrato que contiene sondas de ácido nucleico marcadas o no marcadas. De manera alternativa, el ácido nucleico marcado o no marcado se puede añadir a un sustrato que contenga las sondas

de ácido nucleico marcadas o no marcadas. Los métodos de hibridación se desvelan, por ejemplo, en Micro Array Analysis, Marc Schena, John Wiley and Sons, Hoboken N.J. 2003.

- 5 Los métodos de detección de ácidos nucleicos pueden incluir el uso de un marcador. Por ejemplo, se pueden detectar radiomarcadores utilizando una película fotográfica o un detector de imagen fosfoestimulable (para detectar y cuantificar la incorporación de fosfato radioactivo). Se pueden detectar y cuantificar marcadores fluorescentes utilizando un fotodetector para detectar la luz emitida (véase la Pat. de EE. UU N.º 5.143.854 para un aparato ejemplar) Los marcadores enzimáticos se detectan normalmente proporcionando la enzima con un sustrato y midiendo el producto de reacción producido por la acción de la enzima sobre el sustrato. Los marcadores
10 colorimétricos se detectan visualizando simplemente el marcador coloreado. En una realización, las moléculas de ácido nucleico amplificado se visualizan por tinción directa de los productos amplificados con un ácido nucleico intercalado con el colorante. Como es evidente para un experto en la técnica, los colorantes ejemplares incluyen pero no se limitan a SYBR verde, SYBR azul, DAPI, yoduro de propidio, y bromuro de etidio. La cantidad de
15 colorantes luminiscentes intercalados en las moléculas de ADN amplificado es directamente proporcional a la cantidad de productos amplificados, que se pueden cuantificar convenientemente utilizando dispositivos de detección convencionales de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una variación de dicha estrategia es la electroforesis en gel de los productos amplificados seguida por la tinción y visualización del colorante intercalado seleccionado. De manera alternativa, las sondas de hibridación oligonucleotídicas marcadas (por ejemplo, sondas fluorescentes tales como las sondas de transferencia de energía de resonancia fluorescentes (FRET) y sondas
20 colorimétricas) se pueden utilizar para detectar la amplificación. Cuando se deseé, se puede verificar una amplificación específica de las secuencias genómicas representativas de la entidad biológica que se va a ensayar, secuenciando o demostrando que los productos amplificados tienen el tamaño previsto, presentan el patrón de digestión por restricción previsto, o se hibridan con las secuencias nucleotídicas clonadas correctas.
- 25 La presente divulgación también comprende kits. Por ejemplo, el kit puede comprender un sustrato que contienen una molécula de ácido nucleico para la actividad de la enzima o mezcla de enzimas seleccionada en la muestra (mientras que no se permiten las señales de interferencia de señales de la ADN polimerasa), medios de incubación para incubar la muestra y el sustrato en condiciones adecuadas para la actividad enzimática, y medios para determinar específicamente la presencia (y/o la cantidad) de una molécula de ácido nucleico que resulta de la acción
30 de la enzima o mezcla seleccionada sobre el sustrato de molécula de ácido nucleico (como una indicación de la presencia del microorganismo). Dicho kit también comprende otros reactivos adecuados para llevar a cabo los nuevos métodos de la invención, para explorar normalmente fluidos corporales estériles en cuanto a la presencia o ausencia de microorganismos en la misma y proporcionar una información diagnóstica, del pronóstico del manejo del paciente, así como cebadores útiles para amplificar la molécula de ácido nucleico correspondiente a organismos
35 específicamente o generalmente, tampones y reactivos para aislar el ADN, y reactivos para la PCR. El kit puede incluir adicionalmente oligonucleótidos marcados de manera detectable, que se hibridan con una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido correspondiente a los organismos de interés. El kit puede contener también una muestra de control o una serie de muestras de control que se pueden ensayar y comparar con una muestra de ensayo contenida. Cada componente del kit se puede envasar en un envase individual y los distintos envases
40 pueden estar en un único paquete, junto con las instrucciones para interpretar los resultados de los ensayos que se llevan a cabo utilizando el kit.

