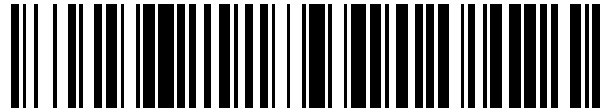


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 951**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2008 E 08104295 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2013 EP 2130929**

54 Título: **Detección y cuantificación multiplex de ácidos nucleicos microbianos controlada de forma interna**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.01.2014

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel , CH

72 Inventor/es:

SIZMANN, DOROTHEA;
BABIEL, REINER;
GLAUBITZ, JOACHIM;
GUERTLER, LUTZ y
YOUNG, KAREN KWOK YING

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 439 951 T3

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

DESCRIPCIÓN

Detección y cuantificación multiplex de ácidos nucleicos microbianos controlada de forma interna

5 Campo de la invención

La presente invención está relacionada con nuevos métodos y usos para la detección y cuantificación de ácidos nucleicos microbianos utilizando una referencia cuantitativa interna. Los métodos preferibles están basados en la amplificación de ácidos nucleicos, preferiblemente mediante la en reacción en cadena de la polimerasa. Además se proporcionan equipos que comprenden componentes para realizar dichos métodos y usos.

10 Antecedentes de la invención

En el área del diagnóstico molecular, la detección y cuantificación de ácidos nucleicos microbianos utilizando reacciones de amplificación de los ácidos nucleicos tiene un papel significativo. El cribado rutinario de la presencia del virus de la inmunodeficiencia humano (VIH), el virus de la hepatitis B (VHB) y/o C (VHC) en las donaciones de sangre es un ejemplo de aplicación a gran escala de las reacciones de amplificación y detección de ácidos nucleicos. Éstas comprenden una variedad de diferentes técnicas, siendo la más comúnmente utilizada la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) introducida por Kary Mullis en 1984.

Los sistemas automatizados para el análisis basado en la PCR a menudo utilizan la detección a tiempo real del producto de amplificación durante el proceso de PCR. La clave de tales métodos es la utilización de oligonucleótidos modificados que son portadores de grupos marcador o marcajes.

La amplificación se realiza típicamente con la reacción en cadena de la polimerasa, que específicamente amplifica los ácidos nucleicos diana hasta cantidades detectables. Otras posibles reacciones de amplificación comprenden, entre otros, la reacción en cadena de la ligasa, reacción en cadena de la polimerasa ligasa, Gap-LCR, reacción de reparado de la cadena, 3SR, NASBA, amplificación por desplazamiento de la cadena (SDA), amplificación mediada por transcripción (TMA) y amplificación Q[®].

La detección de un ácido nucleico microbiano en una muestra biológica es crucial por ejemplo para reconocer una infección en un individuo. Por lo tanto, un requisito importante de un ensayo para la detección de una infección microbiana es que debe evitar los resultados falsos negativos debidos a las regiones de secuencia variables de un genoma microbiano causadas por las mutaciones. Por ejemplo, los individuos infectados con VIH están en la fase más contagiosa durante las etapas virémicas tempranas de infección. Tras alcanzarse la respuesta inmune específica del VIH, la viremia en plasma se reduce. El periodo asintomático se caracteriza por una viremia en plasma persistente, de bajo nivel. Las secuencias mutadas o parcialmente mutadas del genoma viral que posiblemente no se amplifican y/o detectan, en combinación con la baja carga viral aumentan la posibilidad de obtener resultados falsos negativos.

Siddappa et al. (J. Clin. Microbiol. 42, (2004), 2742- 2751) y Herrmann et al. (J. Clin. Microbiol. 42, (2004), 1909-1914), o US 2004/0229211 utilizan la aproximación en la que más de una región se amplifica mediante PCR y se detecta a continuación.

Además de la mera detección de la presencia o ausencia de un ácido nucleico microbiano en una muestra, a menudo es importante determinar la cantidad de dicho ácido nucleico. La fase y gravedad de una enfermedad vírica puede valorarse en base a la carga viral. Además, el seguimiento de cualquier terapia requiere información sobre la cantidad de un virus presente en un individuo con el fin de evaluar el éxito de la terapia. Las referencias mencionadas anteriormente, que tratan de la detección of ácidos nucleicos microbianos mediante el ataque simultáneo de múltiples porciones de secuencia de los respectivos microorganismos, utilizan todos ellos una calibración externa para cuantificar la presencia de dichos ácidos nucleicos, es decir se crean curvas estándar en reacciones separadas en las que se usan cantidades conocidas de ácidos nucleicos idénticos o comparables. La cantidad absoluta de un ácido nucleico microbiano se determina a continuación por comparación del resultado obtenido con la muestra analizada con dicha función estándar. Sin embargo, la calibración externa posee la desventaja de que un posible procedimiento de extracción, con eficacia variable, y la posible y a menudo no predecible presencia de agentes inhibidores de la reacción de amplificación y/o detección no se toman en consideración. Esta circunstancia también aplica a cualquier otro efecto relacionado con la muestra. Por lo tanto, puede darse el caso de que una muestra se juzgue como negativa debido a un procedimiento de extracción fallido u otros factores basados en la muestra, a pesar de que el ácido nucleico microbiano a detectar y cuantificar se encuentra en realidad presente en la muestra.

Por lo tanto, existe la necesidad en la materia de proporcionar un método simple y fiable para la detección y cuantificación de un ácido nucleico microbiano.

Descripción de la invención

La presente invención está relacionada con nuevos métodos y utilidades para la detección y cuantificación de ácidos nucleicos microbianos utilizando una o más referencias cualitativas internas. Brevemente, las porciones de múltiples secuencias de un ácido nucleico microbiano se amplifican y detectan de forma simultánea junto con dicha referencia cuantitativa interna en la misma mezcla de reacción, lo que permite la cuantificación del ácido nucleico microbiano. Así, un sujeto de la presente invención es:

Un método para detectar y cuantificar un ácido nucleico microbiano en una muestra biológica, y dicho método comprende:

a) proporcionar una mezcla de reacción que comprende uno o más ácidos nucleicos estándares cuantitativos, dos o más pares de cebadores, y dichos pares de cebadores son específicos para diferentes porciones de secuencia de dicho ácido nucleico microbiano, y uno o más pares de cebadores específicos para dicho uno o más ácidos nucleicos estándar

b) añadir dicha muestra biológica a dicha mezcla de reacción

c) realizar uno o más ciclos, en los que un paso de ciclado comprende un paso de amplificación, y dicho paso de amplificación comprende la producción de dos o más productos de amplificación diferentes derivados de dicho ácido nucleico microbiano si se encuentra presente en dicha muestra y la producción de uno o más productos de amplificación derivados de dicho uno o más ácidos nucleicos estándares cuantitativos

d) detectar y medir las señales detectables generadas por dichos productos de amplificación y que son proporcionales a su concentración en dicha mezcla de reacción, en la que la presencia o ausencia de la señal detectable generada por dicho ácido nucleico microbiano es indicativa de la presencia o ausencia del ácido nucleico microbiano en dicha muestra biológica

e) determinar la cantidad de dicho ácido nucleico microbiano en dicha muestra biológica por comparación de las señales generadas por dicho ácido nucleico microbiano y dichos uno o más ácidos nucleicos estándares cuantitativos, en la que dichos dos o más porciones de secuencia diferentes del ácido nucleico microbiano son porciones de secuencia del mismo microorganismo.

El método de acuerdo con la invención aporta una serie de mejoras en la materia:

El aprovechamiento de más de una porción de la secuencia de un ácido nucleico microbiano da lugar a un riesgo significativamente reducido de infravalorar los títulos microbianos, y al mismo tiempo se reduce el riesgo de infravalorar los títulos de aislamientos microbianos desconocidos. Todos los genotipos diferentes dentro de un organismo dado pueden detectarse y cuantificarse fácilmente utilizando un número mínimo de oligonucleótidos como resultado de la sensibilidad reducida a la variabilidad de la eficiencia de la amplificación.

El ciclo de vida de las pruebas formuladas de acuerdo con la Invención se prolonga, ya que es capaz de hacer frente incluso con nuevas variantes generadas por microorganismos como los virus a través de la presión selectiva, por ejemplo como consecuencia de nuevos fármacos anti-retrovirales.

La sensibilidad global se aumenta significativamente, y la variabilidad de las determinaciones del título se minimiza debido a la detección y cuantificación simultánea de múltiples porciones de secuencia diferentes.

Utilizando uno o más ácidos nucleicos estándares cuantitativos "internos" de acuerdo con el método o métodos de la invención, se nivelan los efectos inhibitorios específicos de muestra, pero también los inespecíficos de muestra que posiblemente interfieren con las reacciones de amplificación y detección de los ácidos nucleicos estándares cuantitativos y los ácidos nucleicos microbianos de forma simultánea (inhibición independiente de la región diana) lo que resulta en títulos más veraces. "Internos" significa que uno o más ácidos nucleicos estándares cuantitativos se amplifican, detectan y cuantifican dentro de la misma mezcla de reacción que el ácido nucleico microbiano, en lugar de en un experimento separado.

El fallo o reducción de la eficiencia de amplificación específica para una porción de secuencia diana, que sin embargo no afecta a dichos uno o más ácidos nucleicos estándares cuantitativos puede resultar en títulos incorrectos (infravalorados), por ejemplo en el caso de mutaciones en el ácido nucleico diana en el extremo 3' de los cebadores o estructura secundaria específica de la diana, por ejemplo en los genotipos del VHC). Incluyendo uno o más porciones adicionales de la secuencia diana, la probabilidad de que ambas dianas muestren un fallo o reducción de la eficiencia de amplificación se reduce y por lo tanto la posibilidad de generar un título incorrecto se reduce considerablemente.

El ácido o ácidos nucleicos estándares cuantitativos en los análisis cuantitativos se encuentran en una concentración bastante elevada de forma que se siguen amplificando y detectando en muestras con una elevada concentración de

ácido nucleico diana. Por lo tanto, el seguimiento de muestras de baja positividad en el límite de detección (LOD) no es estricta, especialmente si la reacción de amplificación se encuentra parcialmente suprimida. Utilizando múltiples porciones de secuencia diferentes para la detección, puede asegurarse el LOD ya que la probabilidad de que dos o más porciones diferentes de la secuencia diana se supriman se reduce.

5 En una realización preferible, la invención proporciona el método descrito anteriormente, que adicionalmente comprende:

10 en el paso a) proporcionar dos o más sondas específicas de las diferentes porciones de secuencia amplificadas mediante dichos dos o más pares de cebadores específicos de las diferentes porciones de secuencia de dicho ácido nucleico microbiano, y una o más sondas específicas de la porción o porciones de secuencia amplificadas mediante dichos uno o más pares de cebadores específicos para dichos uno o más ácidos nucleicos estándares cuantitativos.

