



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 349 090**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03782268 .1**

96 Fecha de presentación : **02.12.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1570079**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.09.2005**

54 Título: **Ensayo multiplex de detección de organismos patogénicos.**

30 Prioridad: **06.12.2002 EP 02027272**
04.04.2003 EP 03007458

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.12.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.12.2010

73 Titular/es: **ROCHE DIAGNOSTICS GmbH**
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, DE
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG. y
INNOGENETICS N.V.

72 Inventor/es: **Moczko, Martin;**
Haberhausen, Gerd;
Sagner, Gregor;
Emrich, Thomas y
Schmitz-Agheguian, Gudrun

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 349 090 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).

ENSAYO MULTIPLEX DE DETECCIÓN DE ORGANISMOS PATOGÉNICOS

5 Descripción

La invención se refiere al campo técnico de la
detección de organismos microbianos patogénicos. Más
específicamente, la invención se refiere al campo de la
detección de una infección causada por un organismo
10 patogénico en un espécimen clínico por medio de la
amplificación y detección de secuencias específicas de
ácidos nucleicos de dicho organismo patogénico.

Antecedentes de la técnica

La infección por bacterias patogénicas, particularmente
15 en el caso de que provoquen sepsis, ocurre predominantemente
y en forma grave en unidades de cuidados intensivos (UCI) de
hospitales. La bacteria que infecta al paciente es, en la
mayoría de casos, desconocida y no puede determinarse a
partir de los síntomas. Cada bacteria requiere una terapia
20 diferente utilizando la administración de un antibiótico
específico. En la actualidad, en el diagnóstico rutinario,
las bacterias patogénicas, particularmente las bacterias
Gram-positivas, se detectan utilizando un método que incluye
someter una muestra de sangre o de otro líquido corporal al
25 cultivo de la bacteria, en caso de encontrarse presente.
Este cultivo se mantiene bajo condiciones que favorecen el
crecimiento bacteriano durante aproximadamente tres días.
Durante este tiempo, se incrementa el número de bacterias y
de esta manera de sus ácidos nucleicos. A continuación, se
30 somete a lisis el medio de cultivo. La mezcla de lisis se
utiliza como la muestra para los análisis bioquímicos o

inmunológicos posteriores. El método general requiere como mínimo aproximadamente cuatro días hasta alcanzar una conclusión clara respecto a cualquier infección de la muestra por parte de bacterias patogénicas. La infección por bacterias patogénicas es muy grave para la persona infectada. Dentro del primer día de la infección debe iniciarse una terapia, preferentemente mediante la administración de un antibiótico adecuado para afectar específicamente a la bacteria infecciosa particular. De lo contrario, la persona resultará excesivamente afectada por la infección y podría morir antes de alcanzar una conclusión sobre la infección. Por otra parte, la administración de varios antibióticos de amplio rango simultáneamente para prevenir sucesos sistémicos debe evitarse para no debilitar al paciente. De esta manera, los actuales métodos no resultan satisfactorios para el diagnóstico rutinario en la UCI.

La identificación de organismos patogénicos, tales como bacterias patogénicas u hongos por medio de la hibridación basada en ácidos nucleicos utilizando sondas de hibridación específicas ha sido conocida de la técnica desde hace mucho tiempo. Por ejemplo, la patente EP nº 0 131 052 da a conocer métodos y sondas en las que se detectan secuencias de ácido ribonucleico ribosómico (ARNr) de una especie determinada o de un grupo determinado de organismos directamente a partir del medio de cultivo. La detección de secuencias diana ribosómicas resulta especialmente útil debido al hecho de que estas secuencias se amplifican *in vivo*, resultando en una sensibilidad elevada del ensayo respectivo.

Se consiguió una mejora de la detección basada en la secuencia de ácidos nucleicos de los organismos patogénicos con la disponibilidad de la tecnología de PCR. Para la detección de hongos patogénicos, tales como *Candida* y *Aspergillus*, por ejemplo, la patente WO n° 97/07238 da a conocer un método que utiliza cebadores genéricos para amplificar todos los tipos de secuencia de ADNr 18S ribosómico y la hibridación posterior con sondas específicas de especies fúngicas.

10 A modo de alternativa al análisis de secuencias génicas ribosómicas, se han utilizado secuencias de ADN espaciador ribosómicas no codificantes pero transcritas, tales como la región ITS-1 situada entre los genes de ARNr 16S y 23S, para la detección e identificación de algunos organismos patogénicos (ver, por ejemplo, la patente EP n° 0 452 596).

En otro contexto, los grupos de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas han sido discriminadas por medio de una amplificación dependiente de diana comparable a un enfoque de amplificación específica de alelo (Klausegger A. *et al.*, J. Clin. Microbiol. 37:464-466, 1999). Basándose en sus secuencias de ADNr 16S, las especies investigadas por Klausegger *et al.* difieren en una posición dada del gen de ARNr 16S en que todas las bacterias Gram-negativas investigadas contienen un residuo G en una posición nucleotídica determinada, mientras que todas las bacterias Gram-positivas investigadas siempre contienen un residuo C en dicha posición nucleotídica. En consecuencia, la utilización de cebadores apropiados que presentan un residuo de C 3'-terminal complementario discriminante o un residuo G

complementario, respectivamente, resulta en la amplificación de ADN de origen de secuencia Gram-positivo o Gram-negativo.

Se han realizado avances adicionales con la disponibilidad de la PCR en tiempo real cinética. En este tipo de ensayo, se realiza un seguimiento de la formación de productos de PCR en cada ciclo de la PCR. La amplificación habitualmente se mide en termocicladores que presentan un medio de detección adicional para el seguimiento de señales de fluorescencia durante la reacción de amplificación. Un ejemplo típico es el Roche Diagnostics LightCycler™ (nº de cat. 2 0110468). En el LightCycler™, así como en otros instrumentos de PCR en tiempo real disponibles comercialmente hasta el momento, los productos de amplificación se detectan por medio de sondas de hibridación marcadas fluorescentemente que únicamente emiten señales de fluorescencia cuando se encuentran unidas al ácido nucleico diana o en determinados casos también por medio de pigmentos fluorescentes que se unen a ADN de doble cadena. Se determina un umbral de señal definido para todas las reacciones que deben analizarse y se determina el número de ciclos (Cp) requerido para alcanzar este valor umbral para el ácido nucleico diana, así como para los ácidos nucleicos de referencia, tales como un gen estándar o un gen de mantenimiento. Pueden determinarse los números de copia absolutos o relativos de la molécula diana basándose en los valores de Cp obtenidos para el ácido nucleico diana y para el ácido nucleico de referencia (manual de operador de Roche Diagnostics LightCycler™ (nº de cat. 2 0110468)).

Existen formatos diferentes para la detección de ADN amplificado:

a) formado de pigmento de unión a ADN

Debido a que la cantidad de producto de amplificación de doble cadena habitualmente excede la cantidad de ácido nucleico presente originalmente en la muestra que debe analizarse, pueden utilizarse pigmentos específicos de ADN de doble cadena, que tras excitarse con una longitud de onda apropiada muestran fluorescencia incrementada únicamente en el caso de que se encuentren unidos a ADN de doble cadena. Este tipo de método se describe en la patente EP nº 0 512 334. Preferentemente únicamente se utilizan aquellos pigmentos, tales como, por ejemplo, verde SYBR® I, que no afectan a la eficiencia de la reacción de PCR.

Todos los demás formatos conocidos de la técnica requieren el diseño apropiado de una sonda de hibridación marcada fluorescentemente que únicamente emita fluorescencia tras la unión a su ácido nucleico diana.

b) Sondas TaqMan™

Se marca con dos componentes una sonda de hibridación de una cadena. Al excitarse el primer componente, denominado fluorescente, con luz de una longitud de onda adecuada, la energía absorbida se transfiere al segundo componente, el denominado inhibidor, según el principio de transferencia de energía fluorescente resonante. Durante la etapa de hibridación de la reacción de PCR, la sonda de hibridación se une al ADN diana y resulta degradada por la actividad 5' a 3' exonucleasa de la polimerasa, por ejemplo la polimerasa Taq, durante la etapa de alargamiento. Como resultado, el

componente fluorescente excitado y el inhibidor se encuentran separados espacialmente entre sí y, de esta manera, puede medirse una emisión de fluorescencia del primer componente (patente EP n° 0 543 942 y patente US n° 5.210.015).

c) Balizas moleculares

Estas sondas de hibridación también se marcan con un primer componente y con un inhibidor, estando situados los marcajes preferentemente en diferentes extremos de una sonda por lo menos parcialmente autocomplementaria. Como resultado de la estructura secundaria de la sonda, ambos componentes se encuentran en vecindad espacial en solución. Tras la hibridación a los ácidos nucleicos diana, ambos componentes se separan uno de otro de manera que, tras la excitación con luz de una longitud de onda adecuada, puede medirse la emisión fluorescente del primer componente (patente US n° 5.118.801).

d) Sondas de hibridación FRET

El formato de ensayo de sonda de hibridación de transferencia de energía fluorescente resonante (FRET) resulta especialmente útil para todos los tipos de ensayo de hibridación homogénea (Matthews J.A. y Kricka L.J., Anal. Biochem. 169:1-25, 1988). Se caracteriza por dos sondas de hibridación de una cadena que se utilizan simultáneamente y que son complementarios a sitios contiguos de la misma cadena de un ácido nucleico diana (amplificado). Se marcan ambas sondas con diferentes componentes fluorescentes. Al resultar excitados con luz de una longitud de onda adecuada, un primer componente transfiere la energía absorbida al

segundo componente según el principio de transferencia de energía fluorescente resonante, de manera que puede medirse una emisión fluorescente del segundo componente únicamente en el caso de que ambas sondas de hibridación se unan a 5 posiciones contiguas de la molécula diana que debe detectarse.

Al hibridarse a la secuencia diana, las sondas de hibridación deben encontrarse localizadas muy próximas entre sí, en una disposición de cabeza con cola. Habitualmente, el 10 espacio entre el extremo 3' marcado de la primera sonda y el extremo 5' marcado o la segunda sonda es tan reducido como resulte posible, es decir, de 1 a 5 bases. Esto permite que exista una estrecha proximidad espacial del compuesto donante de FRET y el compuesto aceptor de FRET, que 15 típicamente es de entre 10 y 100 Ångstroms. Los datos particulares son bien conocidos y se dan a conocer en, por ejemplo, la patente EP n° 0 070 687.

Alternativamente al seguimiento del incremento de fluorescencia del componente aceptor de FRET, también 20 resulta posible realizar un seguimiento de la reducción de la fluorescencia del componente donante de FRET como medición cuantitativa del suceso de hibridación.