También se tiene que apreciar que los métodos proporcionados por la invención comprende adicionalmente llevar a cabo el análisis de secuencia del genoma y/o transcriptoma parcial o completo del microorganismo utilizando los principios y enseñanzas proporcionadas en el presente documento, y donde el análisis de secuencia del transcriptoma y/o genoma completo o parcial del microorganismo se puede llevar a cabo simultáneamente, de manera concertada, o en paralelo utilizando una preparación de muestra única como se ha descrito en el presente documento. También se tiene que apreciar que los nuevos métodos del presente documento de la invención pueden proporcionar la medición y detección de agentes con actividad antimicrobiana y/o antipolimerasa, útiles en el manejo de pacientes.
50

La descripción detallada anterior se ha dado solo para clarificar el entendimiento y no se deberían deducir innecesarias limitaciones de la misma ya que habrá modificaciones obvias para los expertos en la técnica. No es una admisión de que cualquier información proporcionada en el presente documento sea técnica anterior o relevante para la invención reivindicada actualmente, o que cualquier publicación referenciada específicamente o implícitamente sea una técnica anterior.
55

A menos de que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que la presente invención pertenece.
60

Aunque la presente invención se ha descrito en detalle, los ejemplos específicos del presente documento se proporcionaron a modo de ilustración específica de realizaciones de la invención y con el objetivo de clarificar el entendimiento. Será fácilmente evidente para los expertos habituados en la técnica, a la luz de las enseñanzas de la presente invención como se exponen en el presente documento, que se pueden hacer muchos cambios y modificaciones en estas realizaciones descritas de esta manera sin alejarse del espíritu o alcance de la invención.
65

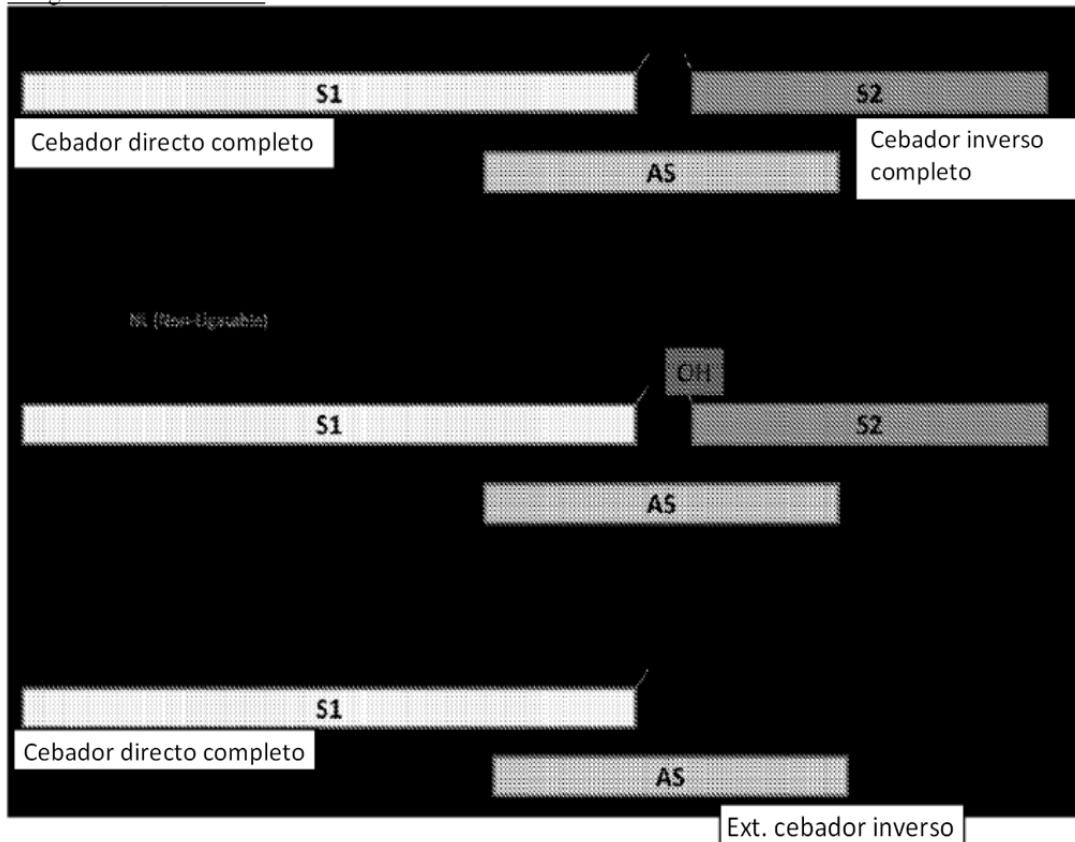
- Aunque la invención se ha descrito en conexión con realizaciones específicas de la misma, se entenderá que son posibles modificaciones adicionales y que esta solicitud pretende cubrir cualquiera de las variaciones, usos, o adaptaciones de la invención que sigan, en general, los principios de la invención y que incluyan dichos alejamientos de la presente divulgación que vengan por la práctica conocida o a medida en la técnica a la que la invención pertenece y que se puedan aplicar a las características esenciales expuestas anteriormente y que sigan en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.
- 5