15 Las técnicas convencionales de biología molecular y química de los ácidos nucleicos, que se encuentran entre la experiencia en la materia, se explican en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, Gait, M.J., Ed., 1984; Nucleic Acid Hybridization, Hames, B.D., y Higgins, S.J., Eds., 1984; y una serie, Methods in Enzymology, Academic Press, Inc.

20 Una "mezcla de reacción" como se utiliza en la presente invención comprende al menos todos los componentes para facilitar una reacción biológica o química. Es un único volumen sin ningún compartimento de separación, es decir todos los componentes presentes en dicha "mezcla de reacción" están en contacto inmediato entre ellos.

25 Una "muestra biológica" puede ser cualquier muestra de origen natural. Preferiblemente, una "muestra biológica" se deriva de un humano y es un fluido corporal. En una realización preferible de la invención, la "muestra biológica" es sangre.

30 Como es conocido en la materia, un "nucleósido" es una combinación base-azúcar. La porción base del nucleósido normalmente es una base heterocíclica. Las dos clases más comunes de tales bases heterocíclicas son las purinas y las pirimidinas.

35 Los "nucleótidos" son "nucleósidos" que además incluyen un grupo fosfato unido de forma covalente a la porción azúcar del nucleósido. Para aquellos "nucleósidos" que incluyen un azúcar pentofuranosilo, el grupo fosfato puede estar unido a la porción hidroxilo en 2', 3' o 5' del azúcar. Un "nucleótido" es la "unidad monomérica" de un "oligonucleótido", que se indica de forma más genérica aquí como "compuesto oligomérico" o "polinucleótido", que se indica de forma más genérica "compuesto polimérico". Otra expresión general para el concepto anterior es ácido desoxiribonucleico (DNA) y ácido ribonucleico (RNA).

40 De acuerdo con la invención, un "compuesto oligomérico" es un compuesto que consiste en "unidades monoméricas" que pueden ser sólo "nucleótidos" o "compuestos no naturales" (véase a continuación), más específicamente "nucleótidos modificados" (o "análogos de nucleótido") o "compuestos no nucleotídicos", solos o combinaciones de los mismos. Los "oligonucleótidos" y "oligonucleótidos modificados" (o "análogos de oligonucleótidos") son subgrupos de "compuestos oligoméricos" en el contexto de la invención.

45 En el contexto de esta invención, el término "oligonucleótido" se refiere a los "polinucleótidos" formados a partir de una pluralidad de "nucleótidos" como "unidad monomérica", es decir un "oligonucleótido" pertenece a un subgrupo específico de "compuesto oligomérico" o "compuesto polimérico" de ácido ribonucleico (RNA) o ácido desoxiribonucleico (DNA) con "unidades monoméricas". Los grupos fosfato que se indican normalmente forman parte del esqueleto internucleósido del "oligonucleótido". La unión o esqueleto normal del RNA y el DNA es un enlace fosfodiéster de 3' a 5'.

50 Los "oligonucleótidos" y "oligonucleótidos modificados" (véase a continuación) de acuerdo con la invención pueden sintetizarse como se describe principalmente en la materia y será conocido por el experto en el área. Los métodos para preparar los compuestos oligoméricos de específicas secuencias son conocidos en la materia, y incluyen, por ejemplo, el clonaje y restricción de la secuencias apropiadas y la síntesis química directa. Los métodos de síntesis química pueden incluir, por ejemplo, el método de fosfotriéster descrito por Narang S. A. et al., Methods in Enzymology 68 (1979) 90-98, el método de fosfodiéster descrito por Brown E. L., et al., Methods in Enzymology 68 (1979) 109-151, el método de fosforamidit descrito en Beaucage et al., Tetrahedron Letters 22 (1981) 1859, el método de H-fosfonato descrito en Garegg et al., Chem. Scr. 25 (1985) 280-282 y el método en soporte sólido descrito en la US 4.458.066.

60 Para el método descrito anteriormente, los ácidos nucleicos pueden estar presentes en forma de doble cadena o de cadena sencilla, siendo necesaria la desnaturalización de los ácidos nucleicos de doble cadena, es decir pasan a ser de cadena sencilla, antes de la realización del método, mediante calentamiento, es decir se realiza una desnaturalización térmica.

65

En otra realización preferible, un cebador y/o la sonda pueden modificarse químicamente, es decir el cebador y/o la sonda comprenden un nucleótido o un compuesto no nucleotídico modificado. Entonces, la sonda o el cebador son un oligonucleótido modificado.

5 Los "nucleótidos modificados" (o "análogos de nucleótido") se diferencian de los "nucleótidos" naturales en alguna modificación pero siguen consistiendo en una base, un azúcar pentofuranosilo, una porción fosfato, una porción similar a una base, similar a un azúcar pentofuranosilo o similar a un fosfato o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, puede unirse un "marcaje" a la porción base de un "nucleótido" obteniendo así un "nucleótido modificado". Una base natural en un "nucleótido" también puede reemplazarse por ejemplo por una 7-deazapurina obteniéndose así también un "nucleótido modificado". Los términos "nucleótido modificado" o "análogo de nucleótido" se utilizan de forma intercambiable en la presente solicitud. Un "nucleósido modificado" (o "análogo de nucleósido") difiere de un nucleósido natural en alguna modificación como se ha indicado anteriormente para los "nucleótidos modificados" (o "análogos de nucleótido").

15 Un "compuesto no nucleotídico" es diferente de un "nucleótido" natural pero en el sentido de esta invención sigue pudiendo ser – de forma similar a un "nucleótido" - una "unidad monomérica" de un "compuesto oligomérico". Por lo tanto, un "compuesto no nucleotídico" debe poder formar un "compuesto oligomérico" con "nucleótidos". Incluso los "compuestos no nucleotídicos" pueden contener porciones similares a una base, similares a un azúcar pentofuranosilo o similares a un fosfato, sin embargo, no todos ellos están presentes al mismo tiempo en un "compuesto no nucleotídico".

Un "oligonucleótido modificado" (o "análogo de oligonucleótido") pertenece a otro subgrupo específico de "compuestos oligoméricos", que posee uno o más "nucleótidos", uno o más "compuestos no nucleotídicos" o "nucleótidos modificados" como "unidades monoméricas". Así, los términos "oligonucleótido modificado" (o "análogo de oligonucleótido") se refieren a estructuras que funcionan de forma sustancialmente similar a los "oligonucleótidos" y se utilizan de manera intercambiable a lo largo de esta solicitud. Desde un punto de vista sintético, un "oligonucleótido modificado" (o un "análogo de oligonucleótido") puede obtenerse por ejemplo mediante modificación química de "oligonucleótidos" con la modificación apropiada del esqueleto fosfato, la unidad ribosa o las bases de nucleótido (Uhlmann y Peyman, Chemical Reviews 90 (1990) 543; Verma S., y Eckstein F., Annu. Rev. Biochem. 67 (1998) 99-134). Las modificaciones representativas incluyen los enlaces inter-nucleósido fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, fosfotriéster o fosforamidato en lugar de los enlaces inter-nucleósido fosfodiéster; deaza- o aza-purinas y -pirimidinas en lugar de las bases purina y pirimidina naturales, bases pirimidina con grupos sustituyentes en la posición 5 o 6; bases purina con grupos sustituyentes alterados en las posiciones 2, 6 u 8, o la posición 7 como las 7-deazapurinas; bases con porciones alquilo, alqueno, alquino o arilo, por ejemplo grupos alquilo inferior como metilo, etilo, propilo, butilo, terc-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo o grupos arilo como fenilo, bencilo, naftilo; azúcares con grupos sustituyentes, por ejemplo, en su posición 2'; o análogos de azúcar carbocíclico o acíclico. Otras modificaciones consistentes con el espíritu de esta invención son conocidas por los expertos en la materia. Tales "oligonucleótidos modificados" (o "análogos de oligonucleótido") se describen mejor como intercambiables funcionalmente, aunque diferentes a nivel estructural, con los "oligonucleótidos" naturales (u "oligonucleótidos" sintéticos junto con líneas naturales). Ejemplos de modificaciones se describen en más detalle en Verma S., y Eckstein F., Annu. Rev. Biochem. 67 (1998) 99-134 o la WO 02/12263. Además, la modificación puede realizarse en el lugar donde las unidades nucleósido se unen a través de grupos que se sustituyen por enlaces internucleósido fosfato o azúcar fosfato. Tales enlaces incluyen los descritos en Verma S., y Eckstein F., Annu. Rev. Biochem. 67 (1998) 99-134. Cuando otros enlaces diferentes de los fosfato se utilizan para unir las unidades nucleósido, tales estructuras también se han descrito como "oligonucleósidos".

Un "ácido nucleico", así como el "ácido nucleico diana" o el "ácido nucleico microbiano" es un compuesto polimérico de "nucleótidos" como será conocido para el experto en la materia. "Ácido nucleico diana" o "ácido nucleico microbiano" se utiliza aquí para indicar un "ácido nucleico" en una muestra que debe analizarse, es decir debe determinarse la presencia, no presencia o cantidad del mismo en una muestra. Por lo tanto, en este caso el ácido nucleico es la diana y por lo tanto también puede indicarse como "ácido nucleico diana". Como, de acuerdo con la invención, el ácido nucleico diana es de origen microbiano, el ácido nucleico diana también se denomina "ácido nucleico microbiano". Por ejemplo, si se ha de determinar si una muestra de sangre contiene VIH, el "ácido nucleico diana" o "ácido nucleico microbiano" es el ácido nucleico del VIH.

"Microorganismo" significa cualquier virus, bacteria, arqueobacteria, hongo o cualquier organismo unicelular eucariota.

"Microbiano" significa un derivado o que pertenece a un "microorganismo".

Un "ácido nucleico estándar cuantitativo" es un "ácido nucleico" y así un compuesto polimérico de "nucleótidos" como conocerá el experto en la materia. En el caso de un "ácido nucleico estándar cuantitativo", el ácido nucleico es apto para ser y utilizarse como referencia para determinar la cantidad del "ácido nucleico diana" o "ácido nucleico microbiano". Con este propósito, el "ácido nucleico estándar cuantitativo" se somete a todos los posibles pasos de preparación de la muestra junto con el "ácido nucleico diana" o el "ácido nucleico microbiano". Además, se procesa a lo largo del método con la misma mezcla de reacción. Los "ácidos nucleicos estándares cuantitativos" deben

generar, directamente o indirectamente, una señal detectable tanto en presencia o en ausencia del ácido nucleico diana. Con este propósito, la concentración del "ácido nucleico estándar cuantitativo" debe optimizarse cuidadosamente en cada ensayo para no interferir con la sensibilidad pero para que se genere una señal detectable también por ejemplo a concentraciones muy elevadas de diana. Preferiblemente, el rango de concentraciones de "ácido nucleico estándar cuantitativo" comprenderá un rango de 100 copias por reacción a 100.000 copias por reacción (por ejemplo, para el VIH: 1000 copias/ reacción, HCV: 7500 copias/ reacción). La concentración final del EC en la mezcla de reacción es dependiente del rango de medida cuantitativo que se consigue. El "ácido nucleico estándar cuantitativo" puede ser, por ejemplo, DNA, RNA o PNA, DNA o RNA blindado y formas modificadas de los mismos.

