

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 426**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2005 E 05748001 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.10.2014 EP 1745155**

54 Título: **Detección combinada de agentes biológicos**

30 Prioridad:

07.05.2004 US 569209 P

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

23.01.2015

73 Titular/es:

**CEPHEID (100.0%)
904 CARIBBEAN DRIVE
SUNNYVALE, CA 94089, US**

72 Inventor/es:

MCMILLAN, WILLIAM A.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 527 426 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 combinada de agentes biológicos

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La invención se refiere a métodos, y sistemas para la detección de una pluralidad de agentes biológicos en una muestra utilizando una cantidad mínima de recipientes, útiles para ensayos de diagnóstico y búsqueda de agentes de enfermedad.

Descripción de la técnica relacionada

15 Los ensayos de diagnóstico que detectan de forma sensible, específica y rápidamente agentes biológicos, por ejemplo, patógenos, en muestras están llegando a ser cada vez más importantes tanto para el control de bioagentes de enfermedad como de diagnóstico. Están disponibles pocos ensayos para detectar de forma precisa organismos fisiológica y clínicamente relevantes en una escala de tiempo apropiada para una detección temprana de la presencia de un agente infeccioso o dañino de otro modo. Hasta la fecha, los métodos de detección más sensibles implican PCR. La determinación de la presencia o ausencia de una pluralidad de agentes biológicos en una única muestra puede realizarse usando métodos de detección combinada. La PCR en tiempo real combinada es un método que puede usarse para este tipo de ensayo de diagnóstico.

25 Los ensayos basados en PCR pueden estar limitados por la complejidad de optimización de las reacciones de PCR para ensayar múltiples agentes en una cantidad rentable de tubos de reacción. Como norma general, la cantidad de sondas necesarias para apoyar un resultado de confirmación altamente específico varía de dos a tanto como seis secuencias. Un especialista en la técnica sabrá que optimizar una reacción de PCR con muchos pares de cebadores diferentes y sondas puede ser una tarea formidable que llega a ser cada vez más inimaginable según aumenta la cantidad de agentes a detectar.

30 Los ensayos basados en PCR también pueden estar limitados por la cantidad de marcadores químicos únicos disponibles para análisis de resultados. Por ejemplo, los ensayos de PCR en tiempo real generalmente emplean marcadores fluorescentes. Cuando se realiza PCR en tiempo real combinada, la cantidad de marcadores que puede usarse en una única reacción está limitada por la cantidad de canales de color fluorescente disponibles en el sistema de detección óptica usado.

35 El documento US 2003/124545 A1 (ROTHMAN RICHARD ERIC [US] ET AL) describe un método para detectar al menos dos agentes biológicos, comprendiendo cada agente al menos dos marcadores. El método comprende preparar una única mezcla a partir de una muestra que se sospecha que contiene dichos agentes, detectar la presencia de uno de los marcadores a partir de cada agente (las regiones de unión del cebador de PCR) y detectar la presencia del otro marcador a partir de cada agente (las regiones de unión a la sonda), de modo que la presencia de ambos marcadores indique la presencia de un agente dado.

45 El documento EP-A-1 288 308 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]) propone una solución diferente al problema de detección homogénea de múltiples productos en una muestra usando más sondas que marcadores diferentes. Algunos productos se detectan por una única sonda marcada, mientras que otros se detectan por una sonda mixta en que alguna cantidad de la sonda está acoplada a un marcador, y el resto está acoplado a un marcador diferente. Los productos se distinguen por la proporción entre las diferentes señales. Se usa en ensayos TaqMan para detectar productos de PCR de 6 virus en un único tubo.

50 Un enfoque atractivo para superar estas y otras limitaciones de los actuales ensayos combinados se proporciona por la presente invención.

Sumario de la invención

55 En este documento se describen métodos para la detección combinada eficaz, rentable y específica de múltiples agentes biológicos en una muestra, por ejemplo, detección combinada de agentes biológicos; por ejemplo, bacterias, virus, toxinas biológicas, y similares. El método utiliza dos marcadores para cada agente; la presencia o ausencia de cada uno de los dos marcadores por agentes se determina en recipientes separados. Cada recipiente se usa para detectar un único marcador para múltiples agentes. Si no se detectan marcadores para ningún agente en el primer recipiente, no tiene que utilizarse el segundo recipiente, ahorrando tiempo y dinero significativos. En una realización preferida, se usa PCR en tiempo real fluorescente combinada para determinar la presencia o ausencia de hasta nueve agentes biológicos diferentes en una muestra usando solamente dos series de reacciones. También se describen kits y sistemas que emplean el método.