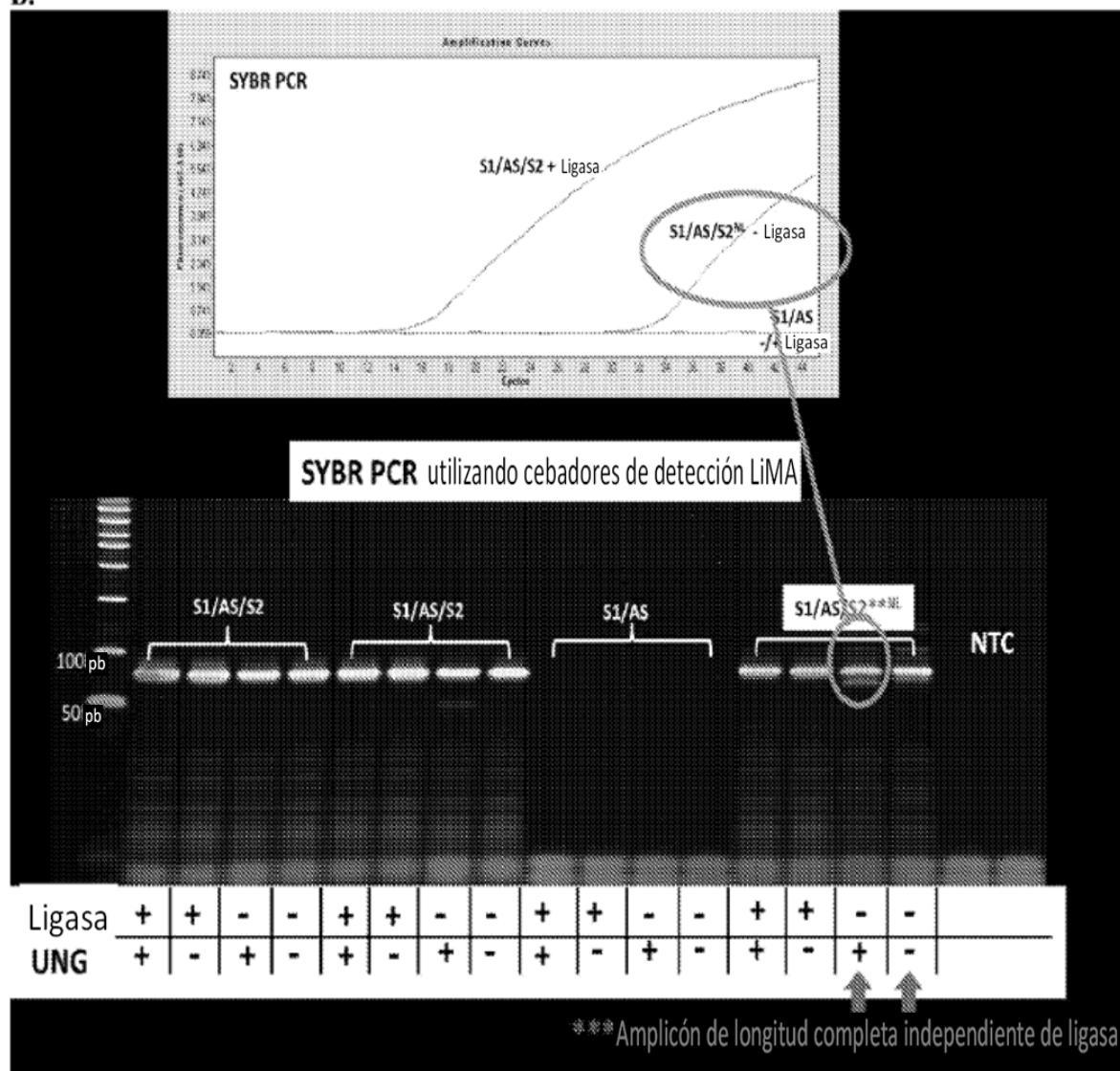
REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para detectar la presencia de un microorganismo en una muestra, donde se detecta la actividad de la ADN polimerasa como indicador de la presencia de dicho microorganismo en dicha muestra, cuyo método comprende:
 - (a) poner en contacto la muestra con una molécula de ADN que actúa como un sustrato para la actividad ADN polimerasa en la muestra;
 - (b) incubar la muestra que se pone en contacto de esta manera en condiciones adecuadas para la actividad polimerasa; y
 - (c) determinar específicamente la presencia (y/o cantidad) de una molécula de ácido nucleico que resulta de la acción de la ADN polimerasa del microorganismo sobre el sustrato por amplificación de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico, para indicar de esta manera la presencia del microorganismo.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, donde el microorganismo detectado es un microorganismo viable de la muestra.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, donde el microorganismo detectado es un microorganismo intacto en la muestra.
- 20 4. El método de la reivindicación 3, donde el microorganismo intacto detectado es uno en el que el gen de la ADN polimerasa y su polimerasa proteica traducida activa son esenciales para la viabilidad del microorganismo.
- 25 5. El método de la reivindicación 1, donde el sustrato de la polimerasa está inmovilizado.
- 30 6. El método de la reivindicación 1, donde la muestra en la que se detecta el microorganismo es un fluido corporal normalmente estéril.
- 35 7. El método de la reivindicación 1, donde la muestra se prepara utilizando un método de preparación de muestra con lisis celular diferencial, permitiendo de esa manera que solo la actividad de polimerasa derivada de un microorganismo viable modifique el sustrato específico de polimerasa.
- 40 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la muestra en la cual se detecta el microorganismo se prepara a partir de lisados celulares en bruto o fracciones celulares purificadas.
- 45 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el método comprende además llevar a cabo un análisis de secuencia del genoma y/o transcriptoma completo o parcial del microorganismo.
10. El método de la reivindicación 9, donde el análisis de la secuencia del genoma y/o transcriptoma completo o parcial del microorganismo se puede llevar a cabo simultáneamente, de manera concertada, o en paralelo utilizando una única preparación de la muestra.
11. El método de la reivindicación 9, donde el análisis de la secuencia del genoma y/o transcriptoma completo o parcial del microorganismo comprende además un método para la medida diagnóstica y detección de agentes con actividad antimicrobiana y/o antipolimerasa útiles para el manejo de los pacientes.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 donde la muestra comprende una muestra de sangre o cultivo sanguíneo.