En particular, puede utilizarse el formato de sonda de hibridación de FRET en la PCR en tiempo real con el fin de 25 detectar el ADN diana amplificado. De entre todos los formatos de detección conocidos de la técnica de la PCR en tiempo real, el formato de sonda de hibridación-FRET ha demostrado ser altamente sensible, exacto y fiable (patentes WO n° 97/46707, n° 97/46712 y n° 97/46714). Sin embargo, el

diseño de secuencias de sonda de hibridación de FRET apropiadas en ocasiones se encuentra limitado por las características especiales de la secuencia de ácidos nucleicos diana que debe detectarse.

5 A modo de alternativa a la utilización de dos sondas de hibridación de FRET, también resulta posible utilizar un cebador marcado fluorescentemente y únicamente una sonda oligonucleótida marcada (Bernard P.S. *et al.*, Anal. Biochem. 255:101-7, 1998). A este respecto, puede seleccionarse
10 arbitrariamente si se marca el cebador con el compuesto donante de FRET o con el compuesto aceptor de FRET.

Las sondas de hibridación de FRET (también denominadas sondas FRET-Hybprobes o sondas FRET) también pueden utilizarse para el análisis de la curva de fusión (patentes
15 WO n° 97/46707, n° 97/46712 y n° 97/46714). En este tipo de ensayo, el ácido nucleico diana en primer lugar se amplifica en una reacción de PCR típica con cebadores de amplificación adecuados. Las sondas de hibridación ya podrían encontrarse presentes durante la reacción de amplificación o añadirse
20 posteriormente. Tras completarse la reacción de PCR, se incrementa constitutivamente la temperatura de la muestra. Se detecta fluorescencia en el caso de que la sonda de hibridación se encuentre unida al ADN diana. A la temperatura de fusión, se libera la sonda de hibridación de
25 su diana y se reduce la señal fluorescente hasta el nivel de fondo. Se realiza un seguimiento de esta reducción con un gráfico apropiado de fluorescencia frente a temperatura-tiempo, de manera que puede calcularse la negativa de una primera función derivada. El valor de temperatura

correspondiente al máximo obtenido de dicha función se considera la temperatura de fusión determinada de dicha pareja de sondas de hibridación FRET.

Las mutaciones puntuales o polimorfismos dentro del
5 ácido nucleico diana resultan en una complementariedad inferior al 100% entre el ácido nucleico diana y las sondas FRET, resultando de esta manera en una temperatura de fusión reducida. Esto permite una detección común de un grupo de variantes de secuencia por medio de la hibridación de sondas
10 FRET-Hybprobe, mientras que posteriormente puede discriminarse entre diferentes miembros de dicho grupo mediante la realización de un análisis de curva de fusión. En lugar de sondas de hibridación FRET alternativamente pueden utilizarse balizas moleculares para el análisis de
15 curva de fusión.

Con la disponibilidad de la PCR en tiempo real y el análisis de curvas de fusión de PCR en tiempo real homogénea, se posibilita la discriminación de determinados tipos de especie o cepa utilizando pigmentos de unión a ADN
20 de doble cadena, tales como verde SybrTM I o, alternativamente, sondas de hibridación diseñadas específicamente que se hibridan a secuencias diana diferentes aunque similares.

En el primer caso, debe determinarse la temperatura e
25 fusión del producto de PCR de doble cadena generado. Sin embargo, este método únicamente presenta aplicaciones limitadas debido a que variaciones menores de la secuencia sólo resultan en diferencias sutiles de la temperatura de fusión, el seguimiento de las cuales no puede realizarse

eficientemente. Un ejemplo exitoso ha sido dado a conocer por Woo T.H. et al., J. Microbiol. Methods 35:23-30, 1999, quienes llevaron a cabo la amplificación de secuencias de ADNr 16S de *Leptospira biflexa* y el análisis posterior de la
5 curva e fusión utilizando verde Sybr™ I como pigmento de unión al ADN con el fin de discriminar cepas de *Leptospira biflexa* de productos de amplificación no específicos originados a partir de ADN de diferentes especies de *Leptospira*.

10 Alternativamente, pueden utilizarse sondas de hibridación de manera que se determine la temperatura de fusión del híbrido de ácidos nucleicos de sonda/diana. Por ejemplo, Espy M.J. et al., J. Clin. Microbiol. 38:795-799, 2000, dan a conocer el diagnóstico de infecciones por *Herpes simplex*
15 *simplex* por medio de la amplificación de una secuencia de *Herpes simplex* y el análisis posterior utilizando sondas de hibridación FRET para discriminar entre los genotipos del HSV de tipo I y del HSV de tipo II.

Además, la patente WO n° 01/48237 sugiere en general la
20 conexión entre la amplificación y la hibridación dependiente de la temperatura para detectar diferentes especies patogénicas. Sin embargo, la patente WO n° 01/48237 no enseña ningún método o condición que permita una detección exclusiva de organismos patogénicos, sino la no detección de
25 organismos no patogénicos.

Silva et al., Biochemica Mannheim DE n° 2, páginas 12 a 15, 1998, describen el genotipado y cuantificación rápidos en el LightCycler con sondas de hibridación.

Ririe *et al.*, Analytical Biochemistry 245(2):154-160, 1997, dan a conocer la diferenciación de productos mediante el análisis de curvas de fusión de ADN durante la PCR.

La patente WO n° 96/00298 A se refiere a la detección
5 de bacterias patogénicas con un ensayo basado en la hibridación denominado ensayo de sonda lineal (LiPA). En este formato, las sondas se inmovilizan sobre una tira de membrana y se hibridan todas a una temperatura común.

La patente WO n° 02/53771 da a conocer la
10 identificación de *E. coli* patogénicas, en la que se utilizan métodos de amplificación en tiempo real. También se menciona la utilización del análisis de curvas de fusión.

Incluso los métodos utilizados actualmente que incluyen la amplificación *in vitro* de especies bacterianas
15 específicas y la detección posterior de dicha bacteria no resultan útiles para casos en los que resulta necesario el diagnóstico urgente, por ejemplo en una UCI, debido a que para cada bacteria resulta necesario llevar a cabo una reacción de amplificación y una reacción de detección. Esto
20 requiere la extracción de un volumen elevado de muestra, tal como sangre, de cada paciente. En la UCI no se dispone de grandes volúmenes de muestra de pacientes infectados severamente.

De esta manera, existe una necesidad en la técnica de
25 proporcionar métodos que sean específicamente aplicables a la detección de organismos patogénicos relevantes de interés en un volumen tan reducido como resulte posible. En particular, existe una necesidad en la técnica de un método que permita la detección de todas las bacterias Gram-

positivas patogénicas relevantes pero que simultáneamente no detecte bacterias Gram-positivas no patogénicas similares. En particular existe una necesidad de determinar qué género y/o especie patogénica se encuentra presente en una muestra.

5 Breve descripción de la invención

El problema dado a conocer anteriormente se resuelve mediante métodos dados a conocer y reivindicados en la presente solicitud.

10 En general, la presente invención se refiere a un método para la identificación de un organismo patogénico de un grupo predeterminado de patógenos, que comprende:

a) aislar una muestra clínica que contiene ácidos nucleicos purificados por lo menos parcialmente,
b) someter por lo menos una primera alícuota de dicho espécimen clínico a por lo menos una reacción de
15 amplificación y detección en un recipiente de reacción, que comprende:

ba) una etapa de amplificación utilizando por lo menos un primer conjunto de cebadores de
20 amplificación capaces de amplificar una región espaciadora 16s/23s ó 18s/26s preseleccionada de entre varios o todos los miembros de dicho grupo predeterminado de patógenos,

bb) una etapa de detección utilizando por lo menos
25 2, 3 ó múltiples reactivos de hibridación, siendo dichos reactivos capaces conjuntamente de detectar una región espaciadora 16s/23s ó 18s/26s preseleccionada de entre todos los miembros de

dicho grupo de patógenos, comprendiendo dicha etapa de detección bb) las etapas:

5 bba) seguimiento de la hibridación de dichos reactivos de hibridación a una temperatura preseleccionada, siendo dicha hibridación indicativa de por lo menos el género de dicho patógeno presente en la muestra, y

10 bbb) seguimiento de la dependencia de la temperatura de la hibridación con dichos reactivos de hibridación y determinación de la temperatura de fusión, siendo dicha dependencia de la temperatura indicativa de por lo menos la especie de dicho patógeno,

15 c) determinar si se produce una señal de hibridación en la etapa bba), si se encuentra presente un organismo patogénico de un género determinado en dicha muestra, y determinar a partir de la dependencia de la temperatura de la etapa bbb), qué especie patogénica de dicho género se encuentra presente en dicha muestra.

20 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona métodos especialmente adecuados para el diagnóstico de una infección de un organismo patogénico. A este respecto, en el caso de que se sospeche que un paciente presenta una infección, la presente
25 invención proporciona un medio para determinar la especie de dicho organismo patogénico. Además, los nuevos métodos según la invención, especialmente en combinación con tecnología de PCR en tiempo real, tal como el sistema LightCycler™ permiten un diagnóstico rápido de un agente infeccioso

causante de sepsis, lo que resulta de gran importancia en muchos contextos clínicos.

De esta manera, en general la presente invención se refiere a un método para la identificación de un organismo patogénico de un grupo predeterminado de patógenos, que comprende:

a) aislar una muestra clínica que contiene ácidos nucleicos purificados por lo menos parcialmente,
b) someter por lo menos una primera alícuota de dicho espécimen clínico a por lo menos una reacción de amplificación y detección en un recipiente de reacción, que comprende:

ba) una etapa de amplificación utilizando por lo menos un primer conjunto de cebadores de amplificación capaces de amplificar una región espaciadora 16s/23s ó 18s/26s preseleccionada de varios o todos los miembros de dicho grupo predeterminado de patógenos,

bb) una etapa de detección utilizando por lo menos 2, 3 ó múltiples reactivos de hibridación, siendo dichos reactivos capaces conjuntamente de detectar una región espaciadora 16s/23s ó 18s/26s preseleccionada de entre todos los miembros de dicho grupo de patógenos, comprendiendo dicha etapa de detección bb) las etapas:

bba) seguimiento de la hibridación de cada uno de dichos reactivos de hibridación a una temperatura preseleccionada, siendo dicha hibridación indicativa de por lo menos el

- género de dicho patógeno presente en la muestra, y
- 5 bbb) seguimiento de la dependencia que presenta la hibridación respecto de la temperatura con dichos reactivos de hibridación y determinación de la temperatura de fusión, siendo indicativa dicha dependencia de la temperatura de por lo menos la especie de dicho patógeno,
- 10 c) determinar si se produce una señal de hibridación en la etapa bba), si un organismo patogénico de un género determinado se encuentra presente en dicha muestra, y determinar a partir de la dependencia de la temperatura de la etapa bbb), qué especie patogénica de dicho
- 15 género se encuentra presente en dicha muestra.