65 De acuerdo con un aspecto, la invención proporciona

un método para detectar al menos un primer y segundo agente biológico, comprendiendo el primer agente un primer y segundo marcador, y comprendiendo el segundo agente un tercer y cuarto marcador, comprendiendo el método:

5 (a) preparar una primera y segunda mezcla a partir de al menos una y la misma muestra que se sospecha que contiene los agentes:

(b) detectar la presencia o ausencia del primer y tercer marcador en la primera mezcla en un primer recipiente; y

10 (c) detectar la presencia o ausencia del segundo y cuarto marcador en la segunda mezcla en un segundo recipiente;

mediante lo cual la presencia del primer y segundo marcador indica la presencia del primer agente biológico en la muestra, y la presencia del tercer y cuarto marcador indica la presencia del segundo agente biológico en la muestra, donde:

15 la primera mezcla comprende una primera sonda que reconoce específicamente el primer marcador y una tercera sonda que reconoce específicamente el tercer marcador;

20 la segunda mezcla comprende una segunda sonda que reconoce específicamente el segundo marcador y una cuarta sonda que reconoce específicamente el cuarto marcador;

cada una de las sondas tiene un marcador detectable, el marcador detectable de la primera sonda es igual que el marcador detectable de la segunda sonda, y el marcador detectable de la tercera sonda es diferente del marcador detectable de la cuarta sonda;

25 la etapa de detección (b) comprende determinar la presencia o ausencia de la primera y tercera sonda que se unen al primer y el tercer marcador en la primera mezcla;

30 la etapa de detección (c) comprende determinar la presencia o ausencia de la segunda y cuarta sonda que se unen al segundo y cuarto marcador en la segunda mezcla.

Los agentes biológicos que pueden identificarse usando el método de la invención incluyen células bacterianas, partículas víricas y toxinas biológicas. Los marcadores que pueden detectarse incluyen ácidos nucleicos, proteínas y polisacáridos. Los marcadores pueden detectarse en mezclas que incluyen, por ejemplo, soluciones, suspensiones, emulsiones o polvos.

35 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona un método para detectar de forma óptica la presencia o ausencia de varios agentes biológicos mayor que la cantidad de canales de color usados para detectar la presencia o ausencia de los agentes. Cada uno de los agentes biológicos tiene una primera y segunda secuencia de ácido nucleico respectivas que diferencian el agente biológico de los otros agentes biológicos. El método
40 comprende la etapa de formar la primera y segunda mezcla en el primer y segundo recipiente, respectivamente, a partir de al menos una muestra que se sospecha que contiene los agentes. La primera mezcla contiene, para cada uno de los agentes biológicos, un conjunto de primera sonda respectivo para marcar la primera secuencia de ácido nucleico del agente biológico. La segunda mezcla contiene, para cada uno de los agentes biológicos, un conjunto de segunda sonda respectiva para marcar la segunda secuencia de ácido nucleico del agente biológico. Al menos dos
45 de los conjuntos de primera sonda en la primera mezcla tienen los mismos intervalos de longitud de onda de emisión a detectar en el mismo canal de color, y al menos dos correspondientes conjuntos de segunda sonda en la segunda mezcla tienen diferentes intervalos de longitud de onda de emisión a detectar en diferentes canales de color. El método comprende adicionalmente las etapas de leer de forma óptica la presencia o ausencia de señales de sonda a partir de los al menos dos de los conjuntos de primera sonda en la primera mezcla que tienen los mismos intervalos de longitud de onda de emisión; leer de forma óptica la presencia o ausencia de señales de sonda de los
50 al menos dos correspondientes conjuntos de segunda sonda en la segunda mezcla que tienen diferentes intervalos de longitud de onda de emisión; y determinar a partir de la combinación de señales de sonda recibidas de cada una de las mezclas la presencia o ausencia de los agentes biológicos.

55 De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona un método para detectar al menos un primer y segundo agente biológico, comprendiendo el primer agente un primer y segundo marcador, y comprendiendo el segundo agente un tercer y cuarto marcador. El método comprende las etapas de preparar una primera mezcla en un primer recipiente a partir de al menos una muestra que se sospecha que contiene los agentes y detectar la presencia o ausencia del primer y tercer marcador en el primer recipiente. Si cualquiera del primer o tercer marcador está
60 presente en el primer recipiente, entonces se prepara una segunda mezcla en un segundo recipiente a partir de la al menos una muestra y se detecta la presencia o ausencia del segundo y cuarto marcador en el segundo recipiente. La presencia del primer y segundo marcador indica la presencia del primer agente biológico en la muestra, y la presencia del tercer y cuarto marcador indica la presencia del segundo agente biológico en la muestra.

65 De acuerdo con otro aspecto, la descripción proporciona un kit para detectar al menos un primer y segundo agente biológico, comprendiendo el primer agente un primer y segundo marcador, y comprendiendo el segundo agente un

tercer y cuarto marcador. El kit comprende al menos un primer y segundo recipiente. El primer recipiente aloja una primera sonda que reconoce específicamente el primer marcador y una segunda sonda que reconoce específicamente el tercer marcador. El segundo recipiente aloja una tercera sonda que reconoce específicamente el segundo marcador y una cuarta sonda que reconoce específicamente el cuarto marcador. En algunas realizaciones, cada una de las sondas tiene un marcador detectable, el marcador detectable de la primera sonda es igual que el marcador detectable de la tercera sonda, y el marcador detectable de la segunda sonda es diferente del marcador detectable de la cuarta sonda. En algunas realizaciones, cada una de las sondas tiene un marcador fluorescente, los marcadores fluorescentes de la primera y segunda sonda tienen longitudes de onda de emisión máximas respectivas en 100 nm entre sí, y la tercera y cuarta sonda tienen longitudes de onda de emisión máximas respectivas que difieren en más de 100 nm. En otras realizaciones, al menos la primera sonda es una sonda de ácido nucleico, y al menos la cuarta sonda es un anticuerpo. En algunas realizaciones, el primero, segundo, tercer y cuarto marcador comprenden una primera, segunda, tercera y cuarta secuencia de ácido nucleico, respectivamente, y las sondas comprenden sondas de hibridación para el marcaje de secuencias de ácido nucleico. En algunas realizaciones, el primer recipiente contiene adicionalmente reactivos de amplificación que incluyen cebadores para amplificar la primera y tercera secuencia de ácido nucleico, y el segundo recipiente contiene adicionalmente reactivos de amplificación que incluyen cebadores para amplificar la segunda y cuarta secuencia de ácido nucleico.