El término "cebador" se utiliza aquí como será conocido para el experto en la materia y se refiere a "compuestos oligoméricos", primariamente a "oligonucleótidos", pero también a "oligonucleótidos modificados" que pueden "iniciar" la síntesis de DNA mediante una polimerasa de DNA dependiente de molde, es decir el extremo 3' del oligonucleótido, por ejemplo, proporciona un grupo 3'-OH libre en el que "nucleótidos" adicionales pueden unirse mediante una polimerasa de DNA dependiente de molde que establece un enlace fosfodiéster de 3' a 5' y se utilizan desoxinucleósidos trifosfato y se libera pirofosfato. Por lo tanto, no existe diferencia fundamental - excepto por la función que se busca - entre un "cebador", un "oligonucleótido" o una "sonda" como se utilizan en la presente invención.

Para el método anteriormente descrito, los ácidos nucleicos pueden estar presentes en forma de doble cadena o de cadena sencilla, siendo los ácidos nucleicos de doble cadena desnaturalizados, es decir convertidos a cadena sencilla, antes de la realización del método mediante calentamiento, es decir desnaturalización térmica.

En otra realización preferible, un cebador y/o la sonda pueden estar modificados químicamente, es decir el cebador y/o la sonda comprenden un nucleótido modificado o un compuesto no nucleotídico. La sonda o el cebador son entonces un oligonucleótido modificado.

Los "marcajes", a menudo denominados "grupos marcadores", son generalmente grupos que consiguen que un ácido nucleico, en particular el "compuesto oligomérico" o el "oligonucleótido modificado", así como cualquier ácido nucleico unido a éste sea distinguible del resto de la muestra (los ácidos nucleicos con un "marcaje" unido también pueden denominarse compuestos de unión a ácido nucleico marcados, sondas marcadas o simplemente sondas). Los marcajes preferibles de acuerdo con la invención son los marcajes fluorescentes, que son por ejemplo los "colorantes fluorescentes" como un colorante de fluoresceína, un colorante de rodamina, un colorante de cianina y un colorante de cumarina. Los "colorantes fluorescentes" preferibles de acuerdo con la invención son FAM, HEX, CY5, JA270, Cyan, CY5.5, LC- Red 640, LC- Red 705.

Una "señal detectable" es una señal "generada", por un compuesto como el "ácido nucleico microbiano" o el "ácido nucleico estándar cuantitativo", dando lugar a que dicho compuesto sea distinguible del resto de la muestra. De acuerdo con la invención, dicha "señal detectable" puede cuantificarse. Una "señal detectable" puede ser por ejemplo radiactiva u óptica como las señales luminiscentes. Las "señales detectables" preferibles de acuerdo con la invención son las señales fluorescentes emitidas por los "colorantes fluorescentes".

"Generar" significa producir, directamente o indirectamente. En el contexto de una "señal detectable", "generar" puede significar por lo tanto "producir directamente", por ejemplo en el caso de un colorante fluorescente que emite una señal fluorescente, o "producir indirectamente" en el sentido de "evocar" o "inducir", como un "ácido nucleico microbiano" "generando" una "señal detectable" a través de un "marcaje" como un "colorante fluorescente", o a través de una sonda de ácido nucleico portadora de un "marcaje" como un "colorante fluorescente".

Como será conocido por el experto en la materia, el término "específico" en el contexto de los cebadores y sondas implica que un cebador o sonda "específica" de un ácido nucleico distintivo se une a dicho ácido nucleico bajo condiciones rigurosas. Preferiblemente, los cebadores y sondas utilizados en el método de acuerdo con la invención son idénticos en al menos un 80% a las porciones de secuencia del ácido nucleico microbiano y/o el ácido o ácidos nucleicos estándares cuantitativos. En una realización más preferible de la invención, las secuencias de cebador son al menos 12 nucleótidos contiguos seleccionados de entre el grupo de Id. de sec. Nº 1-16, 21-27, y las sondas son de al menos 12 nucleótidos contiguos seleccionados de entre el grupo de Id. de sec. Nº 17-20, 28, 29 o las correspondientes secuencias de ácido nucleico complementarias de las mismas. Más preferiblemente, las secuencias seleccionadas consisten en de 12 a 60 nucleótidos, aún más preferiblemente de 20 a 60 nucleótidos, y más preferiblemente, las secuencias exactas seleccionadas de dicho grupo de secuencias o sus secuencias de ácido nucleico complementarias.

La "reacción en cadena de la polimerasa" (PCR) se describe, entre otras referencias, en las patentes estadounidenses Nº 4.683.202, 4.683.195, 4.800.159 y 4.965.188 y es la técnica más preferible de amplificación de ácidos nucleicos utilizada para el método de acuerdo con la invención. La PCR normalmente utiliza dos o más cebadores oligonucleótidos que se unen a un molde de ácido nucleico seleccionado (por ejemplo, DNA o RNA). Los cebadores útiles en la presente invención incluyen oligonucleótidos capaces de actuar como un punto de iniciación de la síntesis de ácidos nucleicos en las secuencias de ácido nucleico, del ácido nucleico microbiano o del ácido

nucleico estándar cuantitativo. Un cebador puede purificarse a partir de la digestión con enzimas de restricción mediante métodos convencionales, o puede obtenerse de forma sintética. El cebador preferiblemente es de cadena sencilla para una máxima eficiencia en la amplificación, pero el cebador puede ser de doble cadena. Los cebadores de doble cadena se desnaturalizan en primer lugar, es decir, se tratan para separar las cadenas. Un método de desnaturalizar ácidos nucleicos de doble cadena es mediante calentamiento. Una "polimerasa termoestable" es una enzima polimerasa que es estable al calor, es decir, es una enzima que cataliza la formación de productos de extensión de un cebador complementarios al molde y no se desnaturaliza de forma irreversible cuando se somete a elevadas temperaturas durante el tiempo necesario para efectuar la desnaturalización de los ácidos nucleicos molde de doble cadena. Generalmente, la síntesis se inicia en el extremo 3' de cada cebador y se procede en dirección de 5' a 3' a lo largo de la cadena de molde. Se han aislado polimerasas termoestables a partir de *Thermus flavus*, *T. ruber*, *T. thermophilus*, *T. aquaticus*, *T. lacteus*, *T. rubens*, *Bacillus stearothermophilus* y *Methanothermus fervidus*. Sin embargo, también pueden utilizarse polimerasas que no son termoestables en los ensayos de PCR siempre que la enzima se vaya renovando. Si el ácido nucleico molde es de doble cadena, es necesario separar las dos cadenas antes de que pueda utilizarse como molde en una PCR. La separación de las cadenas puede conseguirse mediante cualquier método adecuado de desnaturalización, lo que incluye métodos físicos, químicos o enzimáticos. Un método para separar las cadenas de ácido nucleico involucra el calentamiento del ácido nucleico hasta que está predominantemente desnaturalizado (por ejemplo, desnaturalizado en más de un 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95%). Las condiciones de calentamiento necesarias para la desnaturalización del ácido nucleico molde dependerán, por ejemplo, de la concentración de sales en el tampón y de la longitud y composición de nucleótidos de los ácidos nucleicos a desnaturalizar, pero normalmente oscilan de alrededor de 90°C a alrededor de 105°C durante un tiempo que depende de las características de la reacción, como temperatura y longitud del ácido nucleico. La desnaturalización normalmente se realiza durante alrededor de 30 s. a 4 min. (por ejemplo, de 1 min. a 2 min. 30 s., o 1,5 min.). Si el ácido nucleico molde de doble cadena se desnaturaliza mediante calentamiento, la mezcla de reacción se deja enfriar hasta una temperatura que promueve la hibridación de cada cebador a su secuencia diana sobre el ácido nucleico microbiano y/o ácido nucleico estándar cuantitativo. La temperatura de hibridación normalmente es de alrededor de 35°C a alrededor de 65°C (por ejemplo, de alrededor de 40°C a alrededor de 60°C; de alrededor de 45°C a alrededor de 50°C). Los tiempos de hibridación pueden estar de alrededor de 10 s. a alrededor de 1 min. (por ejemplo, alrededor de 20 s. a alrededor de 50 s.; alrededor de 30 s. a alrededor de 40 s.). La mezcla de reacción se ajusta entonces a la temperatura a la que la que se promueve o es óptima la actividad de la polimerasa, es decir, una temperatura suficiente para que se de la extensión a partir del cebador hibridado para generar productos complementarios al ácido nucleico microbiano y/o ácido nucleico estándar cuantitativo. La temperatura debe ser suficiente para sintetizar un producto de extensión para cada cebador que se hibrida a un ácido nucleico molde, pero no debe ser tan elevada como para desnaturalizar un producto de extensión de su molde complementario (por ejemplo, la temperatura para la extensión generalmente oscila de alrededor de 40° a 80°C (por ejemplo, de alrededor de 50°C a alrededor de 70°C; alrededor de 60°C). Los tiempos de extensión pueden estar de alrededor de 10 s. a alrededor de 5 min. (por ejemplo, alrededor de 30 s. a alrededor de 4 min.; de alrededor de 1 min. a alrededor de 3 min.; de alrededor de 1 min. 30 s. a alrededor de 2 min.). Las nuevas cadenas sintetizadas forman una molécula de doble cadena que puede utilizarse en pasos sucesivos de la reacción. Los pasos de separación, hibridación y elongación de las cadenas pueden repetirse tantas veces como sea necesario para producir la cantidad deseada de productos de amplificación correspondientes al ácido nucleico microbiano y/o ácido nucleico estándar cuantitativo. Los factores limitantes de la reacción son las cantidades de cebadores, de enzima termoestable y de nucleósidos trifosfato presentes en la reacción. Los ciclos (es decir, desnaturalización, hibridación y extensión) se repiten preferiblemente al menos una vez. Para su uso en una detección, el número de ciclos dependerá, por ejemplo, de la naturaleza de la muestra. Si la muestra es una mezcla compleja de ácidos nucleicos, serán necesarios más ciclos para amplificar la secuencia diana lo suficiente para su detección. Generalmente, los ciclos se repiten al menos alrededor de 20 veces, pero pueden repetirse hasta 40, 60 o incluso 100 veces.

"Límite de detección" o "LOD" significa la menor cantidad o concentración detectable de un ácido nucleico en una muestra. Un "LOD" bajo corresponde a una elevada sensibilidad y viceversa. El "LOD" normalmente se expresa mediante la unidad "cp/ml", particularmente si el ácido nucleico es un ácido nucleico viral. "Cp/ml" significa "copias por mililitro", en la que una "copia" es una copia del ácido nucleico respectivo.