Con independencia de la definición de las diferentes etapas del método según las reivindicaciones, se entiende que las etapas a), b) y c) preferentemente se llevan a cabo sucesivamente una después de otra. Pueden llevarse a cabo

20 etapas adicionales antes de cada etapa, entre dos etapas o después de cada etapa.

El material de partida del método de la invención es la muestra clínica, que se sospecha que contiene un organismo patogénico. Son ejemplos de dichas muestras clínicas, sangre

25 completa, plasma sérico y líquido cefalorraquídeo. Preferentemente, el material de partida es de origen humano.

La etapa a) siempre se lleva a cabo en primer lugar y puede llevarse a cabo según cualquier método conocido de la técnica. En este contexto, un "especimen clínico" se

entiende que es un espécimen derivado de una muestra que contiene cualquier tipo de material celular o no celular que es obtenible de un paciente, es decir líquido corporal o incluso tejido. Preferentemente, el espécimen clínico se deriva de sangre completa, suero, plasma o líquido cerebroespinal.

Particularmente, los ácidos nucleicos se separan de proteínas y azúcares presentes en la muestra original. Puede utilizarse cualquier método de purificación conocido de la técnica en el contexto de la presente invención. Sin embargo, preferentemente se aplican métodos que resulten en una purificación esencialmente total del ADN total que deberá analizarse. Por lo menos se requiere purificación en la medida en que, si ninguna dilución sustancial posterior, las secuencias de ácidos nucleicos en alícuotas de la muestra puedan amplificarse con éxito en una amplificación *in vitro*, tal como la PCR. En la purificación, se elimina de los ácidos nucleicos cualquier compuesto que inhiba las polimerasas.

La amplificación se realiza utilizando un método *in vitro*, preferentemente la PCR (patente EP nº 201184). A continuación, se hace referencia a PCR, aunque se entiende que también resultan adecuados otros métodos de amplificación *in vitro*.

La etapa b) incluye realizaciones tanto heterogéneas como homogéneas. En la realización heterogénea, se lleva a cabo la etapa de amplificación ba) en primer lugar. Posteriormente, y opcionalmente incluyendo la suplementación

con reactivos de detección adicionales, se lleva a cabo la etapa bb).

En la realización homogénea, los reactivos para la etapa de amplificación y para la etapa de detección preferentemente ya se han añadido a la muestra previamente al inicio de la etapa de amplificación ba). En algún caso, la etapa ba) y la etapa bba) pueden llevarse a cabo en paralelo, es decir, el seguimiento de la hibridación se lleva a cabo en tiempo real, preferentemente durante cada ciclo térmico realizado, después de cada ciclo térmico realizado o por lo menos tras la realización de varios ciclos térmicos. En este caso, dicha temperatura preseleccionada de la etapa bba) habitualmente es idéntica o muy similar a la temperatura de apareamiento del protocolo de termociclado de PCR.

Las etapas bba) y bbb) habitualmente se llevan a cabo conjuntamente de manera que, en primer lugar, se realiza un seguimiento del suceso de hibridación a una temperatura preseleccionada. A continuación, se incrementa constitutivamente la temperatura con el fin de determinar la temperatura a la que se está resolviendo el híbrido de sonda/diana. En otras palabras, se lleva a cabo un análisis de la curva de fusión.

En el caso de que se realice un seguimiento de la hibridación en tiempo real ya durante la reacción de amplificación, la realización de un análisis de la curva de fusión puede omitirse, en el caso de que no resultase posible encontrar una señal de hibridación a la temperatura preseleccionada.

En el contexto de la presente invención, los términos específicos utilizados anteriormente se definen de la manera siguiente:

la expresión "identificación de organismo patogénico" se utiliza para referirse a un método para determinar si una especie particular o cepa o aislado dentro de una especie contenida en el grupo o subgrupo predeterminado de organismos patogénicos se encuentra presente en la muestra. La salida o resultado de la identificación es el nombre de la especie. Esto permitirá posteriormente la selección apropiada de una terapia antibiótica selectiva.

La expresión "grupo predeterminado de organismos patogénicos" se utiliza para referirse a un grupo predefinido de organismos patogénicos que consiste de organismos patogénicos que son de interés para una tarea particular. Preferentemente, un grupo predeterminado de organismos patogénicos puede ser el grupo de todos los organismos patogénicos, los cuales son clínicamente relevantes bajo circunstancias clínicas dadas, las secuencias genómicas respectivas de los cuales deben amplificarse, es sustancialmente conocido de la técnica.

Por ejemplo, dicho grupo predeterminado puede comprender los miembros clínicamente relevantes de dos o más géneros. Alternativamente, todos los miembros clínicamente relevantes conocidos de un género determinado pueden constituir dicho grupo predeterminado. Alternativamente, todos los miembros o cepas o aislados clínicamente relevantes conocidos de una especie determinada pueden constituir dicho grupo predeterminado. El grupo

predeterminado también puede contener subgrupos taxonómicos de diferentes géneros, mezclados con cepas de otros géneros o especies.

El término "específico" se utiliza para referirse a la característica de un sujeto (por ejemplo en métodos, etapas o reactivos) de que el sujeto se refiere únicamente a un resultado particular y definido. Por ejemplo, un método para la detección de una especie particular se considera específico en el caso de que esta especie, pero no otras especies, sean detectadas. La hibridación específica de una sonda con una diana es una hibridación que únicamente se produce entre la sonda y la diana, pero no con otros ácidos nucleicos. En otras palabras, la presente invención permite una detección selectiva de todos los miembros patogénicos de un género o de una especie, mientras que otros miembros no patogénicos conocidos de dicho género o de dicha especie definitivamente no resultan detectados.

En el presente contexto, el método global de la presente invención preferentemente es sustancialmente específico con respecto a la identificación del organismo. Los organismos que no son miembros de un grupo o subgrupo predeterminado preferentemente no son identificados, debido a que las etapas llevadas a cabo con los reactivos se ajustan para no detectar organismos no pertenecientes a dicho grupo. Esto no implica necesariamente que todas y cada una de las etapas del método global sean específicas, aunque ello resulta posible. Por ejemplo, en el caso de que los cebadores de amplificación se seleccionen para que no resulten específicos para el organismo que debe

identificarse (en el sentido de que dichos cebadores pueden utilizarse para amplificar ácidos nucleicos de organismos que no deben identificarse), la etapa ba) puede ser no específica. En este caso puede conseguirse la especificidad del método global seleccionando que una o más de las partes de la etapa sean específicas, por ejemplo la etapa bbb). A título de ejemplo, la presente invención cubre realizaciones en las que la etapa bba) resulta en una señal positiva, debido a la hibridación del reactivo de hibridación con un ácido nucleico de un miembro del grupo predeterminado y en presencia de ácidos nucleicos no diana en el espécimen y/o amplificados en la etapa ba), aunque en la etapa bbb), el seguimiento de la dependencia de la temperatura únicamente demuestra la identidad de la especie del miembro del grupo predeterminado, independientemente de la identidad de los ácidos nucleicos no diana.

A modo de ventaja principal en comparación con métodos conocidos de la técnica, la presente invención permite por primera vez una identificación selectiva de los miembros patogénicos de un género o de una especie bacteriana, mientras que otros miembros no patogénicos conocidos de dicho género o de dicha especie no son identificados.

Resulta importante indicar que, en el caso de que un espécimen clínico que debe analizarse contenga una nueva cepa previamente desconocida con una nueva secuencia diana, ligeramente diferente, el nuevo método según la invención ocasionalmente puede conducir a un resultado falso positivo o falso negativo. En el caso de que se amplifique y detecte un organismo no patogénico desconocido, el resultado de la

etapa bba) puede convertirse en falso positivo. Sin embargo, en este caso, el resultado falso positivo puede llegar a detectarse durante la etapa bbb) del método reivindicado, es decir, el seguimiento de la dependencia que presenta la hibridación de la temperatura. En este caso, la comparación de la dependencia de la temperatura de la etapa bbb) y la dependencia de la temperatura de los organismos patogénicos conocidos demostrará que el organismo no pertenece a la especie del grupo predeterminado, es decir, el resultado de la etapa c) será negativo. En el caso de que un organismo patogénico desconocido no sea amplificado o no sea detectado, el resultado es un falso negativo. Sin embargo, según todos los estudios de aislados clínicos llevados a cabo por los inventores hasta el momento, estos casos son muy raros y, además, no son evitados por ningún otro método comparable conocido de la técnica.

La expresión "subgrupo predeterminado de organismos patogénicos" se utiliza para referirse a una parte o a la totalidad del grupo predeterminado de organismos patogénicos. Preferentemente, el subgrupo predeterminado es únicamente una parte reducida de todos los organismos patogénicos, más preferentemente los patógenos que predominantemente se encuentran presentes en hospitales. Los miembros del grupo y del subgrupo pueden seleccionarse de un género, aunque también pueden seleccionarse de diferentes géneros. En el caso de que el grupo predeterminado se encuentre representado por todos los miembros patogénicos y clínicamente relevantes de un género, un subgrupo respectivo puede contener todos los miembros patogénicos respectivos de

una especie determinada. De manera similar, en el caso de que dicho grupo predeterminado consista de todos los miembros clínicamente relevantes de una especie determinada, el subgrupo puede consistir de todos los miembros de una
5 cepa específica.

La expresión "reacción de amplificación y de detección" se refiere a cualquier tipo de método *in vitro* que comprenda una o más "etapas de amplificación" con el fin de amplificar una o más secuencias diana procedentes de un grupo de
10 secuencias de ácidos nucleicos y una o más "etapas de detección" con el fin de averiguar la identidad del producto amplificado.

La expresión "etapa de amplificación" se refiere a una reacción o a una serie de reacciones que amplifica una
15 secuencia diana, en el caso de encontrarse presente en el espécimen clínico, por medio de la utilización de cebadores directos e inversos para una reacción de amplificación de ácidos nucleicos procedentes de un espécimen que contiene ADN. La especificidad de dicha etapa de amplificación
20 depende del grupo seleccionado y se encuentra gobernada por la especificidad de los cebadores utilizados. Preferentemente, la amplificación se obtiene por medio de una reacción en cadena de polimerasa (PCR) utilizando una ADN polimerasa termoestable. En una realización, la
25 amplificación es específica para bacterias generalmente, es decir, los virus no son amplificados en cantidades sustantivas.