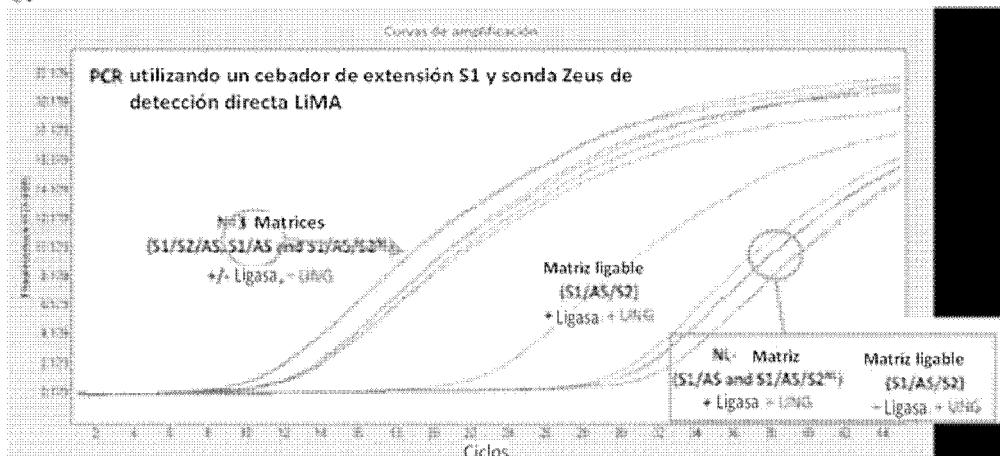
Figura 1**A.**

Diagramas de la matriz



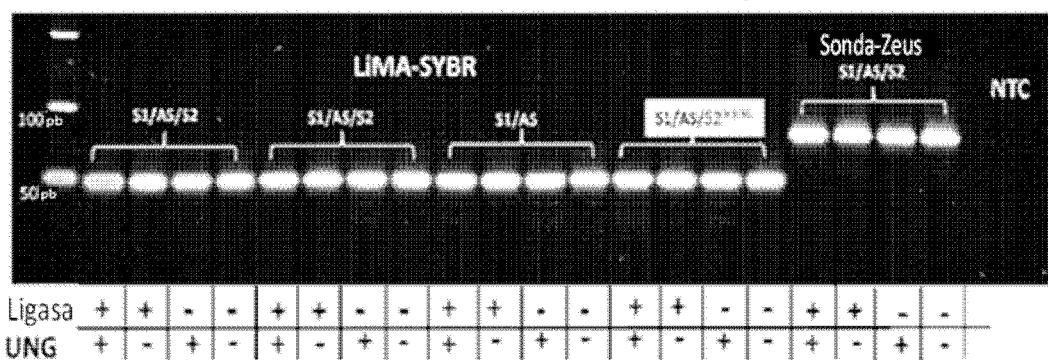
B.

C.



Análisis en gel de las curvas anteriores:

PCR utilizando un cebador inverso de extensión S1 y LiMA directa



D.