De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona un sistema para detectar al menos un primer y segundo agente biológico a partir de al menos una y la misma muestra, donde el primer agente comprende un primer y segundo marcador, y el segundo agente comprende un tercer y cuarto marcador, comprendiendo el sistema:

(a) al menos un primer y segundo recipiente, alojando el primer recipiente reactivos para detectar el primer y tercer marcador y alojando el segundo recipiente reactivos para detectar el segundo y cuarto marcador, comprendiendo dichos primeros reactivos una primera sonda que reconoce específicamente el primer marcador y una tercera sonda que reconoce específicamente el tercer marcador, comprendiendo dichos segundos reactivos una segunda sonda que reconoce específicamente el segundo marcador y una cuarta sonda que reconoce específicamente el cuarto marcador, donde cada una de las sondas tiene un marcador detectable, siendo el marcador detectable de la primera sonda igual que el marcador detectable de la segunda sonda, y siendo el marcador detectable de la tercera sonda diferente del marcador detectable de la cuarta sonda;

(b) al menos un detector dispuesto para detectar la presencia o ausencia de los marcadores en los recipientes;

(c) al menos un controlador en comunicación con el al menos un detector, estando programado el controlador con instrucciones legibles por ordenador para realizar una serie de operaciones que comprenden:

(i) iniciar una reacción de detección en el primer recipiente;

(ii) recibir datos del detector; y

(iii) determinar a partir de los datos la presencia o ausencia del primer y tercer marcador en el primer recipiente; donde si está presente el primer o tercer marcador en el primer recipiente, el controlador realiza una segunda serie de operaciones que comprenden:

(iv) iniciar una segunda reacción de detección en el segundo recipiente;

(v) recibir datos adicionales del detector; y

(vi) determinar a partir de los datos adicionales la presencia o ausencia del segundo o cuarto marcador en el segundo recipiente;

mediante lo cual la presencia del primer y segundo marcador indica la presencia del primer agente biológico en una muestra, y la presencia del tercer y cuarto marcador indica la presencia del segundo agente biológico en la muestra, y donde el sistema es para detectar una cantidad mayor de marcadores biológicos que la cantidad de dichos diferentes marcadores detectables.

La presencia del primer y segundo marcador indica la presencia del primer agente biológico en una muestra, y la presencia del tercer y cuarto marcador indica la presencia del segundo agente biológico en la muestra. En algunas realizaciones, el primer, segundo, tercer y cuarto marcador comprenden una primera, segunda, tercera y cuarta secuencias de ácido nucleico, y el primer y segundo recipiente comprenden cartuchos para extraer ácido nucleico de una muestra y para alojar el ácido nucleico para detección.

De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona un sistema automatizado para determinar la presencia o ausencia de una pluralidad de agentes, comprendiendo cada uno de los agentes una primera y segunda secuencia de ácido nucleico respectivas que diferencian el agente de los otros agentes. El sistema automatizado comprende al menos un sistema de control de la temperatura para someter a la primera y segunda mezcla de reacción que se

sospecha que contienen los agentes a condiciones de amplificación de ácido nucleico. La primera mezcla de reacción contiene reactivos y sondas para amplificar y detectar la primera secuencia de ácido nucleico de cada uno de los agentes, y la segunda mezcla de reacción contiene reactivos y sondas para amplificar y detectar la segunda secuencia de ácido nucleico de cada uno de los agentes. Está dispuesto al menos un mecanismo de detección para detectar señales de sonda de las mezclas de reacción. El sistema automatizado comprende adicionalmente al menos un controlador (por ejemplo, ordenador o microprocesador) en comunicación con el al menos un sistema de control de la temperatura y con el al menos un mecanismo de detección. El controlador está programado para realizar las etapas de enviar señales de control al sistema de control de la temperatura para someter la primera mezcla de reacción a condiciones de amplificación de ácido nucleico, y determinar a partir de las señales de sonda recibidas de la primera mezcla de reacción si la primera secuencia de ácido nucleico de cualquiera de los agentes está presente en la primera mezcla de reacción. Si está presente la primera secuencia de ácido nucleico de cualquiera de los agentes en la primera mezcla de reacción, entonces el controlador envía señales de control al sistema de control de la temperatura para someter a la segunda mezcla de reacción a condiciones de amplificación de ácido nucleico. El controlador está adicionalmente programado para determinar a partir de señales de sonda recibidas de la segunda mezcla de reacción si la segunda secuencia de ácido nucleico de cualquiera de los agentes está presente en la segunda mezcla de reacción. La presencia de la primera y la segunda secuencia de ácido nucleico de cualquiera de los agentes son indicativas de la presencia de ese agente.