Preferentemente, la etapa de amplificación es específica para los miembros del subgrupo. En una

realización preferente, la amplificación es específica del género al que pertenece la especie que debe identificarse.

La expresión "etapa de detección" se refiere a que el producto de amplificación se detecta por medio de la hibridación con un reactivo de hibridación apropiado, incluyendo el seguimiento de la dependencia de la temperatura de la hibridación de dicho reactivo con el ácido nucleico diana. La amplificación y detección no deben separarse necesariamente y llevarse a cabo en serie, sino que pueden llevarse a cabo simultáneamente.

La expresión "región de secuencia de ácidos nucleicos preseleccionada" se refiere a una región diana diferenciada de ácidos nucleicos presente en el ADN de todos los organismos que se pretende amplificar y detectar. Dependiendo de la realización, pueden existir algunas variaciones de secuencia entre las secuencias de diferentes organismos. En otras palabras, siempre se amplifica el mismo gen o la misma secuencia homóloga de cada organismo.

Se ha demostrado que resulta ventajoso que la región de secuencia de ácidos nucleicos preseleccionada se encuentre presente en múltiples copias del genoma de los organismos diana que se detectarán.

Son regiones de secuencias de ácidos nucleicos preseleccionadas excelentes las regiones espaciadoras transcritas de agrupaciones génicas de ADNr.

A este respecto los inventores han demostrado que resulta particularmente ventajoso que la región de secuencia de ácidos nucleicos preseleccionada corresponde a la región transcrita interna I, que siempre se encuentra localizada

entre una copia del gen ARNr 16S y una copia del gen de ARNr 23S (región ITS-1). Esta región contiene secuencias evolutivamente conservadas así como secuencias hipervariables, lo que permite el diseño flexible de tanto
5 cebadores como sondas específicos de género y de especie. En los eucariotas, tales como hongos patogénicos, existe una región espaciadora transcrita análoga entre el ADNr 18s y el ADNr 26s.

Más preferentemente, la región de secuencia de ácidos
10 nucleicos preseleccionada contiene por lo menos una parte de 20, todavía más preferentemente más de 40, nucleobases contiguas de la región espaciadora 16S/23S ó 18S/26S de los organismos que deben amplificarse. Esta región contiene secuencias evolutivamente conservadas así como secuencias
15 hipervariables, lo que permite un diseño flexible de tanto cebadores como sondas específicos de género y de especie. La región se encuentra contenida dentro de la región definida por lo sitios de unión a cebador en el ácido nucleico.

El término "patogénico" se refiere a que la bacteria
20 puede afectar al estado de salud de un ser humano, en el caso de que ese ser humano sea infectado por dicha bacteria. En particular, la invención se refiere a la identificación de bacterias y hongos que causan sepsis.

La expresión "conjunto de cebadores de amplificación"
25 se refiere a por lo menos dos oligonucleótidos o derivados de oligonucleótidos extendibles, es decir, por lo menos un cebador (directo) que se une a una primera cadena del ácido nucleico diana y por lo menos un segundo cebador (inverso) que se une a la cadena contraria de la secuencia diana de

ácidos nucleicos que debe amplificarse. Además, la posición de los cebadores está diseñada de manera que la extensión dependiente de molde de cada cebador genera un producto de extensión que comprende él mismo un sitio de unión de cebador al que puede hibridarse el otro cebador.

En la mayoría de casos resulta suficiente utilizar una pareja de dos cebadores de amplificación que consiste de un cebador directo y un cebador inverso. Sin embargo, en algunos casos pueden existir algunas variantes de secuencia menores en las secuencias de los sitios de unión de cebador de diferentes secuencias de los diferentes patógenos que deben identificarse. De esta manera, puede resultar imposible amplificar las secuencias de todos los miembros mediante la utilización de únicamente un cebador directo y un cebador inverso. Para estos casos, un conjunto de cebadores de amplificación puede consistir de 1, 2 ó más cebadores directos y/o 1, 2 ó más cebadores inversos que sean similares y que se unan a secuencias homólogas, pero que difieran entre sí en uno, dos, tres o varios intercambios, deleciones o adiciones de mononucleótidos, dinucleótidos o trinucleótidos.

Además, también se encuentra comprendido dentro del alcance de la invención que se utilicen dos, tres o múltiples conjuntos de cebadores de amplificación capaces de amplificar diferentes regiones preseleccionadas de secuencia de ácidos nucleicos. En este caso, dichas secuencias diferentes preseleccionadas de ácidos nucleicos pueden no encontrarse necesariamente relacionadas entre sí en sus secuencias. Sin embargo, también se encuentra comprendido

dentro del alcance de la presente invención que las diferentes regiones de secuencia de ácidos nucleicos preseleccionadas sean por lo menos parcialmente, o prácticamente en su totalidad, solapantes.

5 En general, el diseño de los cebadores de amplificación se lleva a cabo basándose en la información de secuencia disponible con respecto a las regiones preseleccionadas de secuencia diana de ácidos nucleicos de las bacterias patogénicas que deben amplificarse, así como con respecto a
10 las secuencias homólogas de dichos organismos, que no deberán amplificarse. Más exactamente, el conjunto o conjuntos de cebadores de amplificación se seleccionan de manera que exista una complementariedad máxima de las secuencias con respecto a todas las secuencias diana de
15 ácidos nucleicos del grupo predeterminado seleccionado de organismos patogénicos, y, por otra parte, una complementariedad de secuencia mínima con respecto a las secuencias de ácidos nucleicos de todos los demás organismos no seleccionados, es decir, aquellos no pertenecientes al
20 grupo predeterminado o que no son patogénicos.

La expresión "reactivo de hibridación" se utiliza para referirse a un reactivo capaz de hibridarse a productos de amplificación de la etapa bb) dentro de la región preseleccionada de secuencia de ácidos nucleicos, es decir,
25 en por lo menos una cadena del amplicón o amplicones. El reactivo puede comprender una o más sondas, que preferentemente son de una cadena o que se convierten en monocatenarias antes de la hibridación. Preferentemente el reactivo es un sistema de sondas de hibridación de ácidos

nucleicos de una cadena, que habitualmente comprende uno o dos ácidos nucleicos que son capaces de hibridarse con una cadena del ácido nucleico diana amplificado de doble cadena. Dependiendo del tipo de formato de detección, en la mayoría de casos resulta ventajoso que el reactivo de hibridación se
5 marque apropiadamente con una entidad detectable, de manera que, mediante la detección de dicho marcaje, pueda detectarse el híbrido de amplicón/reactivo de hibridación.

En una realización preferente, el reactivo de
10 hibridación se marca con una entidad fluorescente de manera que pueda detectarse la hibridación en instrumentos de PCR en tiempo real disponibles comercialmente. Los reactivos útiles para ello se dan a conocer en los documentos mencionados anteriormente referidos a diferentes formatos
15 para la detección de ADN amplificado.

El reactivo de hibridación en un caso simple puede ser una sonda oligonucleótida. Por ejemplo, puede aplicarse el formato de baliza molecular (patente US nº 5.118.801). Alternativamente, también resulta posible utilizar
20 oligonucleótidos de marcaje únicos marcados apropiadamente (patente WO nº 02/14555).

Más preferentemente, el reactivo de hibridación está compuesto de dos oligonucleótidos de hibridación contigua, marcados apropiadamente de manera que conjuntamente puedan
25 actuar según el formato de detección FRET-Hybprobe tal como se ha dado a conocer anteriormente (patentes WO nº 97/46707, nº 97/46712 y nº 97/46714).

Más preferentemente, el reactivo de hibridación está compuesto de dos oligonucleótidos de hibridación contigua,

marcados apropiadamente de manera que conjuntamente puedan actuar según el formato de detección FRET-Hybprobe tal como se ha dado a conocer anteriormente (patentes WO WO n° 97/46707, n° 97/46712 y n° 97/46714). En muchos casos
5 resulta suficiente que el reactivo de hibridación consista de un único oligonucleótido, o en el caso del formato FRET-hybprobe, de una pareja de oligonucleótidos que actúan conjuntamente como sonda donante y sonda aceptora. Sin embargo, en otros casos pueden existir muchas otras
10 variantes de secuencia en las secuencias diana de diferentes bacterias patogénicas fúngicas que deben detectarse. De esta manera, puede resultar imposible detectar las secuencias de todos los miembros mediante la utilización únicamente de un oligonucleótido como sonda o únicamente utilizando una
15 pareja de sondas oligonucleótidas FRET de hibridación.

Para dichos casos, un reactivo de hibridación puede consistir de 1, 2 ó más sondas de hibridación que son similares y se unen a secuencias homólogas, pero que difieren entre sí en 1, 2, 3 ó más intercambios, deleciones
20 o adiciones de mononucleótidos, dinucleótidos o trinucleótidos. En el caso de que el agente de hibridación sea una pareja de sondas de hibridación FRET, dicho reactivo de hibridación puede consistir de 1, 2, 3 ó más sondas oligonucleótidas FRET donantes y/o 1, 2, 3 ó más sondas
25 oligonucleótidas aceptoras. En este caso, todas las sondas donantes pueden ser similares, pero diferir entre sí en intercambios, deleciones o adiciones de mononucleótidos, dinucleótidos o trinucleótidos. Además, todas las sondas aceptoras son similares, difieren entre sí en intercambios,

deleciones o adiciones de mononucleótidos, dinucleótidos o trinucleótidos.

Se enfatiza explícitamente que, además de las realizaciones de utilización de un agente de hibridación, la presente invención también se refiere a realizaciones en las que se utilizan 2, 3, 4 ó múltiple reactivos de hibridación. En estos casos, puede obtenerse una discriminación de diferentes señales de hibridación en el caso de que cada uno de los reactivos de hibridación se marque con una entidad detectable diferente, por ejemplo un compuesto de fluorescencia diferente. Las secuencias diana de hibridación no necesariamente deben encontrarse relacionadas entre sí. Sin embargo, también se encuentra comprendido dentro del alcance de la presente invención que dichas secuencias diana sean por lo menos parcialmente, o prácticamente en su totalidad, solapantes.