Un método ampliamente utilizado para el cálculo del LOD es el "análisis Probit", que es un método para analizar la relación entre un estímulo (dosis) y la respuesta cuantitativa (todo o nada). En un experimento típico de respuesta cuantitativa, se proporcionan a los grupos de animales diferentes dosis de un fármaco. El porcentaje de mortalidad a cada nivel de dosis se registra. Entonces estos datos pueden analizarse utilizando el análisis Probit. El modelo Probit asume que el porcentaje de respuesta está relacionado con el log de la dosis siguiendo una distribución normal acumulativa. Es decir, el log de las dosis puede utilizarse como variables para extraer el porcentaje de mortalidad a partir de una normal acumulativa. Utilizando la distribución normal, en lugar de otras distribuciones de probabilidad, se influencia la tasa de respuesta prevista en los extremos alto y bajo de las posibles dosis, pero tiene poca influencia cerca del centro.

El "análisis Probit" puede aplicarse con distintas "tasas de éxito". Como es conocido en la materia, la "tasa de éxito" se expresa comúnmente en porcentaje [%] e indica el porcentaje de resultados positivos a una concentración específica de un analito. Así por ejemplo, un LOD puede determinarse a una tasa de éxito del 95%, lo que significa que el LOD se calcula para un escenario en el que el 95% de los resultados válidos son positivos.

Las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos distintas de la PCR comprenden la reacción en cadena de la ligasa (LCR; Wu D. Y. y Wallace R. B., *Genomics* 4 (1989) 560- 69; y Barany F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991) 189- 193); la reacción en cadena de la ligasa polimerasa (Barany F., *PCR Methods and Applic.* 1 (1991) 5-16); Gap-LCR (WO 90/01069); reacción en cadena de reparado (PE 0439182 A2), 3SR (Kwoh D. Y. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 1173-1177; Guatelli J.C., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 1874-1878; WO 92/08808), y NASBA (US 5.130.238). Además, existen la amplificación con desplazamiento de la cadena (SDA), amplificación mediada por transcripción (TMA) y amplificación Q[®] (para una revisión, véase por ejemplo Whelen A. C. y Persing D. H., *Annu. Rev. Microbiol.* 50 (1996) 349- 373; Abramson R. D. y Myers T. W., *Curr Opin Biotechnol* 4 (1993) 41-47).

Los métodos de detección de ácidos nucleicos adecuados son conocidos para el experto en el área y se describen en los libros de texto estándar, como Sambrook J. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989 y Ausubel F. et al.: *Current Protocols in Molecular Biology* 1987, J. Wiley y Sons, NY. Pueden darse pasos adicionales de purificación antes de realizar el paso de detección del ácido nucleico, como por ejemplo un paso de precipitación. Los métodos de detección pueden incluir pero no se limitan a la unión o intercalado de colorante específicos como el bromuro de etidio, que se intercala en el DNA de doble cadena y cambia su fluorescencia a partir de ese momento. El ácido nucleico purificado también puede separarse mediante métodos electroforéticos, opcionalmente tras una digestión por restricción y se visualizan a continuación. También existen ensayos basados en sondas que explotan la hibridación de oligonucleótidos a secuencias específicas y la subsiguiente detección del híbrido. También es posible secuenciar el ácido nucleico tras los pasos adicionales conocidos para el experto en el área. La polimerasa de ácidos nucleicos dependiente de molde preferible es la polimerasa de DNA ZO5 y las mutaciones de la misma. Otras polimerasas de ácido nucleico dependientes de molde útiles en la invención son la polimerasa Taq y polimerasa Tth. Otras polimerasas de ácido nucleico útiles para los métodos de acuerdo con la invención serán conocidas por el experto.

Antes de que se puedan analizar los ácidos nucleicos en uno de los ensayos anteriormente mencionados, se deben aislar o purificar a partir de muestras biológicas que contienen mezclas complejas de diferentes componentes. A menudo, para los primeros pasos, se utilizan procesos que permiten el enriquecimiento de los ácidos nucleicos. Para liberar el contenido de las células o las partículas virales, éstas pueden tratarse con enzimas o con químicos para disolver, degradar o desnaturalizar las paredes celulares o las partículas virales. Este proceso se denomina comúnmente lisis. La solución resultante que contiene tal material lisado se denomina lisado. Un problema que a menudo aparece durante la lisis es que otras enzimas que degradan el componente de interés, por ejemplo desoxirribonucleasas o ribonucleasas que degradan los ácidos nucleicos, entran en contacto con el componente de interés durante el procedimiento de lisis. Estas enzimas de degradación también pueden estar presentes en el exterior de las células o pueden estar separadas espacialmente en diferentes compartimentos celulares previamente a la lisis. A medida que tiene lugar la lisis, el componente de interés queda expuesto a dichas enzimas de degradación. Otros componentes liberados durante este proceso pueden ser, por ejemplo, endotoxinas que pertenecen a la familia de los lipopolisacáridos, que son tóxicos para las células y pueden causar problemas en los productos que se pretende utilizar en la terapia en humanos o animales.

Existe una variedad de métodos para abordar el problema anteriormente mencionado. Es común utilizar agentes caotrópicos como el tiocianato de guanidinio o detergentes aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos o no iónicos cuando se pretende liberar los ácidos nucleicos. También es una ventaja utilizar proteasas que degradan rápidamente las enzimas o proteínas no deseadas previamente descritas. Sin embargo, esto puede producir otro problema ya que dichas sustancias o enzimas pueden interferir con los reactivos o componentes en los subsiguientes pasos.

Las enzimas que pueden utilizarse de forma ventajosa en tales procesos de lisis o de preparación de la muestra mencionada anteriormente son las enzimas que escinden los enlaces amida en las proteínas sustrato y que se clasifican como proteasas, o (de forma intercambiable) peptidasas (véase Walsh, 1979, *Enzymatic Reaction Mechanisms*. W. H. Freeman and Company, San Francisco, capítulo 3). Las proteasas utilizadas previamente en la materia comprenden las proteasas alcalinas (WO 98/04730) o proteasas ácidas (US 5.386.024). Una proteasa que se ha utilizado ampliamente para la preparación de muestras en el aislamiento de ácidos nucleicos previamente en la materia es la proteinasa K de *Tritirachium album* (véase por ejemplo, Sambrook J. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989) que está activa a alrededor de pH neutro y pertenece a una familia de proteasas conocidas para el experto en la materia, las subtilisinas. Es especialmente ventajosa para su utilización en los procesos de lisis o preparación de la muestra mencionados anteriormente la enzima esperasa, una proteasa robusta que mantiene su actividad tanto con una elevada alcalinidad como a elevadas temperaturas (PE 1.201.753).

En los pasos de preparación de la muestra siguiendo el paso de lisis, el componente de interés se enriquece de forma adicional. Si los componentes no proteicos de interés son por ejemplo ácidos nucleicos, éstos se extraen normalmente a partir de las mezclas de lisis complejas antes de utilizarlas en un ensayo basado en sondas.

Existen varios métodos para la extracción de ácidos nucleicos:

- métodos dependientes de secuencia o biospecíficos, como por ejemplo:

- cromatografía de afinidad
- hibridación a sondas inmovilizadas

- métodos independientes de secuencia o físico-químicos, como por ejemplo:

- 5
- extracción líquido-líquido con por ejemplo fenol-cloroformo
 - precipitación con por ejemplo etanol puro
 - extracción con papel de filtro
 - extracción con agentes formadores de micelas, como bromuro de cetilo, trimetilo o amonio
- 10
- unión a colorantes intercalantes inmovilizados, por ejemplo derivados de acridina
 - adsorción a gel de sílice o tierra de diatomeas
 - adsorción a partículas de vidrio magnéticas (MGP) o partículas de organo-silano bajo condiciones caotrópicas

15 De particular interés para los propósitos de extracción es la adsorción de ácidos nucleicos a una superficie de vidrio aunque es posible la utilización de otras superficies. Se han propuesto en los últimos años muchos procedimientos para aislar ácidos nucleicos de su entorno natural, por el uso de su comportamiento de unión a las superficies de vidrio. Si los ácidos nucleicos no modificados son el blanco, es preferible una unión directa de los ácidos nucleicos a un material con superficie de sílice porque, entre otras razones, los ácidos nucleicos no tienen que ser modificados, e incluso se pueden unir ácidos nucleicos nativos. Estos procesos se describen en detalle por varios documentos.

20 En Vogelstein B. et al., Proc. Natl. Acad. USA 76 (1979) 615-9, por ejemplo, se propone un procedimiento para la unión de ácidos nucleicos a partir de geles de agarosa en presencia de yoduro de sodio para unir a de vidrio Flint. La purificación de plásmido de DNA a partir de bacterias sobre polvo de vidrio en presencia de perclorato de sodio se describe en Marko M. A. et al., Anal. Biochem. 121 (1982) 382-387. En DE -A 37 34 442, se describe el aislamiento de DNA monocatenario de fago M13 sobre filtros de fibra de vidrio por precipitación de las partículas de fago empleando ácido acético y lisis de las partículas de fago con perclorato. Los ácidos nucleicos unidos a los filtros de fibra de vidrio se lavan y después se eluyen con un tampón Tris / EDTA que contiene metanol. Un procedimiento similar para purificar el DNA de fagos lambda se describe en Jakobi R. et al., Anal. Biochem. 175 (1988) 196-201. El procedimiento implica la unión selectiva de ácidos nucleicos a superficies de vidrio en soluciones de sal caotrópica y separación de los ácidos nucleicos de los contaminantes tales como agarosa, proteínas o residuos de células. Para separar las partículas de vidrio de los contaminantes, las partículas pueden centrifugarse o los fluidos se pueden extraer a través de filtros de fibra de vidrio. Este es un paso limitante, sin embargo, que impide que el procedimiento sea utilizado para procesar grandes cantidades de muestras. El uso de partículas magnéticas para inmovilizar ácidos nucleicos después de la precipitación por adición de sal y etanol es por ejemplo más ventajosa y se describe en Alderton R. P. et al., S., Anal. Biochem. 201 (1992) 166-169 y PCT GB 91 / 00212. En este procedimiento, los ácidos nucleicos se aglutinan junto con las partículas magnéticas. El aglutinado se separa del solvente original, mediante la aplicación de un campo magnético y realizando un paso de lavado. Después del paso de lavado, los ácidos nucleicos se disuelven en un tampón Tris. Este procedimiento tiene una desventaja, sin embargo, en que la precipitación no es selectiva para los ácidos nucleicos. En su lugar, se aglutinan también una serie de sustancias disueltas y sólidas. Como resultado, este procedimiento no puede utilizarse para eliminar cantidades significativas de ningún inhibidor de reacciones enzimáticas específicas que puedan estar presentes. También está disponible en el mercado vidrio poroso magnético, que contiene partículas magnéticas en una matriz de vidrio poroso, en particular y está cubierto con una capa que contiene estreptavidina. Este producto se puede usar para aislar materiales biológicos, por ejemplo, proteínas o ácidos nucleicos, si se modifican en un paso de preparación complejo de manera que se unen covalentemente a la biotina. Adsorbentes particulares magnetizables demostraron ser muy eficientes y adecuados para la preparación automatizada de muestras. Pigmentos superparamagnéticos ferrimagnéticos así como ferromagnéticos se utilizan para este propósito. Las PVM y métodos más preferidos que utilizan partículas de vidrio magnéticas son los descritos en el documento WO 01 / 37291. Particularmente útil para el aislamiento de ácidos nucleicos en el contexto de la invención es el método de acuerdo con R. Boom et al. (J Clin. Microbiol. 28 (1990), 495-503). Después de la purificación o el aislamiento de los ácidos nucleicos, incluyendo el ácido nucleico diana a partir de su entorno natural, se puede detectar el ácido nucleico diana.