Breve descripción de las varias vistas de los dibujos

La Fig. 1 muestra un diagrama de bloques esquemático de un sistema para detectar al menos un primer y segundo agente biológico de acuerdo con una realización de la invención.

La Fig. 2 es un diagrama de flujo que muestra las etapas del programa ejecutadas por el controlador del sistema de la Fig. 1.

La Fig. 3 muestra un diagrama de bloques esquemático de un sistema para detectar al menos un primer y segundo agente biológico de acuerdo otra realización de la invención.

La Fig. 4 es un diagrama de flujo que muestra las etapas del programa ejecutadas por el controlador del sistema de la Fig. 3.

Descripción detallada de la invención

En resumen, y como se describe en mayor detalle a continuación, en este documento se describen métodos, kits, y sistemas para la detección combinada eficaz, rentable y específica de múltiples agentes, por ejemplo, métodos para detección por PCR en tiempo real altamente combinada de agentes biológicos, por ejemplos, bacterias, virus, toxinas biológicas, y similares.

Deben apreciarse varias características del actual enfoque. El método usa tan pocos como dos marcadores para cada agente biológico, por ejemplo, se usan dos sondas para detectar dos secuencias génicas (marcadores) para cada cepa bacteriana. La presencia o ausencia de cada uno de los dos marcadores por agentes se determina en recipientes diferentes, por ejemplo, la detección de las dos diferentes secuencias génicas se realiza en diferentes reacciones de PCR en tiempo real. Cada recipiente se usa para detectar un único marcador para múltiples agentes; a causa de la característica binaria del análisis, por ejemplo, dos diferentes sondas en dos diferentes recipientes (reacciones), múltiples sondas en el mismo recipiente pueden comprender el mismo marcador. Si no se detectan marcadores para ningún agente en el primer recipiente, no tiene que utilizarse el segundo recipiente.

Las ventajas de este enfoque son numerosas. El método supera las dificultades y complejidades de optimizar una reacción de detección con múltiples sondas para un único agente, por ejemplo, optimización de una reacción de PCR con múltiples sondas dirigidas a un único ácido nucleico bacteriano. Esto es el resultado de usar un método que separa las dos sondas para cada agente en dos recipientes diferentes, por ejemplo, dos reacciones diferentes.

Además, el método supera la limitación de la cantidad de agentes que pueden detectarse en un único recipiente impuesto por una cantidad definida de marcadores que pueden detectarse en un único recipiente. Por ejemplo, la PCR en tiempo real que usa un sistema de detección fluorescente convencional incluye cuatro canales fluorescentes diferentes. Esto generalmente conduce a un aumento en la cantidad de recipientes que debe usarse cuando se hace reacciones combinadas. Como el método de la invención separa las dos sondas para cada agente en recipientes diferentes, cada marcador, que se detecta puede usarse con múltiples sondas, proporcionando un análisis de los resultados de ambos recipientes la identificación (presente o no) del agente. El método también es rentable cuando se afronta una cantidad limitada de opciones de detección por recipiente, por ejemplo, una cantidad limitada de canales fluorescentes.

La invención es útil para la detección específica, eficaz, rentable de múltiples agentes en una muestra. Los métodos pueden emplearse en ensayos de diagnóstico que detectan de forma sensible, específica y rápida agentes en muestras. Los tipos de agentes que pueden detectarse incluyen, por ejemplo, bacterias, virus, y toxinas. Por ejemplo, los métodos de la invención son útiles en ensayos de diagnóstico para patógenos de enfermedad.

Definiciones

Los términos usados en las reivindicaciones y en la memoria descriptiva se describen expuestos a continuación salvo que se especifiquen de otro modo. Debe apreciarse que, como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "uno", "una" y "el", "la" incluyen referentes plurales salvo que el contexto indique claramente otra cosa.

Las abreviaturas usadas en esta solicitud incluyen las siguientes:

"PCR" se refiere a reacción en cadena de la polimerasa.

"Agente biológico" se refiere a cualquier material biológico que tiene que identificarse, e incluye, por ejemplo, células, virus, proteínas de origen natural, glucoproteínas, azúcares complejos y simples, ácidos nucleicos, lípidos y lipoproteínas. "Agente biológico" también se refiere a toxinas, particularmente toxinas basadas en ácido nucleico y proteína, tanto de naturales como sintéticas.

"Canal de color" se refiere a un intervalo de longitud de onda de detección.

"Marcador detectable" se refiere a cualquier composición que sea capaz de producir, directa o indirectamente, una señal detectable por medios espectroscópicos, radioisotópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inorgánicos, eléctricos, ópticos o químicos. Ejemplos incluyen, aunque sin limitación, marcadores isotópicos, marcadores inmunes, y colorantes coloreados o fluorescentes.

"Detección" se refiere a determinar la presencia o ausencia de un marcador en una muestra. La detección también se refiere a determinar la presencia o ausencia de un agente biológico en una muestra, basándose en el análisis de marcadores de detección.