En el caso de que se utilicen múltiples reactivos de hibridación basados en el formato FRET hybprobe, puede disponerse de únicamente una sola fuente de excitación. En este caso, resulta preferible disponer de un pigmento donador FRET común y diferentes pigmentos aceptores para cada pareja de sondas de hibridación FRET. Por ejemplo, puede utilizarse fluoresceína o derivados de fluoresceína como pigmento donador FRET general, siendo capaces de interactuar con un gran número de pigmentos aceptores FRET, tales como LC-Red 640 (Roche Applied Science), LC-Rojo 705 (Roche Applied Science), Cy 5 ó Cy 5.5 (Amersham). Una realización específica se refiere a métodos basados en el formato de sonda de hibridación FRET, en el que cada uno de

dichos múltiples reactivos de hibridación comprende una sonda donadora FRET idéntica con una secuencia idéntica y un marcaje idéntico, tal como, por ejemplo, fluoresceína, y en el que cada una de dichas sondas de hibridación comprende
5 una sonda aceptora diferente, cada una marcada con un fluoróforo diferente.

Además, en el presente contexto, la expresión "pareja FRET" se define como una pareja de marcajes fluorescentes que actúan conjuntamente para crear un procedimiento FRET,
10 es decir, consiste de un grupo donador FRET y un grupo aceptor FRET.

De manera similar al diseño de un conjunto de cebadores de amplificación, el diseño de un reactivo de hibridación o de múltiples reactivos de hibridación también se lleva a
15 cabo basándose en toda la información de secuencia disponible con respecto a las secuencias diana preseleccionadas de ácidos nucleicos que deben amplificarse y detectarse, así como con respecto a las secuencias homólogas de dichos organismos patogénicos, que no deberán
20 detectarse. Más exactamente, las secuencias del reactivo o reactivos de hibridación se seleccionan de manera que exista una complementariedad máxima de las secuencias con respecto a todas las secuencias diana de ácidos nucleicos del grupo predeterminado seleccionado de organismos patogénicos y, por
25 otra parte, una complementariedad de secuencias mínima con respecto a todas las secuencias homólogas de ácidos nucleicos de todos los demás organismos no seleccionados.

Además, el diseño del reactivo de hibridación debe considerar que una discriminación de varias variaciones de

secuencia diana resulta posible basándose en el seguimiento de la dependencia de la temperatura de la hibridación. La presente invención requiere diferentes temperatura de fusión para la hibridación de un reactivo de hibridación con
5 diferentes variantes de la secuencia diana originadas en diferentes organismos patogénicos. De esta manera, las secuencias de un reactivo de hibridación según la invención se diseñan de manera que las temperaturas de fusión calculadas (calculadas mediante métodos conocidos de la
10 técnica) de los diferentes híbridos de reactivo de hibridación/secuencia diana difieran entre sí en por lo menos 2°C, preferentemente en 4°C, y más preferentemente en por lo menos 6°C.

En resumen, la invención proporciona una posibilidad
15 para el diseño de reactivos de hibridación específicos de género, caracterizados porque detectan todos los miembros patogénicos de un género determinado perteneciente a un grupo predeterminado definido. Alternativamente, pueden diseñarse reactivos de hibridación específicos de especie o
20 de cepa, que permitan la detección de todas las cepas patogénicas de una determina especie perteneciente a un grupo predeterminado definido.

La expresión "seguimiento de la dependencia de la temperatura de la hibridación" se refiere a que se determina
25 la temperatura de fusión, a la que la sonda se disocia del complejo de hibridación formado con el ácido nucleico diana. Exactamente la temperatura de fusión (T_m) de un híbrido se define como la temperatura a la que se alcanza el máximo de una primera derivada del gráfico de la señal de hibridación

frente a la temperatura. La T_m es una característica de un híbrido dependiente de la complementariedad de las cadenas.

En el presente contexto, resulta importante indicar que la temperatura de fusión (T_m) de un híbrido depende de
5 varios factores independientes de la secuencia diana de ácidos nucleicos misma, tales como la concentración salina, y la longitud y contenido de GC de la sonda. Sin embargo, además, la temperatura de fusión depende fuertemente del número de desapareamientos, es decir, del grado de
10 complementariedad entre la sonda y la secuencia diana. En consecuencia, se obtienen diferentes temperatura de fusión para diferentes variantes de las secuencias diana que pueden encontrarse en diferentes cepas de una especie diferenciada o en diferentes especies de un género diferenciado. De esta
15 manera, la utilización de un diseño de sonda apropiado, puede utilizarse un tipo de reactivo de hibridación para tanto la detección de todos los miembros de un grupo preseleccionado de organismos como para la discriminación de dichos miembros por medio del seguimiento de la dependencia
20 que presenta la hibridación respecto de la temperatura.

Se ha demostrado que resulta particularmente ventajoso determinar la dependencia de la temperatura de la hibridación por medio de un análisis de curva de fusión. Más exactamente, después de la reacción de amplificación, se
25 desnaturaliza el producto de PCR (en presencia del reactivo de hibridación) a una primera temperatura, por ejemplo entre 90°C y 100°C , y después se enfría hasta una segunda temperatura, siendo dicha segunda temperatura inferior o próxima a la temperatura de hibridación del protocolo de

PCR. A continuación, se incrementa la temperatura a tasas de entre 0,01°C/s y 10°C/s, preferentemente de entre 0,1°C/s y 2°C/s, y más preferentemente de entre 0,1°C/s y 0,5°C/s.

La expresión "indicativo de por lo menos el género" se refiere a que, en el caso de que se produzca una señal de hibridación en la etapa bba), puede concluirse para la etapa c) que un organismo patogénico de un género determinado, respectivamente, puede encontrarse presente en la muestra recogida del paciente. Dependiendo del diseño (por ejemplo de la secuencia) del conjunto o conjuntos de cebadores de amplificación, y además, dependiendo del diseño del reactivo o reactivos de hibridación, una señal de hibridación obtenida de la señal de un reactivo de hibridación diferente incluso puede ser indicativa de la especie del organismo patogénico que debe detectarse. Preferentemente, la señal de hibridación determinada en la etapa bba) es inequívocamente indicativa de la presencia de uno de los miembros del grupo predeterminado, pero permite necesariamente de manera directa conocer cuál de los miembros se encuentra presente.

La expresión "indicativo de por lo menos la especie" se refiere a que, basándose en el resultado del seguimiento de la dependencia que presenta la hibridación respecto de la temperatura, seguimiento realizado en la etapa bbb), puede concluirse inequívocamente para la etapa c) qué especie patogénica se encuentra presente en la muestra clínica. Debido al diseño del conjunto o conjuntos de cebadores de amplificación y al diseño del reactivo o reactivos de hibridación, los datos obtenidos del seguimiento de la dependencia de la temperatura de la hibridación son

indicativos de la identidad de una especie o incluso de una determinada cepa del organismo patogénico respectivo. Incluso en el caso de que el espécimen contenga secuencias no diana similares o idénticas a la secuencia diana, no
5 resultarán amplificadas debido a que los cebadores no resultan adecuados para la amplificación de la región no diana.

En resumen, la invención proporciona un método para la identificación de organismos patogénicos, en la que, en una
10 primera etapa de amplificación utilizando uno o varios conjuntos apropiados de parejas de cebadores, se amplifican secuencias de todos los organismos patogénicos de interés y posteriormente se detectan con reactivos de hibridación apropiados. Debido al diseño apropiado de cebador y sonda,
15 las secuencias de los organismos microbianos no patogénicos no se amplifican o no se detectan, o se amplifican pero no se detectan. En el caso de que se produzca la hibridación con un reactivo de hibridación diferente, ésta es indicativa de por lo menos el género del agente infeccioso.

20 Posteriormente, se lleva a cabo el seguimiento de la fluorescencia dependiente de la temperatura, por ejemplo en forma de someter la muestra a un incremento continuo de la temperatura y determinar la temperatura a la que se produce la fusión entre el ácido nucleico diana y el reactivo de
25 hibridación. La temperatura de fusión que se ha seguido en este caso es indicativa de por lo menos la especie o incluso de la subespecie o cepa del patógeno respectivo que se encontraba presente en el espécimen original.

En el presente contexto, la temperatura de fusión (T_m) de un híbrido se define tal como resulta habitual en la técnica, es decir, la temperatura a la que se alcanza el máximo de una primera derivada de un gráfico de hibridación frente a la temperatura. La T_m es una característica de un

5 híbrido, que depende de la complementariedad de las cadenas.

Con el fin de conseguir una sensibilidad suficiente para detectar una infección, la etapa a del método inventivo habitualmente incluye una purificación por lo menos parcial del ácido nucleico de la muestra original. El ácido nucleico que debe aislarse puede ser ARN o ADN o una mezcla de ambos. Debido a que la realización más preferente de la invención utiliza ADN bacteriano para la identificación final del organismo patogénico, no resulta necesario que el espécimen

10 clínico contenga ARN. Por lo tanto, no resulta necesario aislar parcial o incluso completamente de manera exclusiva ARN de la muestra clínica. El aislamiento del ADN de la muestra clínica debe ser tan suficiente y completo como resulte necesario para recibir una señal con un control

20 positivo.

El resultado de la etapa a) habitualmente es un líquido que comprende ácidos nucleicos de la muestra clínica original y además reactivos añadidos durante la etapa de aislamiento, por ejemplo tampones. En la etapa b), el

25 espécimen clínico o una parte del mismo se somete a una o más reacciones de amplificación. Las reacciones de amplificación y de detección pueden comprender una o más etapas. Las reacciones tanto de amplificación como de detección son conocidas de la técnica. La amplificación se

realiza utilizando un método *in vitro*, preferentemente la PCR (patente EP n° 0 201 184). A continuación, se hace referencia a la PCR, pero se entiende que también resultan adecuados otros métodos *in vitro*. El resultado de la
5 reacción de amplificación es la producción de un gran número de productos de extensión de dichos cebadores, predominantemente que presentan una secuencia que alcanza desde la posición 5'-terminal de un cebador hasta la posición 5'-terminal del otro cebador. Estos ácidos
10 nucleicos producidos habitualmente se denominan "amplicones".

Con el fin de evitar los resultados falsos negativos debido a componentes residuales inhibidores que pueden encontrarse presentes en el espécimen clínico y con fines de
15 cuantificación, se ha demostrado que resulta particularmente ventajosa la adición de un molde de control interno. Habitualmente, dicho molde control comprende una secuencia conocida con sitios de unión a cebador complementarios a por lo menos un conjunto de cebadores de amplificación utilizado
20 para la amplificación de las secuencias diana de ácidos nucleicos que deben detectarse. En consecuencia, dicho conjunto de cebadores de amplificación también es capaz de cebar la amplificación de dicha secuencia seleccionada del molde de control. Los detalles sobre la utilización de
25 estándares internos, particularmente para la cuantificación, se dan a conocer en la patente EP n° 0 497 784.