50

En una realización, el método de la invención incluye pasos para evitar la contaminación. Por ejemplo, un método enzimático que utiliza DNA glicosilasa - uracilo se describe en la patente de EE.UU. N ° 5.035.996, 5.683.896 y 5.945.313 para reducir o eliminar la contaminación entre un ciclo de funcionamiento de termociclador y el siguiente. Además, las prácticas y procedimientos de contención de laboratorio estándar son deseables cuando se realiza el método de la invención. Las prácticas y procedimientos de contención incluyen, pero no se limitan a, áreas de trabajo separadas para diferentes pasos de un método, campanas de contención, puntas de pipeta de filtro de barrera y pipetas de desplazamiento de aire dedicadas. Las prácticas y procedimientos de contención consistentes por parte del personal son necesarios para la precisión en un laboratorio de diagnóstico que manipula muestras clínicas.

60

Los métodos anteriormente expuestos se basan preferentemente en la transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET) entre una porción donadora fluorescente y una porción aceptora fluorescente. Una porción donadora fluorescente representativa es fluoresceína, y las correspondientes porcionesceptoras fluorescentes representativas incluyen LC-Red 640, LC-Red 705, Cy5, y Cy5.5. Típicamente, el paso de detección incluye excitar la muestra a una longitud de onda absorbida por la porción fluorescente donadora y visualizar y / o medir la longitud

65

de onda emitida por la correspondiente porción aceptora fluorescente. Según la invención, la detección está seguida por la cuantificación de FRET. Preferiblemente, el paso de detección se lleva a cabo después de cada paso de ciclación. Más preferiblemente, el paso de detección se realiza en tiempo real. Mediante el uso de la instrumentación de PCR en tiempo real comercialmente disponible (por ejemplo, LightCycler™ o TaqMan®), la amplificación por PCR y la detección del producto de amplificación se pueden combinar en una sola cubeta cerrada reduciendo drásticamente el tiempo de los ciclos. Dado que la detección se produce simultáneamente con la amplificación, los métodos de PCR en tiempo real obvian la necesidad de manipulación del producto de amplificación, y disminuyen el riesgo de contaminación cruzada entre los productos de amplificación. La PCR en tiempo real reduce enormemente el tiempo total del experimento y es una atractiva alternativa a las técnicas convencionales de PCR en el laboratorio clínico.

Las siguientes solicitudes de patente describen PCR en tiempo real tal como se utiliza en la tecnología LightCycler™: WO 97/46707, WO 97/46714 y el documento WO 97/46712. El instrumento LightCycler™ es un termociclador rápido combinado con un fluorómetro de microvolúmenes que utiliza una óptica de alta calidad. Esta técnica termociclada rápida utiliza cubetas de vidrio delgado como recipientes de reacción. El calentamiento y enfriamiento de la cámara de reacción están controlados alternando aire caliente y aire del ambiente. Debido a la baja masa de aire y la alta relación de área superficial con el volumen de las cubetas, las tasas de cambio de temperatura muy rápidas se pueden conseguir dentro de la cámara térmica.

La tecnología TaqMan® utiliza una sonda de hibridación de una sola cadena marcada con dos porciones fluorescentes. Cuando la primera porción fluorescente se excita con luz de una longitud de onda adecuada, la energía absorbida se transfiere a una segunda porción fluorescente de acuerdo con los principios de la FRET. La segunda porción fluorescente es generalmente una molécula de bloqueo. Los colorantes fluorescentes típicos utilizados en este formato son, por ejemplo, entre otros, FAM, HEX, Cy5, JA270, Cyan y Cy5.5. Durante el paso de hibridación de la reacción de PCR, la sonda de hibridación marcada se une al ácido nucleico diana (es decir, el producto de amplificación) y es degradada por la exonucleasa 5' a 3' de la polimerasa Taq u otra polimerasa adecuada como se conoce por un experto en la materia, tal como la preferida polimerasa ZO5, durante la posterior fase de elongación. Como resultado, la porción fluorescente excitada y la porción bloqueadora están separadas espacialmente uno de otra. Como consecuencia, tras la excitación de la primera porción fluorescente en ausencia del inhibidor de la fluorescencia, se puede detectar la emisión de fluorescencia de la primera porción fluorescente.

En ambos formatos de detección descritos anteriormente, la intensidad de la señal emitida se puede correlacionar con el número de moléculas de ácido nucleicos diana originales.

Como alternativa a la FRET, se puede detectar un producto de amplificación utilizando un colorante de unión a DNA de doble cadena tal como un colorante de unión a DNA fluorescente (por ejemplo, SybrGreen I® o SYBRGold® (Molecular Probes)). Tras la interacción con el ácido nucleico de doble cadena, dichos colorantes de unión a DNA fluorescentes emiten una señal de fluorescencia después de la excitación con luz a una longitud de onda adecuada. Un colorante de unión al DNA de doble cadena tal como un colorante intercalante de ácido nucleico también se puede utilizar. Cuando se utilizan colorantes de unión a DNA de doble cadena, un análisis de la curva de fusión se realiza generalmente para la confirmación de la presencia del producto de amplificación.

Por lo tanto, en una realización preferida de la invención, el método descrito anteriormente que comprende proporcionar varias sondas comprende, además,

en el paso c) un paso de hibridación compuesto por dicho paso de ciclación, en el que dicho paso de hibridación comprende la hibridación de las diferentes porciones de secuencias amplificadas por tales dos o más pares de cebadores específicos para diferentes porciones de la secuencia de dicho ácido nucleico microbiano, si el ácido nucleico microbiano está presente en dicha muestra, con tales dos o más sondas, e hibridando dicha porción de secuencia o porciones amplificadas por dichos uno o más pares de cebadores específicos para dichos uno o más ácidos nucleicos estándar cuantitativos con una o más sondas, en el que las sondas se marcan con una porción donadora fluorescente y la correspondiente porción aceptora fluorescente

en el paso d) detectar la presencia o ausencia de resonancia de fluorescencia por transferencia de energía (FRET) entre dicha porción donadora fluorescente y dicha porción aceptora fluorescente de dichas sondas, en el que la presencia o ausencia de fluorescencia generada por dichas dos o más sondas de hibridación para las diferentes porciones de secuencias amplificadas por dichos dos o más pares de cebadores específicos para diferentes porciones de la secuencia de dicho ácido nucleico microbiano es indicativo de la presencia o ausencia del ácido nucleico microbiano en dicha muestra biológica

en el paso e) la determinación de la cantidad de dicho ácido nucleico microbiano en dicha muestra por comparación de las señales fluorescentes generadas por dichas dos o más sondas que se hibridan con las diferentes porciones de secuencias amplificadas por dichos dos o más pares de cebadores específicos para diferentes porciones de la secuencia de dicho ácido nucleico microbiano y dichas una o más sondas que hibridan con dicha porción de secuencia o porciones amplificadas por dichos uno o más pares de cebadores específicos para dicho uno o más ácidos nucleicos estándar cuantitativos.

La circunstancia de que dicho uno o más ácidos nucleicos estándar cuantitativos se procesen en la misma mezcla de reacción que el ácido nucleico microbiano sospechoso de estar presente en la muestra biológica proporciona la ventaja, entre otras, que los efectos inhibidores dependientes de la muestra igualmente afectan a la reacciones de amplificación y detección del ácido nucleico microbiano y dichos uno o más ácidos nucleicos estándar cuantitativos, por lo tanto la cuantificación se puede realizar con más precisión.

También se pueden utilizar balizas moleculares junto con FRET para detectar la presencia de un producto de amplificación usando los métodos de PCR en tiempo real de la invención. La tecnología de baliza molecular utiliza una sonda de hibridación marcada con una primera porción fluorescente y una segunda porción fluorescente. La segunda porción fluorescente es generalmente un bloqueador, y las marcajes fluorescentes se encuentran normalmente en cada extremo de la sonda. La tecnología de baliza molecular utiliza un oligonucleótido de sonda que tiene secuencias que permiten la formación de estructura secundaria (por ejemplo, una horquilla). Como resultado de la formación de la estructura secundaria dentro de la sonda, ambas porciones fluorescentes están en proximidad espacial cuando la sonda está en solución. Después de la hibridación de los productos de amplificación, la estructura secundaria de la sonda se deshace y las porciones fluorescentes se separan una de la otra de tal manera que después de la excitación con luz de una longitud de onda adecuada, se puede detectar la emisión de la primera porción fluorescente.

Por lo tanto, en un método preferido de acuerdo con la invención es el método descrito anteriormente que utiliza FRET, en el que dichas sondas comprenden una secuencia de ácido nucleico que permite la formación de estructura secundaria, en el que dicha estructura secundaria resulta en la formación de proximidad espacial entre dicha primera y segunda porción fluorescente.

Una FRET eficiente solo puede tener lugar cuando las porciones fluorescentes están en proximidad local directa y cuando el espectro de emisión de la porción donadora fluorescente se solapa con el espectro de absorción de la porción aceptora fluorescente.

Por lo tanto, en una realización preferida de la invención, dichas porciones donadoras y aceptoras fluorescentes están a no más de 5 nucleótidos entre ellas en dicha sonda.

En una forma de realización preferida adicional, dicho porción aceptora fluorescente es un bloqueador.

Con el fin de ser capaz de hacer que el método de acuerdo con la invención sea independiente de los efectos específicos de secuencia en relación con las diferentes porciones de secuencias de ácido nucleico microbiano detectado y / o cuantificado en la presente invención, en una realización preferida, el método de acuerdo con la invención comprende la amplificación de una o más de dichas diferentes porciones de secuencias de ácido nucleico microbiano y dicho uno o más ácidos nucleicos estándar cuantitativos con el mismo par de cebadores.