"Máximo de emisión" se refiere a la longitud de onda en la cual un marcador fluorescente previamente excitado libera posteriormente la mayor energía, en forma de luz.

"Máximo de absorbancia" se refiere a la longitud de onda a la cual un marcador fluorescente absorbe la cantidad máxima de energía en forma de fotones.

"Marcador" se refiere a una característica macromolecular, microscópica o molecular de un agente biológico que identifica de forma distintiva al agente biológico.

Métodos de la invención

La invención proporciona métodos en los que se determina la identificación de múltiples agentes biológicos, por ejemplo, se determina la presencia o ausencia, de un modo combinado. El método supera dificultades de optimización de la detección de múltiples marcadores para un único agente biológico. El método también está diseñado de un modo rentable para utilizar una cantidad mínima de recipientes. Cada recipiente comprende medios para detectar múltiples marcadores para múltiples agentes; sin embargo, cada recipiente comprende medios para detectar solamente un solo marcador único para cada agente. El análisis de los resultados de un único recipiente (si los resultados son completamente negativos) o todos los recipientes proporciona el resultado deseado de identificación (presencia o ausencia) de los múltiples agentes biológicos. En general, los marcadores se detectan usando una sonda, por ejemplo, un oligonucleótido que hibrida con una secuencia génica amplificada. La sonda se marca para detección, por ejemplo, se marca de forma fluorescente.

La cantidad máxima de agentes biológicos, X, que puede detectarse en la muestra usando los métodos de la invención está limitada solamente por la cantidad de diferentes marcadores de sonda, PL, que pueden detectarse de forma diferencial en un único recipiente, la cantidad de recipientes a usar (N) y la cantidad de controles internos (IC). La cantidad máxima de agentes biológicos que puede identificarse, X, usando dos recipientes se define por lo siguiente: $X=(PL-IC)^N$.

Por ejemplo, en una realización, los métodos de la invención pueden realizarse usando PCR en tiempo real para la detección de secuencias génicas (marcadores) para determinar la presencia o ausencia de células bacterianas específicas (agentes biológicos) en una muestra. En una realización, se realiza PCR en tiempo real usando el sistema Cepheid I-CORE®. Este sistema utiliza cuatro canales ópticos de color (PL=4). En una realización, se usa un único control interno en cada recipiente (IC=1). Usando este sistema, puede identificarse un máximo de 9 diferentes agentes biológicos en una muestra usando solamente dos recipientes. En otra realización, se usan dos controles internos (IC=2) en cada recipiente, y puede identificarse un máximo de 4 diferentes agentes biológicos usando dos recipientes.

Según aumenta la cantidad de marcadores de sonda que puede detectarse de forma diferencial, la cantidad de agentes que pueden identificarse aumenta sin aumentar la cantidad de recipientes usados. La siguiente tabla ilustra

la cantidad máxima de agentes que pueden identificarse usando los métodos de la invención basándose en la cantidad de PL e IC y 2 recipientes.

4 marcadores de sonda		5 marcadores de sonda		6 marcadores de sonda	
nº IC	nº agentes	nº IC	nº agentes	nº IC	nº agentes
1	9	1	16	1	25
2	4	2	9	2	16
		3	4	3	9
				4	4

5 Es ilustrativo de la mejora de la invención sobre la técnica previa lo siguiente. Un método de detección que usa cuatro marcadores detectables posibilita la detección de cuatro marcadores diferentes en una única reacción. En el caso en que tiene que medirse más de un marcador por agente y reservando al menos un marcador detectable para un control interno (IC), pueden detectarse menos de cuatro agentes; por ejemplo, como mucho un agente, en una única reacción. Además, surgen dificultades cuando se intenta detectar múltiples marcadores para un único agente biológico en una única reacción. Sin embargo, usando el método de la invención, es posible identificar más de 4
10 agentes, incluso cuando se requiere más de un marcador para su identificación precisa. De hecho, pueden detectarse muchos agentes dependiendo del modo en que muchas sondas comparten un marcador detectable.

15 En una realización, la cantidad de agentes que pueden detectarse con dos recipientes se expande marcando más de una sonda en un único recipiente con el mismo marcador detectable y compensando las asignaciones del marcador detectable entre los dos recipientes. El análisis del resultado de dos recipientes proporciona la identificación del agente biológico presente en la muestra.

20 En otra realización de la invención, el análisis de los dos recipientes se realiza secuencialmente. Si no se detectan marcadores en el primer recipiente, lo que indica que no hay agentes presentes en la muestra, el segundo recipiente no se utiliza.

25 Los siguientes modelos del método de la invención ilustran más claramente el método de la invención. Los modelos incluyen la cantidad de agentes a identificar, el sistema para marcar las sondas, y los resultados esperados. Aunque los modelos se presentan con la realización de marcadores de secuencia génica detectados usando PCR en tiempo real fluorescente, un especialista en la técnica apreciará claramente que pueden usarse otros marcadores, sondas, y métodos de detección en el mismo método.