Se ha demostrado que resulta ventajoso que se lleve a cabo el método según la invención utilizando una alícuota de un espécimen clínico que presente un volumen de entre 10 y

100 µl. De esta manera, puede llevarse a cabo el método de la presente invención con una sensibilidad suficiente en el caso de que únicamente se disponga de una cantidad reducida de una muestra clínica, tal como sangre completa o suero.

5 Sin embargo, finalmente, los resultados del método inventivo o de cualquier otro método conocido de la técnica puede resultar afectados por un nivel de fondo elevado de ADN genómico humano presente en un espécimen clínico. Si es éste el caso, puede llevarse a cabo una etapa pre-
10 amplificación según la patente WO n° 01/94634, caracterizada porque se amplifican selectivamente secuencias de ADN selectivamente no humanas.

Con referencia a la etapa b), tal como ya se ha indicado anteriormente, la presente invención se refiere a
15 realizaciones en las que se utiliza por lo menos un primer y un segundo, o alternativamente, un primer, un segundo y un tercer, o incluso un primer, un segundo, un tercer y un cuarto reactivo de hibridación con el fin de detectar un amplio rango de organismos patogénicos. Preferentemente,
20 cada un de los reactivos de hibridación porta un marcaje diferente, preferentemente un marcaje fluorescente. De esta manera, según la invención, la totalidad de los reactivos de hibridación pueden ya encontrarse presentes durante la etapa
25 ba) en un tipo de enfoque multiplex, permitiendo la detección de una multitud de bacterias patogénicas dentro de un recipiente de reacción.

Con el fin de evitar los resultados falsos negativos debido a componentes residuales inhibidores que pueden encontrarse presentes en el espécimen clínico, se ha

demostrado que resulta particularmente ventajosa la adición de un molde de control interno. Habitualmente dicho molde de control comprende una secuencia seleccionada con sitios de unión a cebador complementarios a por lo menos un conjunto de cebadores de amplificación utilizado para la amplificación de las secuencias diana de ácidos nucleicos que deben detectarse. En consecuencia, dicho conjunto de cebadores de amplificación también es capaz de cebar la amplificación de dicha secuencia seleccionada del molde de control.

Para la etapa b) resultan posibles realizaciones tanto heterogéneas como homogéneas. En la realización heterogénea, los reactivos necesarios para la etapa ba) se añaden en primer lugar y se realiza en primer lugar la etapa de amplificación ba). A continuación, y opcionalmente incluyendo la suplementación con reactivos de detección adicionales, se realiza la etapa bb).

En algunos casos, puede resultar ventajoso utilizar el formato heterogéneo, caracterizado porque, tras la etapa de amplificación ba), la mezcla de reacción se divide en por lo menos dos, tres, cuatro o varias sub-alícuotas. La etapa bb) seguidamente se lleva a cabo con por lo menos el mismo número de reactivos de hibridación diferentes, cada uno en un recipiente de reacción diferente.

En la realización homogénea que resulta altamente preferente respecto a la realización heterogénea, se añaden al espécimen reactivos para la etapa tanto de amplificación como de detección antes de iniciar la etapa de amplificación ba). En algunos casos, pueden llevarse a cabo las etapas ba)

y bba) en paralelo, es decir, el seguimiento de la hibridación se lleva a cabo durante la amplificación, en el caso de una PCR realizada durante o después de cada uno, o por lo menos después de varios ciclos térmicos realizados.

5 En este caso, preferentemente dicha temperatura preseleccionada de la etapa bba) es habitualmente idéntica o muy similar a la temperatura de apareamiento del protocolo de termociclado de PCR. La temperatura de hibridación es la temperatura a la que el reactivo de hibridación (por ejemplo

10 la sonda) se hibrida con su diana (es decir, el ácido nucleico que debe amplificarse y/o el amplicón formado en reacciones de extensión anteriores). Con el fin de conseguir suficiente especificidad de hibridación (es decir, para detectar predominantemente secuencias de la diana), la

15 temperatura de apareamiento se selecciona de manera que las sondas se apareen/hibriden predominantemente con el ácido o ácidos nucleicos diana, pero no con los ácidos nucleicos de los organismos que no deben identificarse. Los medios que influyen sobre la selectividad de la hibridación de las

20 sondas con los ácidos nucleicos son ampliamente conocidos (longitud, contenido de GC y grado de complementariedad).

Según la presente invención, la etapa de amplificación ba) y la etapa de detección bb) preferentemente se llevan a cabo posteriormente en un formato de ensayo homogéneo,

25 caracterizado porque uno o más reactivos de hibridación ya se encuentran presentes dentro de la mezcla de reacción durante la etapa de amplificación. En otras palabras, la etapa de amplificación ba) y la etapa de detección bb) se

llevan a cabo dentro del mismo recipiente de reacción y sin adición de reactivos adicionales entre las etapas.

La etapa bba) es una etapa en la que se mide la señal del reactivo de hibridación hibridado y se lleva a cabo en
5 forma de una hibridación convencional homogénea de ácidos nucleicos, particularmente tal como se ha indicado de manera general anteriormente para los diferentes métodos en el ciclador Light-Cycler.

Las etapas bba) y bbb) preferentemente se llevan a cabo
10 conjuntamente de manera que, en primer lugar, se realiza un seguimiento del suceso de hibridación mismo a una primera temperatura preseleccionada. A continuación, se incrementó continuamente la temperatura hasta por lo menos la temperatura a la que se resuelve el híbrido que contiene el
15 reactivo de hibridación. En otras palabras, se lleva a cabo un análisis de la curva de fusión para el híbrido.

La etapa de seguimiento bbb) preferentemente se lleva a cabo una vez durante un número suficiente de ciclos, C_p , para amplificar cualquier secuencia diana presente hasta un
20 nivel que resulte detectable a partir de la dependencia de la temperatura. Ésta habitualmente coincide con la cantidad de ácidos nucleicos detectable mediante hibridación de la sonda, es decir, en cuanto se mide una señal claramente positiva en la etapa bba), puede llevarse a cabo la etapa
25 bbb). El valor de C_p preferentemente se encuentra comprendido entre 20 y 50.

En el caso de que se realice un seguimiento de la hibridación durante la etapa de reacción (que también se denomina "tiempo real"), puede omitirse la realización de un

análisis de la curva de fusión, con la condición de que no resulte posible encontrarse una señal de hibridación a la temperatura preseleccionada.

La etapa c) contiene la interpretación de los
5 resultados que se han obtenido durante las etapas bb). Esto puede realizarse manualmente mediante interpretación de los resultados obtenidos. Preferentemente, los resultados se analizan utilizando programas informáticos que generan un resultado que indica claramente si se encontraba presente
10 una bacteria Gram-positiva en la muestra y que de esta manera podría haber causado la infección.

La interpretación se basa en la correlación de las señales obtenidas en las etapas bba) y bbb) con valores conocidos a partir de controles positivos. La utilización de
15 controles positivos también es conocida de manera general a partir de la técnica anterior. Un control positivo es un ácido nucleico que es conocido que se encuentra presente en el espécimen o en un espécimen de control preparado artificialmente. Por ejemplo, la especificidad de
20 hibridación de la sonda a la temperatura preseleccionada se utiliza para determinar si cualquiera de los ácidos nucleicos que podrían haberse amplificado con los cebadores de la etapa ba) y que pertenecen a dicho grupo predeterminado de organismos patogénicos se encuentran
25 presentes en el espécimen. Una señal positiva (respecto a un control negativo) es indicativa de la presencia de una especie perteneciente a dicho género (etapa bba), incluso en el caso de que la identidad de dicha especie no se determine a partir de dicha etapa bba).

La dependencia de la temperatura que presenta la hibridación se utiliza para la identificación de la especie presente en el espécimen. Mediante esta etapa se determina a qué especie de dicho género pertenece dicho organismo, la presencia general del cual se determina en la etapa bba).
5 Por ejemplo, su temperatura de fusión es indicativa de un ácido nucleico de una especie particular. Por lo tanto, la presencia de una especie predeterminada en la muestra misma puede verificarse a partir de la presencia de un cambio de
10 la señal cuando se alcanza la temperatura de fusión del híbrido de la diana con el reactivo de hibridación.

Resulta útil para la presente invención una composición que comprende por lo menos un primer conjunto de cebadores de amplificación y por lo menos dos, tres o múltiples
15 reactivos de hibridación, caracterizada porque:

- dicho por lo menos primer conjunto de cebadores de amplificación es capaz de amplificar una región preseleccionada de secuencia de ácidos nucleicos perteneciente a varios o a la totalidad de los miembros de
20 un grupo predeterminado de patógenos, y

- dichos por lo menos 2, 3 ó múltiples reactivos de hibridación conjuntamente son capaces de detectar específicamente una región preseleccionada de una secuencia de ácidos nucleicos perteneciente a todos los miembros de un
25 grupo predeterminado de patógenos, en el que,

- la hibridación de cada uno de dichos reactivos de hibridación a una temperatura preseleccionada es indicativa de por lo menos el género de un patógeno presente en la muestra, y

- la dependencia de la temperatura es indicativa de por lo menos la especie de dicho patógeno.

Además, dicha composición puede comprender uno o varios, o preferentemente todos, los compuestos y reactivos
5 seleccionados de entre la lista siguiente:

- tampón, aplicable para una reacción en cadena de polimerasa,
- desoxinucleósidos trifosfato,
- ADN polimerasa dependiente de molde, preferentemente
10 termoestable.

Dicha composición puede comprender además un ácido nucleico por lo menos parcialmente purificado, que puede originarse, por ejemplo, a partir de un espécimen clínico y someterse a cualquiera de los métodos según la presente
15 invención.

También resulta útil para el método según la invención un kit que comprende por lo menos un primer conjunto de cebadores de amplificación y por lo menos dos, tres o múltiples reactivos de hibridación, caracterizado porque:

- 20 - dicho por lo menos primer conjunto de cebadores de amplificación es capaz de amplificar una región preseleccionada de secuencia de ácidos nucleicos de varios o o todos los miembros de un grupo predeterminado de patógenos, y

- 25 - dicho por lo menos 2, 3 ó múltiples reactivos de hibridación conjuntamente son capaces de detectar específicamente una región preseleccionada de secuencia de ácidos nucleicos de todos los miembros de un grupo predeterminado de patógenos, en la que:

- la hibridación de cada uno de dichos reactivos de hibridación a una temperatura preseleccionada es indicativa de por lo menos el género de un patógeno presente en la muestra, y

5 - la dependencia de la temperatura que presenta dicha hibridación es indicativa de por lo menos la especie de dicho patógeno.