Por otra parte, puede ser favorable tener diferentes pares de cebadores que amplifiquen las diferentes secuencias diana y el ácido o ácidos nucleicos estándar cuantitativos. Un ejemplo es la presencia de concentraciones muy altas de ácidos nucleicos en la mezcla de reacción después de haber añadido la muestra biológica, ya que, por ejemplo, si los mismos cebadores confieren alargamiento de múltiples porciones de secuencia de la diana y / o el ácido o ácidos nucleicos estándar cuantitativos. En este último caso, la concentración de dichos cebadores disminuye más rápidamente que si sólo los cebadores amplificaran una porción de secuencia distinta. Por lo tanto, en una realización preferida, el método de acuerdo con la invención comprende amplificar dichas diferentes porciones de secuencias de ácido nucleico microbiano y dicho uno o más ácidos nucleicos estándar cuantitativos con diferentes pares de cebadores.

Con el fin de mejorar la señal detectable o señales generadas por dichas dos o más porciones de secuencias diferentes del ácido nucleico microbiano, pueden generar una señal a través del mismo colorante fluorescente. Por lo tanto, en una realización preferida, el método de acuerdo con la invención comprende el empleo de un colorante fluorescente como un marcador detectable para los productos de amplificación derivados de dichas dos o más porciones diferentes de la secuencia del ácido nucleico microbiano, y un colorante fluorescente diferente como un marcador detectable para el producto de amplificación o productos derivados de dichos uno o más ácidos nucleicos estándar cuantitativos.

Puede ser favorable además tener la capacidad de determinar las cantidades respectivas de dichas dos o más porciones de secuencias diferentes del ácido nucleico microbiano, por ejemplo, con el fin de analizar las mutaciones o diferentes subtipos. Por lo tanto, en una realización preferida, el método de acuerdo con la invención comprende el empleo de un colorante fluorescente distinto como un marcador detectable para cada uno de los productos de amplificación derivados del ácido nucleico microbiano, y un colorante fluorescente diferente como un marcador detectable para el producto de amplificación o productos derivados de dichos uno o más ácidos nucleicos estándar cuantitativos, en el que el paso de cuantificación comprende cuantificar por separado cada una de las porciones de secuencias amplificadas de la secuencia diana microbiana.

Tal como se describió anteriormente, en el formato TaqMan, durante el paso de hibridación de la reacción de PCR, la sonda de hibridación marcada se une al ácido nucleico diana (es decir, el producto de amplificación) y es degradada por la actividad exonucleasa 5' a 3' de la polimerasa Taq u otra polimerasa adecuada, como es conocido por el experto en la materia, tales como la polimerasa preferida ZO5, durante la posterior fase de elongación.

5 Por lo tanto, en una realización preferida, en el método de acuerdo con la invención, la amplificación emplea una enzima polimerasa que tiene actividad exonucleasa 5'a 3'.

10 Puede ser ventajoso además emplear solamente un ácido nucleico estándar cuantitativo para la detección y cuantificación del ácido nucleico microbiano, ya que por ejemplo, reduce la necesidad de recursos y el diseño de otras secuencias apropiadas.

15 Por lo tanto, preferiblemente, en el método según la invención, exactamente un ácido nucleico estándar cuantitativo está presente en la mezcla de reacción.

El método de acuerdo con la invención se puede aplicar fácilmente para detectar los ácidos nucleicos derivados de múltiples microorganismos, ampliando así las posibilidades de un uso en un entorno clínico con un fácil procedimiento de cuantificación y de detección en un solo tubo.

20 Por lo tanto, en una realización preferida, el método de acuerdo con la invención comprende la detección y cuantificación simultánea de dicho ácido nucleico microbiano en múltiples microorganismos diferentes.

25 El método de acuerdo con la invención se puede aplicar ventajosamente en ácidos nucleicos virales. Por lo tanto, en una realización preferida de la invención, el ácido nucleico microbiano es un ácido nucleico viral.

Entre los ácidos nucleicos virales, el método de acuerdo con la invención puede aplicarse más ventajosamente sobre el VIH. Por lo tanto, en una realización preferida de la invención, el ácido nucleico microbiano es un ácido nucleico del VIH.

30 Regiones genéticas adecuadas como dianas de detección y cuantificación en el VIH son por ejemplo, GAG, POL, y / o LTR. Más preferiblemente, en el método de acuerdo con la invención, es que las diferentes porciones de secuencias sean secuencias de GAG y LTR del VIH.

35 Un ejemplo de cómo realizar el cálculo de los resultados cuantitativos en el formato TaqMan basado en un estándar interno se describe a continuación. Se calcula la titulación a partir de los datos de entrada de los valores de fluorescencia corregidos por el instrumento de un ciclo completo de PCR. Un conjunto de muestras que contienen un ácido nucleico diana tal como un ácido nucleico microbiano y un ácido nucleico estándar cuantitativo se someten a PCR en un termociclador usando un perfil de temperatura especificado. En las temperaturas seleccionadas y en los tiempos durante el perfil de PCR, las muestras se iluminan con luz filtrada y los datos de fluorescencia filtrados se recogen para cada muestra para el ácido nucleico diana y el ácido nucleico estándar cuantitativo. Después de completar un ciclo completo de PCR, las lecturas de fluorescencia se procesan para producir un conjunto de datos de la concentración de colorante para el ácido nucleico estándar cuantitativo y un conjunto de datos de la concentración de colorante para el ácido nucleico diana. Cada conjunto de datos de la concentración de colorante se procesan de la misma manera. Después de varias pruebas de verosimilitud, los valores de codo (CT) se calculan para el ácido nucleico estándar cuantitativo y el ácido nucleico diana. El valor codo se define como el punto en el que la fluorescencia del ácido nucleico diana o el ácido nucleico estándar cuantitativo cruza un umbral predefinido (concentración de fluorescencia). La determinación de la titulación se basa en las suposiciones de que el ácido nucleico diana y el ácido nucleico estándar cuantitativo se amplifican con la misma eficacia y que en el valor codo calculado se amplifican y detectan cantidades iguales de copias de amplicón de ácido nucleico diana y de ácido nucleico estándar cuantitativo. Por lo tanto, la (CTQS-CT diana) es lineal al log (conc. diana / conc. QS). El título de T se puede calcular entonces por ejemplo mediante el uso de una fórmula de calibración polinómica como en la siguiente ecuación:

$$T^i = 10^{(a(CTQS-CT \text{ diana})^2 + b(CTQS-CT \text{ diana}) + c)}$$

55 Las constantes polinómicas y la concentración del ácido nucleico estándar cuantitativo son conocidas, por lo tanto, la única variable en la ecuación es la diferencia (CTQS - CT diana).

60 Otro objeto de la invención es el uso de un ácido nucleico estándar cuantitativo para detectar y cuantificar un ácido nucleico microbiano de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos anteriormente.

Además, la invención proporciona un equipo para detectar y cuantificar un ácido nucleico microbiano en una muestra biológica mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente, dicho equipo comprende uno o más ácidos nucleicos estándar cuantitativos, dos o más pares de cebadores, siendo dichos pares de cebadores específicos para diferentes porciones de la secuencia de dicho ácido nucleico microbiano, y uno o más pares de cebadores específicos para dicho uno o más ácidos nucleicos estándar.

Preferiblemente, el equipo comprende, además, dos o más sondas específicas para diferentes porciones de la secuencia de dicho ácido nucleico microbiano, y una o más sondas específicas para dichos uno o más ácidos nucleicos estándar.

5 Dichos equipos conocidos en la materia comprenden además artículos de plástico que se puede utilizar durante el procedimiento de preparación de la muestra como por ejemplo, placas de microtitulación en el formato de 96 o 384 pocillos o tubos de reacción ordinarios fabricados por ejemplo por Eppendorf, Hamburgo, Alemania y todos los otros reactivos para llevar a cabo el método de acuerdo con la invención. Por lo tanto, el equipo puede contener
10 adicionalmente un material con una afinidad para los ácidos nucleicos, preferiblemente el material con una afinidad para los ácidos nucleicos comprende un material con una superficie de sílice. Preferiblemente, el material con una superficie de sílice es un vidrio. Más preferiblemente, el material con una afinidad para los ácidos nucleicos es una composición que comprende partículas de vidrio magnéticas. El equipo puede comprender adicionalmente un tampón de lisis que contiene por ejemplo, agentes caotrópicos, detergentes o alcoholes o mezclas de los mismos para permitir la lisis de las células. Estos componentes del equipo de acuerdo con la invención se pueden
15 proporcionar por separado en tubos o recipientes de almacenamiento. Dependiendo de la naturaleza de los componentes, estos pueden estar incluso dentro de un solo tubo o recipiente de almacenamiento. El equipo puede comprender adicionalmente una solución de lavado que es adecuada para el paso de lavado de las partículas de vidrio magnéticas cuando un ácido nucleico se une a la misma. Esta solución de lavado puede contener etanol y / o agentes caotrópicos en una solución tamponada o soluciones con un pH ácido y sin etanol y / o agentes caotrópicos como se describió anteriormente. A menudo la solución de lavado u otras soluciones se proporcionan como
20 soluciones de reserva que tienen que diluirse antes de su utilización. El equipo puede comprender adicionalmente un eluyente o tampón de elución, es decir, una solución o un tampón (por ejemplo, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) o agua pura para eluir el ácido nucleico unido a las partículas de vidrio magnéticas. Además, pueden estar presentes reactivos adicionales o soluciones tamponadas que se pueden utilizar para el proceso de purificación de un ácido
25 nucleico.

Preferiblemente, el equipo contiene una enzima polimerasa que tiene actividad exonucleasa 5'a 3'. También se prefiere que el equipo contenga una enzima con actividad transcriptasa inversa.

30 En una forma de realización preferida de la invención, el método de acuerdo con la invención está incorporado en una secuencia de métodos llevados a cabo dentro de un sistema analítico, formando por lo tanto preferiblemente un proceso automatizable.

35 De acuerdo con la invención, un sistema analítico para realizar el método de la invención comprende, preferiblemente,

- un módulo de preparación de muestras que comprende un tampón de lisis para proporcionar una muestra biológica

40 - un módulo de detección de amplificación y que comprende un receptáculo de reacción en el que se realiza el método.

45 El módulo de preparación de muestras puede comprender ventajosamente componentes para los procedimientos de preparación de muestras anteriores, es decir, por ejemplo partículas de vidrio magnéticas y un imán para separarlos de la solución, soluciones de sal caotrópica y uno o más recipientes que contienen la muestra en bruto y los reactivos necesarios para la preparación de muestras.

50 El recipiente de reacción en el módulo de amplificación y de detección puede ser por ejemplo una placa de microtitulación, un vial de centrifugación, un tubo de lisis, o cualquier otro tipo de recipiente adecuado para contener una mezcla de reacción de acuerdo con la invención.

55 En una forma de realización preferida de la invención, el sistema analítico contiene un módulo de almacenamiento que contiene los reactivos para realizar el método de la invención.