Modelo para identificación de 3 agentes usando 4 marcadores detectables

30 En esta realización, el método se usa para seleccionar investigar e identificar tres agentes, por ejemplo, organismos. Cada organismo puede identificarse mediante dos marcadores, por ejemplo, secuencias génicas. Los marcadores se detectan por sondas que tienen un marcador detectable, por ejemplo, sondas marcadas fluorescentemente. La presencia o ausencia de una secuencia génica en una muestra se realiza usando PCR en tiempo real y un sistema Cepheid I-CORE de cuatro canales. Se usan dos recipientes, por ejemplo, cartuchos. Se detecta un control interno en ambos cartuchos. Las asignaciones de sonda para los agentes son: Agente 1 = Sondas A, B; Agente 2 = Sondas C, D; Agente 3 = Sondas E, F; Control = Sonda G.
35

40 Las asignaciones de marcador detectable y la adjudicación de las sondas entre los dos cartuchos se muestran en la siguiente tabla.

	Asignaciones de marcador detectable y adjudicación de cartucho para sondas							
	Cartucho A				Cartucho B			
	Marcador 1	Marcador 2	Marcador 3	Marcador 4	Marcador 1	Marcador 2	Marcador 3	Marcador 4
Agente 1	Sonda A				Sonda B			
Agente 2		Sonda C				Sonda D		
Agente 3			Sonda E				Sonda F	
control				Sonda G				Sonda G

45 La siguiente tabla de reclamo a continuación muestra el modo en que el agente se identificaría basándose en los resultados de los dos cartuchos.

	Marcador detectado	
	Cartucho A	Cartucho B
Agente 1	1	1
Agente 2	2	2
Agente 3	3	3

Modelo para identificación de 4 agentes usando 4 canales de color

En otra realización, el método de la invención puede detectar 4 agentes, usando 2 marcadores por agente, y 1 control. En esta realización, sondas individuales para cada uno de los dos agentes se marcan de forma idéntica y se detectan en un cartucho, y las segundas sondas para cada uno de los dos agentes se marcan de forma diferencial y se detectan en el segundo cartucho. En esta realización, el método se usa para identificar cuatro agentes, por ejemplo, organismos. Cada organismo puede identificarse por dos marcadores, por ejemplo, secuencias génicas. Los marcadores se detectan mediante sondas marcadas fluorescentemente. La detección de una secuencia génica en una muestra se realiza usando PCR en tiempo real y un sistema Cepheid I-CORE de cuatro canales. Se usan dos cartuchos, por ejemplo, recipientes. Se detecta un control interno en ambos cartuchos. Las asignaciones de sonda para los agentes son: Agente 1 = Sonda A, B; Agente 2 = Sonda C, D; Agente 3 = Sonda E, F; Agente 4 = Sondas G y H, Control = Sonda J.

Las asignaciones de marcador detectable y la adjudicación de las sondas entre los dos cartuchos se muestran en la siguiente tabla.

		Asignaciones de marcador detectable y adjudicación de cartucho para sondas								
		Cartucho A				Cartucho B				
		Marcador 1	Marcador 2	Marcador 3	Marcador 4	Marcador 1	Marcador 2	Marcador 3	Marcador 4	
Agente 1	A					B				
Agente 2	C						D			
Agente 3		E					F			
Agente 4			G					H		
control		J				J				

La siguiente tabla de reclamo muestra el modo en que el agente se identificaría basándose en los resultados de los dos cartuchos.

Marcador detectado		
	Cartucho A	Cartucho B
Agente 1	1	1
Agente 2	1	2
Agente 3	2	2
Agente 4	3	3

Modelo para identificación de 5 agentes usando 4 canales de color

En otra realización, el método de la invención puede detectar 5 agentes, usando 2 marcadores por agente, y 1 control. En esta realización, sondas individuales para cada uno de los dos agentes se marcan de forma idéntica y se detectan en un cartucho, y la segunda sonda se marca con un marcador diferente. En este caso, las asignaciones de sonda para los agentes son: Agente 1 = Sondas A, B; Agente 2 = Sondas C, D; Agente 3 = Sondas E, F; Agente 4 = Sondas G, H; Agente 5 = Sondas I, J; Control = Sonda K.

Las asignaciones de marcador detectable y la adjudicación de las sondas entre los dos cartuchos se muestran en la siguiente tabla.

		Asignaciones de marcador detectable y adjudicación de cartucho para sondas								
		Cartucho A				Cartucho B				
		Marcador 1	Marcador 2	Marcador 3	Marcador 4	Marcador 1	Marcador 2	Marcador 3	Marcador 4	
Agente 1	A					B				
Agente 2	C						D			
Agente 3		E					F			
Agente 4		G						H		
Agente 5			I			J				
control		K				K				

La siguiente tabla de reclamo muestra los resultados esperados.

Marcador detectado		
	Cartucho A	Cartucho B
Agente 1	1	1
Agente 2	1	2
Agente 3	2	2
Agente 4	2	3

Agente 5	3	1
----------	---	---

Modelo para identificación de 8 agentes usando 6 canales de color

5 En otra realización, la invención se usa para un ensayo que utiliza un sistema que emplea 6 canales de color. En esta realización, se identifican 8 agentes usando 2 secuencias por agente, y empleando 2 controles internos.