Además, dicho kit puede comprender uno o varios otros compuestos y reactivos seleccionados de entre la lista
10 siguiente:

- tampón, aplicable a una reacción en cadena de polimerasa,

- desoxinucleósidos trifosfato,

- ADN polimerasa dependiente de molde, preferentemente
15 termoestable,

cada uno separadamente o en combinación. Dicho kit puede comprender además un ácido nucleico por lo menos parcialmente purificado, que puede originarse, por ejemplo, a partir de un espécimen clínico y someterse a cualquiera de
20 los métodos según la presente invención. Dicho kit también puede comprender un control interno de ADN, que puede amplificarse y detectarse utilizando los mismos cebadores y sondas utilizados para la detección de cualquier ácido nucleico diana.

25 Cada uno de los componentes dados a conocer anteriormente puede almacenarse en un único recipiente de almacenamiento. Sin embargo, también resulta posible cualquier combinación de componentes para el almacenamiento dentro del mismo recipiente.

Además, dicho kit también puede comprender herramientas de software, tales como discos compactos que contengan programas informáticos para el análisis cualitativo o cuantitativo de los datos obtenidos mediante el método
5 reivindicado.

La invención difiere de los ensayos bacterianos de la técnica anterior en que los ensayos conocidos únicamente proporcionan información sobre una especie o cepa particular (método convencional para la detección de la presencia de un
10 organismo particular en una muestra), los reactivos indicados anteriormente resultan adecuados y se utilizan para la potencial identificación de dos o más especies, mientras que en paralelo indican si cualquiera de ellos (con independencia del organismo) se encuentra presente.

Tal como se ha indicado anteriormente, la combinación de señales de seguimiento dependientes de la amplificación que son indicativas de por lo menos el género de un patógeno y el seguimiento de la dependencia de la temperatura que presenta la hibridación permiten la detección e
20 identificación simultáneas de un amplio rango de organismos patogénicos de interés.

En una realización particular, la presente invención permite la detección e identificación de un grupo predeterminado de bacterias Gram-positivas patogénicas,
25 comprendiendo dicho grupo *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyrogenes*, *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*.

En una segunda realización particular, la presente invención permite la detección e identificación de un grupo predeterminado de bacterias Gram-negativas patogénicas, comprendiendo dicho grupo *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*,
5 *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Stenotrophomonas maltophilia*.

Además, se encuentra comprendido dentro del alcance de la presente invención, que después de la etapa a) del método inventivo se sometan cada una de una primera, una segunda y una tercera alícuotas a una reacción de amplificación y detección según las etapas b) y c) independientemente unas de otras en tres recipientes de reacción diferentes. En el
10 caso de que se utilicen la primera y la segunda alícuotas para detectar e identificar todas las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas patogénicas, respectivamente, la tercera alícuota se utiliza para detectar e identificar patógenos fúngicos, tales como *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida crusei*, *Candida glabrata* y *Aspergillus fumigatus*.
20

Resulta conveniente y ahorra tiempo realizar el análisis de las dos o tres alícuotas diferentes de espécimen clínico mencionadas anteriormente en paralelo en el mismo
25 instrumento. Por lo tanto, resulta altamente preferente que las etapas de amplificación de las diferentes reacciones de amplificación y detección se lleven a cabo con el mismo perfil de termociclado. En otras palabras, cada amplificación debe llevarse a cabo utilizando parámetros

idénticos de apareamiento, alargamiento, tiempo de desnaturalización y temperatura.

Además, un kit útil para llevar a cabo el método de la invención puede estar compuesto de una combinación de reactivos que resultan útiles para el análisis en paralelo de un espécimen clínico en diferentes alícuotas. Dicho kit comprende un primer, un segundo, y opcionalmente un tercer conjunto de cebadores de amplificación, y un primer, un segundo, y opcionalmente un tercer conjunto de por lo menos, dos, tres o múltiples reactivos de hibridación, cada uno caracterizado porque:

- cada uno de dichos conjuntos de cebadores de amplificación es capaz de amplificar una región preseleccionada de secuencia de ácidos nucleicos de varios o la totalidad de los miembros de un grupo predeterminado de patógenos, y

- cada uno de dichos por lo menos 2, 3 ó múltiples reactivos de hibridación conjuntamente son capaces de detectar específicamente una región preseleccionada de secuencia de ácidos nucleicos de todos los miembros de un grupo predeterminado de patógenos, en el que,

- la hibridación de cada uno de dichos reactivos de hibridación a una temperatura preseleccionada es indicativa de por lo menos el género de un patógeno presente en la muestra, y

- la dependencia de la temperatura de dicha hibridación es indicativa de por lo menos la especie de dicho patógeno.

El ejemplo, referencias y listado de secuencias siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a la

comprensión de la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que pueden realizarse modificaciones en los procedimientos proporcionados sin apartarse del espíritu de la invención.

Ejemplo

Los ejemplos, referencias y listado de secuencias siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a la comprensión de la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que pueden realizarse modificaciones en los procedimientos proporcionados sin apartarse del espíritu de la invención.

Muestras

Se analizaron parcialmente 10^3 , 10^2 y 10 copias de plásmido de ADN que contenía la región ITS-1 comprendida entre los genes de ARNr 18s y ARNr 23s de *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* o *Pseudomonas aeruginosa*, por duplicado en ausencia o en presencia de 5 µg de ADN genómico humano de fondo. Se añadió un plásmido de control interno a la mezcla madre completa (ver anteriormente).

Hardware/software

Se utilizó un instrumento LightCycler™ (Roche Diagnostics GmbH, Alemania). El instrumento disponible comercialmente se modificó de manera que el rotor se adaptase a soportar capilares de 100 µl. El fluorímetro de dicho instrumento se alteró de manera que estuviera compuesto de 4 en lugar de 3 fotohíbridos, y pudo detectarse

la emisión de fluorescencia a 610 nm, 640 nm, 670 nm y 705 nm.

Reactivos

Todos los oligonucleótidos mencionados en la presente
 5 invención se prepararon mediante síntesis química. Los reactivos para unir marcajes pueden obtenerse de Roche Diagnostics GmbH (LightCycler rojo 640-NHS éster, n° de cat. 2015161; LightCycler rojo 705-fosforamidita n° de cat. 2157594; LightCycler fluoresceína (abreviado 'F' en lo
 10 sucesivo) CPG n° de cat. 3113906). La utilización de dichos reactivos se describe en Biochemica 1:8-13, 2001. Puede obtenerse Cy5-NHS-éster de Amersham, previa solicitud. LC-rojo 610-NHS éster presenta un máximo de emisión a 610 nm y se sintetizó según los protocolos estándares utilizando un
 15 pigmento fluorescente tal como se da a conocer en la patente US n° 5.750.409.

Deben comprobarse que todos los reactivos no se encuentran contaminados por los organismos que deben detectarse. Únicamente los reactivos que no presentan dichos
 20 organismos y los ácidos nucleicos originados a partir de los mismos pueden conducir a una sensibilidad óptima.

Se utilizaron generalmente la polimerasa FastStart y FastStart Master según la recomendación en el kit de sondas de hibridación LightCycler-FastStart DNA Master (Roche
 25 Diagnostics GmbH, n° de cat. 2239272).

Se utilizaron los cebadores y sondas dirigidos contra la región ITS-1 entre el ADNr 16s y 23s según la tabla siguiente.

| | Secuencia | Info. |
|----------------------------|-------------------------|-----------------|
| <i>Enterococcus</i> | 5'-TAC-TTT-GTT-CAG-TTT- | Cebador directo |

| | | |
|------------------------------|---|-------------------|
| | TGA-GAG-GT-3' SEC ID n° 1 | |
| | 5'-GCA-ATT-GAA-CTT-ATT- AAA-AAA-CTC-3' SEC ID n° 2 | Cebador inverso |
| | 5'-CTG-GAT-ATT-GAA-GTA- AAA-AGA-ATC-AAA-AC-X-3' SEC ID n° 3 | Sonda Fluos I |
| | 5'-GAT-ATT-TGA-AGT-AAA- TGT-AAG-TAA-T-X-3' SEC ID n° 4 | Sonda Fluos II |
| | 5'-LCROJO ₆₁₀ -ACC-GAG- AAC-ACC-GCG-TTG-AAT-p- 3' SEC ID n° 5 | Sonda rojo 610 |
| <i>Staphylococcus</i> | 5'-TGT ACA TTG AAA ACT AGA TAA GTA AG-3' SEC ID n° 6 | Cebador directo |
| | 5'-ACG CGT TAT TAA TCT TGT GAG T-3' SEC ID n° 7 | Cebador inverso |
| | 5'-CCG ACT GAA TAA AGA GTT TTA AA-X 3' SEC ID n° 8 | Sonda Fluos I |
| | 5'-LCROJO ₆₄₀ -CT TGA ATT CAT AAG AAA TAA TCG-3' SEC ID n° 9 | Sonda rojo 640 |
| <i>Pseudomonas</i> | 5'-TCT AAA ACA ATC GTC GAA AGC-3' SEC ID n° 10 | Cebador directo |
| | 5'-CCG AAA ATT CGC GCT TGA AC-3' SEC ID n° 11 | Cebador inverso |
| | 5'-GAA GTA AGA CTG AAT GAT CTC TT-X 3' SEC ID n° 12 | Sonda Fluos I |
| | 5'-Cy-5-TCA CTG GTG ATC ATT CAA GTC AAG GT-3' SEC ID n° 13 | Sonda rojo 670 |
| Control interno | 5'-LCROJO ₇₀₅ -CCA GTA GAA TGC CAA CC-3' SEC ID n° 14 | IC-sonda rojo 705 |