Detección de extensión S1 utilizando 3 ADN polimerasas comerciales

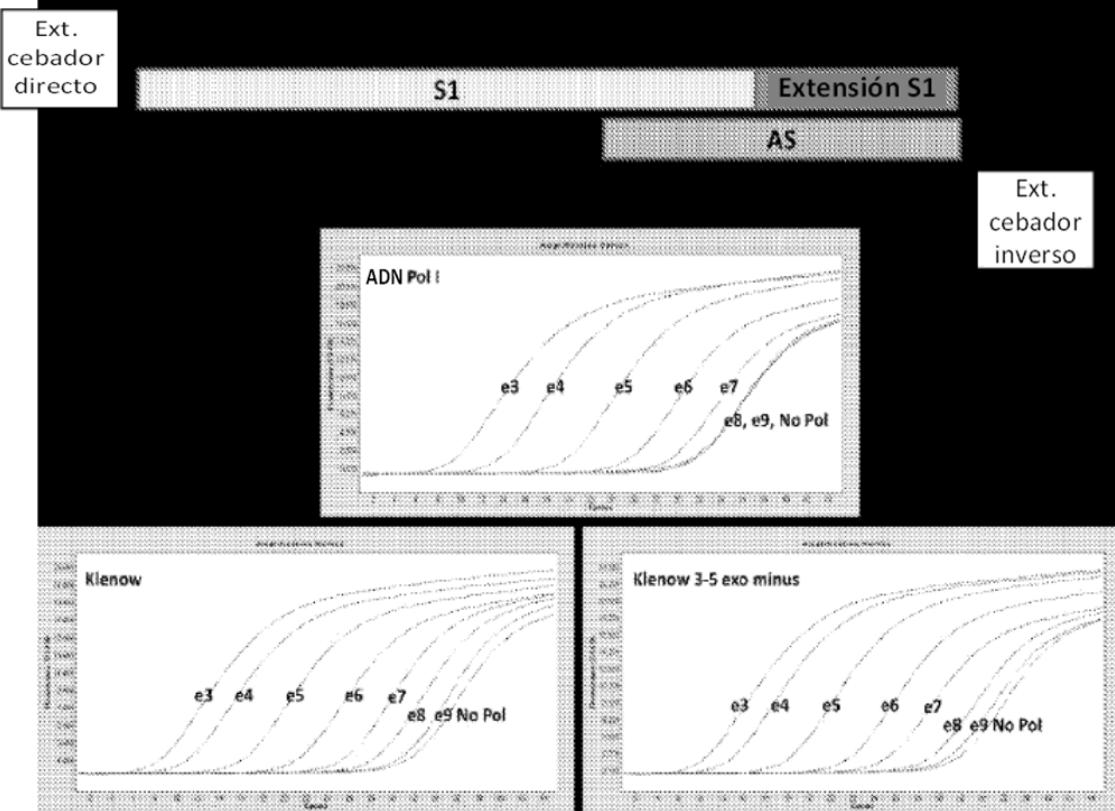
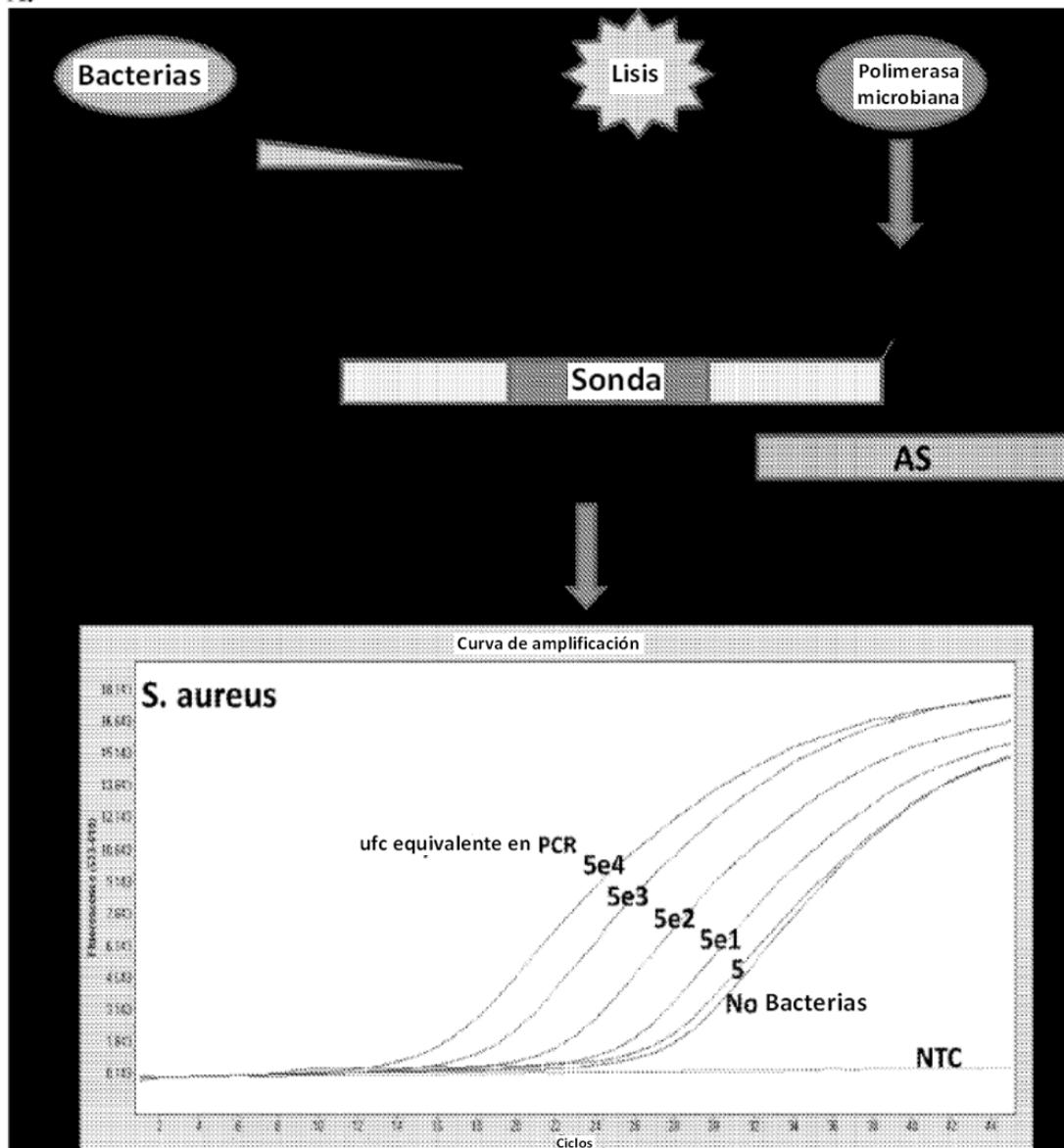