Dicho módulo de almacenamiento puede contener además otros componentes útiles para el método de la invención, por ejemplo, desechables tales como puntas de pipeta o incluso recipientes para ser utilizados como recipientes de
60 reacción dentro del módulo de amplificación y detección.

65 Además, en una realización preferida de la invención, el sistema analítico contiene un módulo de transferencia para la transferencia de la muestra biológica desde el módulo de preparación de muestras hacia el módulo de amplificación y detección.

A pesar de que es posible llevar a cabo dicha transferencia manualmente, es preferible utilizar un sistema automatizado en el que la transferencia se lleva a cabo por ejemplo, por un dispositivo robótico tales, por ejemplo, como un estante móvil con motor o un brazo móvil robotizado.

Un proceso automatizable significa que los pasos del proceso son adecuados para ser llevados a cabo con un aparato o máquina capaz de funcionar con poco o ningún control o influencia externa de un ser humano. Un método automatizado significa que los pasos del método automatizable se llevan a cabo con un aparato o máquina capaz de funcionar con poco o ningún control o influencia externa de un ser humano. Sólo los pasos de preparación para el método pueden tener que realizarse a mano, por ejemplo, los recipientes de almacenamiento tienen que llenarse y ponerse en su lugar, la elección de las muestras tiene que realizarse por un ser humano y otros pasos conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, el funcionamiento de un ordenador de control. El aparato o máquina, por ejemplo, pueden añadir automáticamente líquidos, mezclar las muestras o realizar los pasos de incubación a temperaturas específicas. Normalmente, una máquina o un aparato de este tipo es un robot controlado por un ordenador que lleva a cabo un programa en el que se especifican los pasos y comandos individuales.

Todas las otras formas de realización preferidas y las descripciones específicas de realizaciones de los usos, equipos y sistemas de análisis de acuerdo con la invención son los mencionados para el procedimiento según la invención.

Pies de figura

Figura 1:

Frecuencias de infravaloración de los especímenes de VIH-1 con la prueba 2 (COBAS AmpliPrep / COBAS TaqMan HIV-1) comparado con la prueba 1 (COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR) como se observa en diferentes estudios realizados en lugares de varios países europeos así como en un lugar en Tailandia.

Figura 2:

A. Ejemplos típicos de desparejamientos en el extremo 3' de un cebador río arriba en una prueba de PCR a tiempo real del VIH-1 que dan lugar a una infravaloración de varios grados, según se muestra en la columna 5.

B. Ejemplos típicos de desparejamientos en el extremo 3' de un cebador río abajo en una prueba de PCR a tiempo real del VIH-1 que dan lugar a una infravaloración de varios grados, según se muestra en la columna 5.

Figura 3:

Un número de 16 muestras infravaloradas en la prueba 2 (solo GAG) comparadas con la prueba 1 (véase la columna 5 para la diferencia en \log^{10} en el título) se analizaron con la prueba 2 modificada, que tiene como dianas las GAG y las regiones LTR del VIH de forma simultánea. Los resultados del título en \log^{10} de la prueba 2 modificada (GAG+LTR) se compararon con los de la prueba 2 (GAG). Todas las muestras previamente infravaloradas en la prueba 2 (GAG) se cuantificaron de forma significativamente elevada con la prueba 2 modificada (GAG+LTR). Los resultados del título en \log^{10} de la prueba 2 modificada (GAG+LTR) comparados con los de la prueba 1 revelaron que en todas las muestras previamente infravaloradas se restauró el título comparado con la prueba 1 y además se identificaron dos muestras infravaloradas en la prueba 1 (2B13 y 2B21).

Figura 4:

El límite de detección (LOD) se determinó mediante el análisis de varios niveles de concentración del estándar de la WHO del VIH, inferiores y superiores al LOD esperado en múltiples replicados. El correspondiente LOD se determinó mediante un análisis PROBIT con una tasa de éxito del 95%. La muestra 2 contenía los cebadores y la sonda sólo para la región GAG del VIH, la prueba 2a contenía los cebadores y la sonda sólo de la región LTR del VIH y la prueba 2 modificada contenía los cebadores y la sonda tanto de las regiones GAG como LTR del VIH.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos describen realizaciones en las que la invención puede realizarse. Será evidente para el experto en la materia que estos ejemplos no son limitantes y pueden modificarse dentro del espíritu de la invención.

Ejemplo 1:

La prueba COBAS AmpliPrep/ COBAS TaqMan HIV-1 (prueba 2) se compara con la prueba COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR (prueba 1, ambas pruebas disponibles en Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) en el contexto de diferentes estudios realizados en lugares de varios países europeos así como un lugar en Tailandia.

Las pruebas se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Brevemente, para la prueba 2, se llevó a cabo la preparación de la muestra utilizando partículas de vidrio magnéticas y reactivos caotrópicos, mientras en el paso de amplificación y detección, se utilizaron las siguientes concentraciones:

cebadores dirigidos frente a la región GAG: 0,003%,

sondas específicas para los productos amplificados de las GAG y ácidos nucleicos estándares cuantitativos: 0,003%,

polimerasa de DNA ZO5: 0,05%

dUTP, dATP, dTTP, dCTP, dTTP: 0,04%.

Las concentraciones se determinaron mediante análisis PROBIT con un 95% de tasa de éxito, los resultados se muestran en la Figura 1.

Ejemplo 2:

5 Un número de 16 muestras infravaloradas en la prueba 2 (COBAS TaqMan HIV-1, sólo dianas GAG) comparadas con la prueba 1 (véase la columna 5 para la diferencia en \log^{10} en el título) se analizaron con la prueba 2 modificada, que tiene como dianas las GAG y las regiones LTR del VIH de forma simultánea. Los resultados se muestran en la

10 Figura 3. Las condiciones de prueba fueron las mismas para ambas pruebas, con la excepción de que se introdujeron cebadores adicionales y una sonda para las LTR a alrededor de un tercio de la concentración de los oligonucleótidos para la amplificación y detección de las GAG.

Ejemplo 3:

15 En esencialmente el mismo escenario que en el ejemplo 2, se determinó el LOD para la prueba 2 y la prueba 2 modificadas. Adicionalmente, se realizó un tercer experimento con los oligonucleótidos para la amplificación y detección de las LTR pero no las GAG (prueba 2a). La concentración de oligonucleótido en la prueba 2a fue equivalente a la concentración de oligonucleótidos para la amplificación y detección de las LTR en la prueba 2 modificada.

Listado de secuencias

<110> F. Hoffmann-La Roche
 <120> Detección y cuantificación multiplex de ácidos nucleicos microbianos controlada de forma interna
 <130> 25005 EP-PM
 5 <160> 30
 <170> PatentIn versión 3.4
 <210> 1
 <211> 30
 <212> DNA
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador/ sonda
 <400> 1 agtgggggga catcaagcag ccatgcaaat 30
 <210> 2
 15 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador/ sonda
 20 <400> 2 gctttcagcc cagaagtaat acc 23
 <210> 3
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> cebador/ sonda
 <400> 3 ggacacatca agcagccatg caaat 25
 <210> 4
 <211> 29
 30 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador/ sonda
 <400> 4 agtgggggga catcaagcag ccatgcaaa 29
 35 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> cebador/ sonda
 <400> 5 agagaaccaa ggggaagtga 20
 <210> 6
 <211> 28
 <212> DNA
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador/ sonda
 <400> 6 ataatccacc tatcccagta ggagaaat 28
 <210> 7
 50 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador/ sonda
 55 <400> 7 agtgggggga caccaggcag caatgcaaa 29
 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> cebador/ sonda
 <400> 8 catagcagga actactagta 20
 <210> 9
 <211> 25
 65 <212> DNA

<213> Artificial
 <220>
 <223> cebador/ sonda
 <400> 9 ctatgtcact tccccttggg tctct 25
 5 <210> 10
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> cebador/ sonda
 <400> 10 ggtactagta gttcctgcta taccactcc 30
 <210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador/ sonda
 <400> 11 tcctgtctt atgtccagaa 20
 <210> 12
 20 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador/ sonda
 25 <400> 12 ggtactagta gttcctgcta tgcactcc 30
 <210> 13
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> cebador/ sonda
 <400> 13 ttgtgtcctt gcttatgta cagaatgc 28
 <210> 14
 <211> 28
 35 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador/ sonda
 40 <400> 14 tactagtagt tcctgctatg taccactcc 28
 <210> 15
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> cebador/ sonda
 <400> 15 tgtgtatga tgggtttaa atc 23
 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 50 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador/ sonda
 <400> 16 actctaaagg gttccttgg 20
 <210> 17
 55 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador/ sonda
 60 <400> 17 tcagcattat cagaaggagc caccaccaca 29
 <210> 18
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial
 65 <220>
 <223> cebador/ sonda

<400> 18 tctgcagctt cctcattgag gtatcttta ac 32
 <210> 19
 <211> 41
 <212> DNA
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador/ sonda
 <400> 19 atcctgggat taaataaaat agtaagaatg tatagcccta c 41
 <210> 20
 10 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador/ sonda
 15 <400> 20 accatcaatg agggaagctg cagaatggg 29
 <210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> cebador/ sonda
 <400> 21 ggctaactag ggaccactg 20
 <210> 22
 <211> 26
 25 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador/ sonda
 <400> 22 tgactctggt aactagagat ccctca 26
 30 <210> 23
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> cebador/ sonda
 <400> 23 actaggaac cactgct 18
 <210> 24
 <211> 17
 <212> DNA
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador/ sonda
 <400> 24 ggtctgagg atctcta 17
 <210> 25
 45 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador/ sonda
 50 <400> 25 ctgctagaga tttccacac tgac 24
 <210> 26
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> cebador/ sonda
 <400> 26 tcagcaagcc gagtctgcg tcgaga 26
 <210> 27
 <211> 27
 60 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador/ sonda
 <400> 27 ccgctaagcc gagcccttg cgtcgga 27
 65 <210> 28
 <211> 34

ES 2 439 951 T3

<212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador/ sonda
 5 <400> 28 accagagtca cacaacagac gggcacacac tact 34
 <210> 29
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> cebador/ sonda
 <400> 29 tctctagcag tggcgcccga acagggac 28
 <210> 30
 <211> 580
 15 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ácido nucleico estándar cuantitativo
 <400> 30

tctagatctc	agcattatca	gaaggagcca	ccccacaaga	accactaata	ctctaatagac	60
aagtgggggg	acatcaagca	gccatgcaa	tgttaaaaag	aagggtgagat	gaccagagga	120
ctgagtccaa	tatcacgcat	agcactatag	aactctgcaa	gccacaagac	aagaagagag	180
aaccaagggg	aagtgacata	gcaggaacta	ctagtacctc	ccaaaataag	aaacaaataa	240
aagtaatcaa	tccggaactt	tatcttcaca	cctaattggag	atgaggatgg	taggtgggat	300
taaataaaat	agtaagaatg	tatagccctg	ttgacacttg	tacaggcctt	tcagcactat	360
taaactgaaa	ctagacttct	gagagactat	actatggaca	taaaaaggaa	ccaaaataag	420
accaaattgg	aaaggacggt	tttaaaaaga	cggctatgcg	agattgccag	cgaactaagt	480
gggaagcatc	actaaccag	cttcagcaat	ggtcaggtaa	gccggaaatg	atgacagcat	540
gtcagggagt	gggaaacatg	aggattaccc	atgtaagctt			580