Con dichos oligonucleótidos, se preparó una mezcla de reacción, de la manera siguiente:

| Reactivo | Volumen utilizado | Concentración final |
|----------|-------------------|---------------------|
|----------|-------------------|---------------------|

| | | |
|--|----------|--|
| 10 x LC-FastStart DNA Master reactivo sonda de hibridación | 10 µl | ADN polimerasa Taq, tampón de reacción 1 mM, MgCl ₂ , dNTPs |
| MgCl ₂ (25 mM) | 10 µl | 3,5 mM |
| UNG (10 U/µl) | 1 µl | 2 U |
| Cebadores | | |
| Cebador Enterococ. directo (20 pmoles/µl) | 2,5 µl | 0,5 µM |
| Cebador Enterococ. inverso (20 pmoles/µl) | 2,5 µl | 0,5 µM |
| Cebador StaphP30 (20 pmoles/µl) | 2,5 µl | 0,5 µM |
| Cebador StaphP31 inverso (20 pmoles/µl) | 2,5 µl | 0,5 µM |
| Cebador Pseudo. directo (20 pmoles/µl) | 3,5 µl | 0,7 µM |
| Cebador Pseudo. inverso (20 pmoles/µl) | 3,5 µl | 0,7 µM |
| Sondas hybprobes | | |
| Estafilococos: Staph. Fluos (20 pmoles/µl) | 1 µl | 0,2 µM |
| Estafilococos: Staph Rojo640 (20 pmoles/µl) | 1 µl | 0,2 µM |
| Enterococos: Entero-Fluos I (20 pmoles/µl) | 1 µl | 0,2 µM |
| Enterococos: Entero-Fluos II (20 pmoles/µl) | 1 µl | 0,2 µM |
| Enterococos: Entero-Rojo610 (20 pmoles/µl) | 1 µl | 0,2 µM |
| Pseudomonas: Pseudo. Fluos (20 pmoles/µl) | 1,5 µl | 0,2 µM |
| Pseudomonas: Pseudo. Rojo670 (20 pmoles/µl) | 1,5 µl | 0,2 µM |
| Control interno: IC Rojo705 (20 pmoles/µl) | 1 µl | 0,2 µM |
| Agua (grado PCR, Roche) | Ajustado | |
| Diana (ADN genómico bacteriano) | 5 µl | 1.000, 100 ó 10 copias |
| ADN humano de fondo (opcional) | 5 µl | 5 µg/100 µl |
| Volumen total | 100 µl | |

Método

Se llevó a cabo una operación de LightCycler utilizando el perfil de termociclado y temperatura de fusión siguiente:

| | Ciclos | tiempo (s) | Temp. (°C) | Tasa de cambio (°C) |
|-------------------|--------|---------------|---------------|---------------------------|
| Desnaturalización | 1 | 600 | 95°C | 20 |
| Amplificación | 10 | 10 | 95 | 20 |
| | | 25 | 60 | 20 |
| | | 50 | 72 | 20 |
| Amplificación | 35 | 10 | 95 | 20 |
| | | 25 | 50 | 20 |
| | | 10 | 72 | 20 |
| Curva de fusión | 1 | 60 | 95 | 20 |
| | | 60 | 40 | 20 |
| Enfriamiento | 1 | 0 | 80 | 0,1 |
| | | 30 | 40 | 20 |

Resultados

5 Los resultados se resumen en la tabla siguiente, que indica los valores de Cp (número de ciclos) con los que, utilizando el modo de segunda derivada, pudo detectarse una señal de amplificación positiva.

| Molde | Copias/PCR | Cuantificación | | sin ADNh | |
|---------------------------------|------------|----------------|--------|----------|--------|
| | | CP | ADNh | | |
| <i>E. faecalis</i> F3 | 1.000 | 23,96 | 24,035 | 24,34 | 24,43 |
| | | 24,11 | | 24,52 | |
| | 100 | ---- | ---- | 27,17 | 27,15 |
| | | ---- | | 27,13 | |
| | 10 | ---- | ---- | 29 | 29,5 |
| | | ---- | | 30 | |
| <i>E. faecium</i> F3 | 1.000 | 23,7 | 23,82 | 24,74 | 24,81 |
| | | 23,94 | | 24,88 | |
| | 100 | ---- | ---- | 26,16 | 26,96 |
| | | ---- | | 27,76 | |
| | 10 | ---- | ---- | 25,72 | 25,72 |
| | | ---- | | ---- | |
| <i>S. aureus</i> | 1.000 | 21,03 | 21,045 | 21,12 | 21,335 |

| | | | | | |
|---------------------------------|-------|-------|--------|-------|--------|
| F4 | | 21,06 | | 21,55 | |
| | 100 | 22,15 | 21,625 | 24,12 | 23,335 |
| | | 21,1 | | 22,55 | |
| | 10 | ---- | 23,39 | 25,32 | 25,645 |
| | | 23,39 | | 25,97 | |
| S. epidermidis | 1.000 | 22,73 | 22,73 | 25,73 | 25,725 |
| F4 | | ---- | | 25,72 | |
| | 100 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| | | ---- | | 26,71 | |
| | 10 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| | | ---- | | ---- | |
| P. aeruginosa | 1.000 | 22,22 | 22,23 | 22,26 | 22,275 |
| F5 | | 22,24 | | 22,29 | |
| | 100 | 24,31 | 23,705 | 25,19 | 25,19 |
| | | 23,1 | | 25,19 | |
| | 10 | 24,15 | 24,62 | 26,27 | 28,135 |
| | | 25,09 | | 30 | |

Tal como puede apreciarse a partir de la tabla anterior, dentro del presente experimento multiplex, pudieron detectarse 10 copias de plásmido de ADN que contenía la región ITS-1 de *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* o *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que podían detectarse 100 copias de *Staphylococcus epidermidis*.

En presencia de ADN humano de fondo, pudieron detectarse 10 copias de *Staphylococcus aureus* o de *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que se pudieron detectar 1.000 copias de *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y *Staphylococcus epidermidis*.

Además, y de manera independiente de la presencia o ausencia de ADN humano de fondo, la amplificación de *Enterococcus faecalis* y de *Enterococcus faecium* pudo discriminarse en el canal 610 nm mediante análisis de la curva de fusión.

Se obtuvo en el seguimiento una T_m de $57,5^\circ\text{C}$ para *Enterococcus faecalis*, mientras que se midió una T_m de $53,5^\circ\text{C}$ para *Enterococcus faecium*.

De manera similar, la amplificación de *Staphylococcus aureus* y de *Staphylococcus epidermidis* pudo discriminarse en el canal de 640 nm mediante análisis de curva de fusión debido a la presencia de una diferencia de temperatura de fusión entre los dos picos de fusión obtenidos.

Para *Staphylococcus aureus*, se obtuvo una T_m de 54°C , mientras que para *Staphylococcus epidermidis*, se obtuvo una T_m de 45°C .

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Roche Diagnostics GmbH
15 F. Hoffman-La Roche AG

<120> Ensayo multiplex de detección de organismos patogénicos

20 <130> 21719 EP

<140> EP03007458.7

<141> 2003-04-04

25 <160> 14

<170> PatentIn ver. 2.1

<210> 1

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador directo

<400> 1

tactttgttc agttttgaga ggt 23

10

<210> 2

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador inverso

<400> 2

20 gcaattgaac ttattaataaa actc 24

<210> 3

<211> 29

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificialFluos Probe I

<400> 3

ctggatattg aagtaaaaag aatcaaaac 29

<210> 4

5 <211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: sonda Fluos II

<400> 4

gatatttgaa gtaaatagtaa gtaat 25

15 <210> 5

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: sonda rojo 610

<400> 5

accgagaaca ccgcgttgaa t 21

25

<210> 6

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificialForward Primer

5 <400> 6

tgtacattga aaactagata agtaag 26

<210> 7

<211> 22

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificialReverse Primer

15

<400> 7

acgcgttatt aatcttgtga gt 22

<210> 8

20 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de secuencia artificial: sonda Fluos I

<400> 8

ccgagtgaat aaagagtttt aaa 23

<210> 9

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: sonda rojo 640

<400> 9

10 gcttgaattc ataagaaata atcg 24

<210> 10

<211> 21

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador directo

20 <400> 10

tctaaaacaa tcgtcgaaag c 21

<210> 11

<211> 20

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador inverso

<400> 11

ccgaaaattc gcgcttgaac 20

<210> 12

5 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: sonda Fluos I

<400> 12

gaagtaagac tgaatgatct ctt 23

15 <210> 13

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de secuencia artificialRed 670 Probe

<400> 13

tcactgggga tcattcaagt caaggt 26

25

<210> 14

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: sonda IC Rojo705

<400> 14

5 ccagtagaat gccaac 17

Reivindicaciones

1. Método para la identificación de un organismo patogénico a partir de un grupo predeterminado de patógenos, que comprende:
- 5 a) purificar por lo menos parcialmente un ácido nucleico a partir de una muestra clínica,
- b) someter por lo menos una primera alícuota de dicho espécimen clínico a por lo menos una reacción de amplificación y detección en un recipiente de
- 10 reacción, que comprende:
- ba) una etapa de amplificación utilizando un primer conjunto de cebadores de amplificación capaz de amplificar una región espaciador preseleccionada 16s/23s ó 18s/26s de entre varios
- 15 o todos los miembros de dicho grupo predeterminado de patógenos,
- bb) una etapa de detección utilizando por lo menos 2, 3 ó múltiples reactivos de hibridación, siendo dichos reactivos capaces conjuntamente de
- 20 detectar específicamente una región espaciadora preseleccionada 16s/23s ó 18s/26s de entre todos los miembros de dicho grupo de patógenos, comprendiendo dicha etapa de detección bb) las etapas:
- 25 bba) seguimiento de la hibridación de cada uno de dichos reactivos de hibridación a una temperatura preseleccionada, siendo indicativa dicha hibridación de por lo menos el género de dicho patógeno presente en la muestra, y

bbb) seguimiento de la dependencia de la temperatura que presenta la hibridación con dichos reactivos de hibridación, y determinación de la temperatura de fusión, siendo indicativa dicha dependencia de la temperatura de por lo menos la especie de dicho patógeno.

c) Determinar si se produce una señal de hibridación en la etapa bba), si se encuentra presente un organismo patogénico de un género determinado en dicha muestra, y determinar a partir de la dependencia de la temperatura de la etapa bbb), qué especie patogénica de dicho género se encuentra presente en dicha muestra.

2. Método según la reivindicación 1, en el que una primera y una segunda alícuotas se someten, cada una, a una reacción de amplificación y detección independientemente entre sí en dos recipientes de reacción diferentes.

3. Método según la reivindicación 2, en el que una primera, segunda y tercera alícuotas se someten, cada una, a una reacción de amplificación y de detección independientemente entre sí en dos recipientes de reacción diferentes.

4. Método según las reivindicaciones 1 a 3, en el que se utiliza un reactivo de hibridación adicional para la detección de un control interno.

5. Método según la reivindicación 2, en el que se identifican exclusivamente organismos patogénicos Gram-positivos en una reacción de amplificación y detección

y se identifican exclusivamente organismos Gram-negativos patogénicos en otra reacción de amplificación y detección.

6. Método según las reivindicaciones 3 y 5, en el que se
5 identifican exclusivamente patógenos fúngicos en la tercera reacción de amplificación y detección.
7. Método según las reivindicaciones 2 a 6, en el que cada etapa de amplificación se lleva a cabo con el mismo perfil de termociclado.