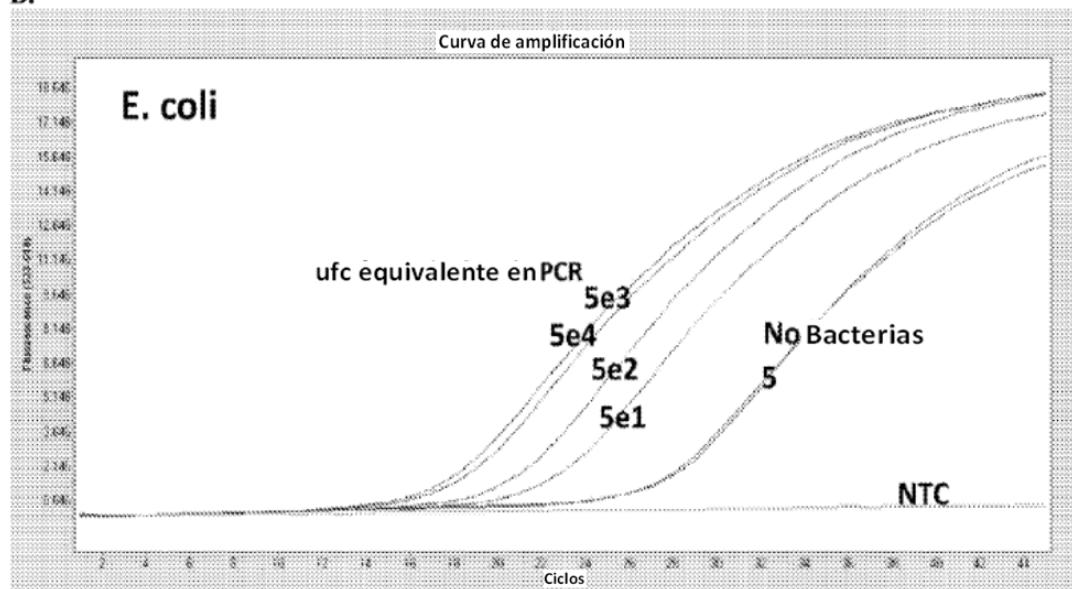
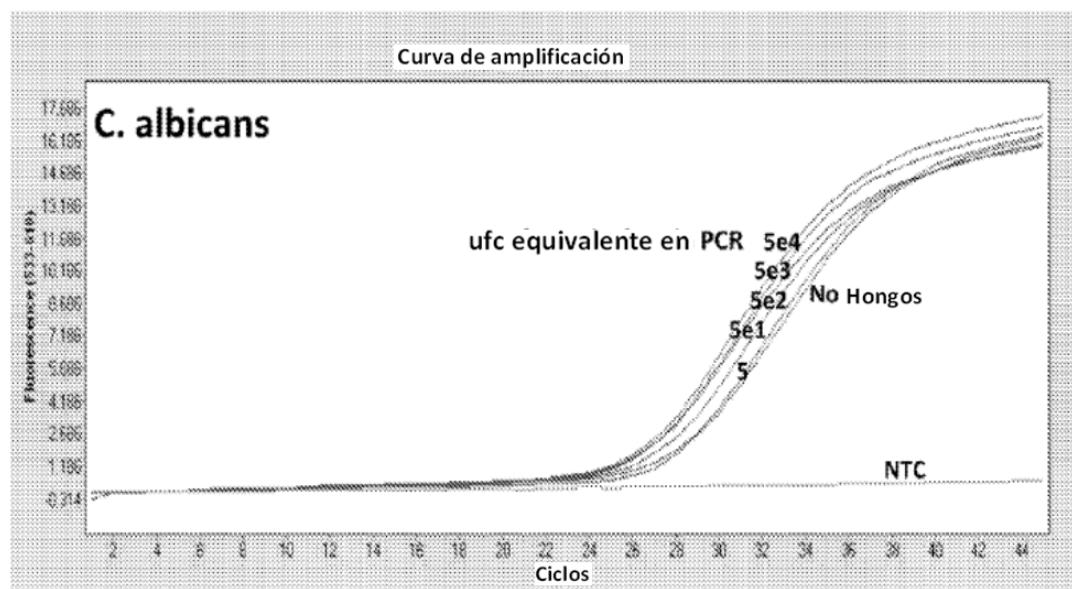