10 En esta realización, sondas individuales para cada uno de los dos agentes se marcan de forma idéntica y se detectan en un cartucho. Las segundas sondas para cada uno de los dos agentes se marcan de forma diferencial. En este caso, las asignaciones de sonda para los agentes son: Agente 1 = A, B, Agente 2 = C, D, Agente 3 = E, F, Agente 4 = G, H, Agente 5 = I, J, Agente 6 = K, L, Agente 7 = M, N, Agente 8 = O, P, IC1= Q, IC2= R.

Las asignaciones de marcador detectable y la adjudicación de las sondas entre los dos cartuchos se muestran en las siguientes 2 tablas.

		Asignaciones de marcador detectable y adjudicación de cartucho para sondas					
		Cartucho A					
Marcador		1	2	3	4	5	6
Agente 1	A						
Agente 2	C						
Agente 3			E				
Agente 4			G				
Agente 5				I			
Agente 6				K			
Agente 7					M		
Agente 8					O		
IC1						Q	
IC2							R

15

		Asignaciones de marcador detectable y adjudicación de cartucho para sondas					
		Cartucho B					
Marcador		1	2	3	4	5	6
Agente 1	B						
Agente 2			D				
Agente 3			F				
Agente 4				H			
Agente 5				J			
Agente 6					L		
Agente 7					N		
Agente 8	P						
IC1						Q	
IC2							R

La siguiente tabla de reclamo ilustra los resultados esperados:

	Marcadores detectados	
	Cartucho A	Cartucho B
Agente 1	1	1
Agente 2	1	2
Agente 3	2	2
Agente 4	2	3
Agente 5	3	3
Agente 6	3	4
Agente 7	4	4
Agente 8	4	1
IC1	5	5
IC2	6	6

20 **Modelo para identificación de 9 agentes usando 4 canales de color**

25 En otra realización, se marcan más de 2 sondas con el mismo marcador detectable. La cantidad de sondas que pueden marcarse con el mismo marcador detectable es igual a la cantidad de marcador detectable que puede detectarse de forma diferencial, menos aquellos asignados a los controles. Aprovechando estas combinaciones adicionales es posible determinar muchos más agentes que marcadores detectables disponibles.

En una realización se detectan 9 agentes usando 2 marcadores por agente, y 1 control interno. Están disponibles tres marcadores detectables para la detección de agentes, y 3 sondas, cada una para un agente diferente, tienen el mismo marcador detectable. En esta realización, las asignaciones de sonda para los agentes son: Agente 1 = sondas A, B, Agente 2 = sondas C, D, Agente 3 = sondas E, F, Agente 4 = sondas G, H, Agente 5 = sondas I, J, Agente 6 = sondas K, L, Agente 7 = sondas M, N, Agente 8 = sondas O, P, Agente 9 = sondas U, V, e IC 1 = sonda Q.

Las asignaciones de marcador detectable y la adjudicación de las sondas entre los dos cartuchos se muestran en la siguiente tabla.

	Asignaciones de marcador detectable y adjudicación de cartucho para sondas							
	Cartucho A				Cartucho B			
	Marcador 1	Marcador 2	Marcador 3	Marcador 4	Marcador 1	Marcador 2	Marcador 3	Marcador 4
Agente 1	A				B			
Agente 2	C					D		
Agente 3	E						F	
Agente 4		G			H			
Agente 5		I				J		
Agente 6		K					L	
Agente 7			M		N			
Agente 8			O			P		
Agente 9			U				V	
IC				Q				Q

La siguiente tabla de reclamo ilustra los resultados esperados.

	Marcadores detectados	
	Cartucho A	Cartucho B
Agente 1	1	1
Agente 2	1	2
Agente 3	1	3
Agente 4	2	1
Agente 5	2	2
Agente 6	2	3
Agente 7	3	1
Agente 8	3	2
Agente 9	3	3
IC1	4	4

15 **Métodos de detección**

Los métodos de la invención pueden usarse varios métodos de detección diferentes para detectar la presencia o ausencia de un marcador en una muestra. Un método de detección normalmente emplea al menos un reactivo analítico que se une a un marcador específico, por ejemplo, se une a una especie macromolecular diana y produce una señal detectable. Estos reactivos analíticos normalmente tienen dos componentes: (1) una macromolécula sonda, por ejemplo, un anticuerpo u oligonucleótido, que puede unirse a una macromolécula diana (por ejemplo, un anticuerpo o un gen marcador) con un elevado grado de especificidad y afinidad, y (2) un marcador detectable, tal como un radioisótopo o molécula de colorante fluorescente unida covalentemente. En general, las propiedades de unión de la macromolécula sonda definen la especificidad del método de detección, y la detectabilidad del marcador asociado determina la sensibilidad del método de detección. La sensibilidad de detección está a su vez relacionada tanto con el tipo de marcador empleado como la calidad y el tipo de equipo disponible para detectarlo.

En una realización de la invención, se usa PCR en tiempo real como método de detección. Como se describe en más detalle en este documento, un marcador, por ejemplo, una secuencia génica, se amplifica usando PCR en tiempo real y el producto se detecta usando una sonda marcada de forma fluorescente. En otra realización, se usa un inmunoensayo como método de detección. Con este método de detección, el marcador es, por ejemplo, un antígeno y la sonda es un anticuerpo marcado de forma fluorescente. Son bien conocidos diversos inmunoensayos para los especialistas en la técnica e incluyen, por ejemplo, ELISA, RIA, etc. Un especialista en la técnica apreciará fácilmente que los métodos de la invención pueden usarse con cualquiera de varias combinaciones de marcador/sonda/sistema de detección.