20

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar y cuantificar un ácido nucleico microbiano en una muestra biológica, y dicho método comprende:
- 5 a) proporcionar una mezcla de reacción que comprende uno o más ácidos nucleicos estándares cuantitativos, dos o más pares de cebadores, siendo dichos pares de cebadores específicos para diferentes porciones de secuencia de dicho ácido nucleico microbiano, y uno o más pares de cebadores específicos para dicho uno o más ácidos nucleicos estándar,
 - 10 b) añadir dicha muestra biológica a dicha mezcla de reacción,
 - c) realizar uno o más ciclos, en los que un ciclo comprende un paso de amplificación, y dicho paso de amplificación comprende obtener dos o más productos de amplificación diferentes derivados de dicho ácido nucleico microbiano si se encuentra presente en dicha muestra y producir uno o más productos de amplificación derivados de dicho uno o más ácidos nucleicos estándares cuantitativos
 - 15 d) detectar y medir las señales detectables generadas por dichos productos de amplificación y que son proporcionales a su concentración en dicha mezcla de reacción, en la que la presencia o ausencia de la señal detectable o señales generadas por dicho ácido nucleico microbiano es indicativa de la presencia o ausencia del ácido nucleico microbiano en dicha muestra biológica
 - 20 e) determinar la cantidad de dicho ácido nucleico microbiano en dicha muestra biológica en comparación a las señales generadas por dicho ácido nucleico microbiano y dicho uno o más ácidos nucleicos estándares cuantitativos, en los que dichas dos o más porciones de secuencia diferentes del ácido nucleico microbiano son LTR y GAG del VIH.
2. El método de la reivindicación 1, que adicionalmente comprende en el paso a) proporcionar dos o más sondas específicas para las diferentes porciones de secuencia amplificadas mediante dichos dos o más pares de cebadores específicos de diferentes de porciones secuencia de dicho ácido nucleico microbiano, y una o más sondas específicas de la porción o porciones de secuencia amplificadas mediante dicho uno o más pares de cebadores específicos de dicho uno o más ácidos nucleicos estándares cuantitativos.
3. El método de la reivindicación 2, que adicionalmente comprende en el paso c) un paso de hibridación que está comprendido en dicho ciclo, en el que dicho paso de hibridación comprende la hibridación de diferentes porciones de secuencia amplificadas mediante dichos dos o más pares de cebadores específicos de diferentes porciones de secuencia de dicho ácido nucleico microbiano, si el ácido nucleico microbiano está presente en dicha muestra, con dichas dos o más sondas, y la hibridación de dicha porción o porciones de secuencia amplificadas mediante dicho uno o más pares de cebadores específicos para dicho uno o más ácidos nucleicos estándares cuantitativos con una o más sondas, en la que las sondas están marcadas con una porción donadora de fluorescencia y la porción correspondiente aceptora de fluorescencia, en el paso d) detectar la presencia o ausencia de transferencia de la energía de resonancia de la fluorescencia (FRET) entre dicha porción donadora de fluorescencia y dicha porción aceptora de fluorescencia de dicha sonda, en la que la presencia o ausencia de fluorescencia generada por dicho ácido nucleico microbiano es indicativo de la presencia o ausencia del ácido nucleico microbiano en dicha muestra biológica, en el paso e) determinar la cantidad de dicho ácido nucleico microbiano en dicha muestra por comparación de las señales fluorescentes generadas por dicho ácido nucleico microbiano y dichos ácidos nucleicos estándares cuantitativos.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende la amplificación de una o más de dichas porciones de secuencia diferentes del ácido nucleico microbiano y dicho uno o más ácidos nucleicos estándares cuantitativos con el mismo par de cebadores.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende la amplificación de dichas porciones de secuencia diferentes del ácido nucleico microbiano y dichos uno o más ácidos nucleicos estándares cuantitativos con diferentes pares de cebadores.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende utilizar un colorante fluorescente como marca detectable de los productos de amplificación derivados de dichos dos o más porciones de secuencia diferentes del ácido nucleico microbiano, y un colorante fluorescente diferente como marca detectable para el producto o productos de amplificación derivados de dicho uno o más ácidos nucleicos estándares cuantitativos.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende la utilización de un colorante fluorescente distinto como marca detectable para cada uno de los productos de amplificación derivados del ácido nucleico microbiano, y un colorante fluorescente diferente como marca detectable para el producto o productos de amplificación derivados de dichos uno o más ácidos nucleicos estándares cuantitativos, en el que el paso de cuantificación comprende cuantificar de forma separada cada una de las porciones de secuencia amplificadas de la secuencia diana microbiana.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que exactamente un ácido nucleico estándar cuantitativo está presente en la mezcla de reacción.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las secuencias de ácido nucleico de dicho uno o más cebadores son de al menos 12 nucleótidos contiguos seleccionados a partir del grupo de Id. de Sec. N° 1-16 y 21-27 o las correspondientes secuencias de ácido nucleico complementarias de las mismas.
- 5 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, en el que las secuencias de ácido nucleico de dichas dos o más sondas son de al menos 12 nucleótidos contiguos seleccionados de entre el grupo de Id. de Sec. N° 17-20, 28, 29 o las correspondientes secuencias de ácido nucleico complementarias de las mismas.
- 10 11. La utilización de un ácido nucleico estándar cuantitativo para detectar y cuantificar un ácido nucleico microbiano de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 15 12. Un equipo para detectar y cuantificar un ácido nucleico microbiano en una muestra biológica mediante el método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, y dicho equipo comprende uno o más ácidos nucleicos estándares cuantitativos, dos o más pares de cebadores, y dichos pares de cebadores son específicos para diferentes porciones de secuencia de dicho ácido nucleico microbiano, y uno o más pares de cebadores específicos para dicho uno o más ácidos nucleicos estándar, en el que dichas dos o más porciones de secuencia diferentes del ácido nucleico microbiano son LTR y GAG del VIH.

Figura 1

Lugares (países) de análisis	Número de especímenes analizados	Proporción del título: Prueba 1 / Prueba 2 Porcentaje de especímenes infravalorados en la Prueba 2			
		En > factor 3	En > factor 5	En > factor 10	En > factor 100
Lugar 1, Europa	542	10 (1.8%)	7 (1.3%)	6 (1.1%)	1 (0.2%)
Lugar 2, Europa	194	2 (1.0%)	0	0	0
Lugar 3a	104	1 (1.0%)	0	0	0
Lugar 3b	14	1 (7.1%)	1 (7.1%)	0	0
Lugar 3c	19	0	0	0	0
Subtotal: Lugar 3, Europa	137	2 (1.4%)	1 (0.7%)	0	0
Lugar 4a	41	2 (4.9%)	2 (4.9%)	0	0
Lugar 4b	76	3 (3.9%)	3 (3.9%)	0	0
Lugar 4c	83	1 (1.2%)	1 (1.2%)	1 (1.2%)	0
Lugar 4d	121	28 (23.1)	11 (9.1%)	4 (3.3%)	1 (0.8%)
Subtotal: Lugar 4, Europa	321	34 (10.6%)	17 (5.3%)	5 (1.6%)	1 (0.3%)
Lugar 5, Europa	75	12 (16%)	7 (9.3%)	4 (5.3%)	0
Lugar 6, Europa	216	52 (24.1%)	35 (16.2%)	22 (10.2%)	6 (2.8%)
Lugar 7 (Tailandia)	351	5 (1.4%)	3 (0.8%)	1 (0.3%)	0
Total global	1836	117 (6.4%)	70 (3.8%)	38 (2.1%)	8 (0.4%)

Figura 2A

Muestra	Cebador VIH: AGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAA	Frecuencia del desemparejamiento en la base de datos	Gravedad del desempareja- miento	Factor de infra- valoración del título: Prueba 1 / Prueba 2	Subtipo
51189C..G.....C	5 en 9527	Elevada	742 a 2183	A
70827	...A.....T....G	1290 en 9527	Baja	40	B

Figura 2B

Muestra	Cebador VIH: GGTACTAGTAGTTCCTGCTATGTCACTTCC	Frecuencia del desemparejamiento en la base de datos	Gravedad del desempareja- miento	Factor de infra- valoración del título: Prueba 1 / Prueba 2	Subtipo
77354	.K.....A.	23 en 9167	Elevada	>600	C
605051262G.....G.	18 en 9167	Media	116	AE
J1135C.	190 en 9167	Baja	60	AG

Figura 3

Muestra	Prueba 1	Título log10 prueba 2 (GAG)	Título log10 prueba 2 modificada (GAG+LTR)	Título log10 prueba 2 (GAG) - prueba 1	Título log10 prueba 2 modificada (GAG+LTR) - prueba 1	Título log10 prueba 2 modificada (GAG+LTR) - prueba 2 (GAG)
2B01	4.3	3.2	4.1	-1.1	-0.2	0.9
2B02	3.9	2.9	3.9	-1.0	0.0	1.0
2B04	3.8	3.2	3.9	-0.6	0.1	0.7
2B05	4.4	1.9	4.8	-2.5	0.4	2.9
2B07	4.1	3.3	4.1	-0.7	0.0	0.7
2B09	3.7	<1,6	3.5	>-2.1	-0.1	> 1.9
2B10	4.3	3.1	4.2	-1.2	-0.1	1.1
2B12	4.2	3.0	4.1	-1.3	-0.1	1.1
2B13	3.0	<1,6	4.6	>-1.4	1.6	> 3.0
2B14	4.3	3.2	3.9	-1.0	-0.4	0.7
2B15	4.2	3.5	4.3	-0.7	0.1	0.8
2B17	3.8	2.4	3.4	-1.3	-0.4	1.0
2B18	5.3	3.2	5.0	-2.1	-0.3	1.9
2B20	4.9	3.7	4.7	-1.2	-0.2	1.0
2B21	< 2.6	2.7	3.3	> 0.1	> 0.7	0.6
2B22	3.0	2.3	3.1	-0.7	0.1	0.8

Figura 4

	Prueba 1 (GAG)	Prueba 2a (LTR)	Prueba 2 modificada (LTR + GAG)
LOD [cp/ml] (mediante análisis PROBIT con tasa de éxito del 95%)	63	38	23
Intervalo de confianza del 95% [cp/ml]	38-161	25-82	17-39