Figura 2**A.**

B.



C.



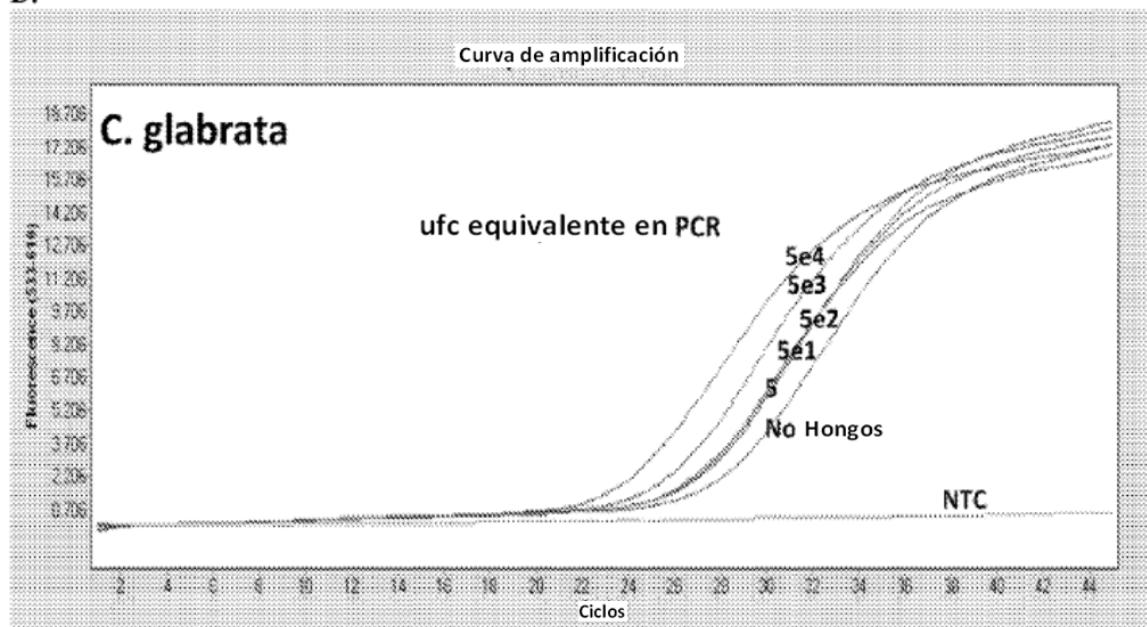
D.

Figura 3