35 **Marcadores detectables**

Los marcadores detectables adecuados para su uso en la presente invención son compuestos que son capaces de producir, directa o indirectamente, una señal detectable. Ejemplos de los tipos de marcadores detectables que

pueden usarse con los métodos de la invención incluyen, por ejemplo, colorantes fluorescentes o coloreados, marcadores isotópicos, enzimas, marcadores inmunes (por ejemplo, anticuerpos o antígenos) y similares. Los marcadores pueden incorporarse en sondas que comprenden por ejemplo, ácidos nucleicos, proteínas o anticuerpos. El marcador puede proporcionar directa o indirectamente una señal detectable. Puede usarse cualquier método conocido en la técnica para conjugar el marcador detectable con una sonda u otro compuesto.

En una realización, se usan marcadores fluorescentes en los métodos de la invención. Los marcadores útiles en la presente invención pueden incluir, aunque sin limitación, por ejemplo, fluoresceína, Texas red (disponible en el mercado en Molecular Probes), LIZ (disponible en el mercado en ABI), FAM, dROX (disponible en el mercado en ABI), Alexa647 (disponible en el mercado en Molecular Probes). Otros compuestos fluorescentes o quimioluminescentes que pueden usarse son, por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, luciferina, y similares. En otra realización, los marcadores detectables son radiomarcadores, por ejemplo, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , o ^{32}P . Un especialista apreciará que el marcador detectable puede ser una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano rusticano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa y otras habitualmente usadas en, por ejemplo, ELISA); biotina para teñir con conjugado de estreptavidina marcado; perlas magnéticas, y marcadores calorimétricos tales como oro coloidal o perlas de vidrio o plástico coloreado (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.). Las patentes que muestran el uso de dichos marcadores incluyen las patentes de Estados Unidos Nº 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345. 4.277.437; 4.275.149; y 4.366.241.

Dispositivos de detección

Los medios para detectar sondas marcadas son bien conocidos para los especialistas en la técnica. Por tanto, por ejemplo, pueden detectarse marcadores fluorescentes usando un fotodetector para detectar la luz emitida, o pueden detectarse radiomarcadores usando película fotográfica o contadores de centelleo. Los marcadores enzimáticos se detectan normalmente proporcionando a la enzima un sustrato y detectando el producto de reacción producido por la acción de la enzima sobre el sustrato. Los marcadores calorimétricos se detectan visualizando el marcador coloreado.

En una realización, se usa detección óptica de PCR en tiempo real para la detección de marcadores. Se realiza la amplificación por PCR de un ácido nucleico marcador y se hace detección a tiempo real del producto amplificado usando una sonda marcada de forma fluorescente. Se conocen ensayos de "PCR en tiempo real" o "TaqMan" en la técnica. Como se sabe en la técnica, las sondas TaqMan contienen dos colorantes, un colorante indicador (por ejemplo, 6-FAM) en el extremo 5' y un colorante inactivador (por ejemplo, Black Hole Quencher o TAMRA) en el extremo 3'. Durante la reacción, la actividad nucleolítica 5' a 3' de la enzima polimerasa Taq escinde la sonda entre el indicador y el inactivador provocando de este modo fluorescencia aumentada del indicador. La acumulación de productos de PCR se detecta directamente controlando el aumento en la fluorescencia del colorante indicador. Las sondas de PCR adecuadas incluyen, aunque sin limitación: sondas TaqMan (Heid, C.A., et al., Genome Res. 1996 Oct; 6(10):986-94 que se incorpora en este documento por referencia), balizas moleculares por ejemplo, FAM fluorescente, TAMRA, TET, o ROX en combinación con un colorante inactivador tal como DABCYL, (véase, por ejemplo, Marras SAE, et al., (1999) Genet Anal 14, 151-156 que se incorpora en este documento por referencia) y más recientemente, Scorpions (DxS). Tanto las sondas TaqMan como las balizas moleculares permiten la detección de múltiples especies de ADN (combinación) mediante el uso de diferentes colorantes indicadores en diferentes sondas/balizas.

En otra realización, los métodos de la invención emplean el sistema Cepheid I-CORE. El sistema Cepheid I-CORE utiliza 4 canales ópticos diferentes capaces de detectar 4 colorantes indicadores fluorescentes simultáneamente. La tecnología I-CORE se describe en la patente de Estados Unidos 6.369.893, que se incorpora en este documento por referencia.

Kits de la invención

Otro aspecto de la invención incluye kits para detectar al menos dos agentes biológicos. Los kits de la invención incluyen al menos dos recipientes para el análisis de la muestra biológica. Cada recipiente tiene una sonda que puede detectar un marcador para cada agente biológico que tiene que detectarse; por lo tanto, cada recipiente tiene al menos dos sondas.

En una realización, el kit para detectar al menos dos agentes biológicos incluye dos recipientes. Cada recipiente tiene dos sondas, una sonda para detectar un primer marcador del primer agente biológico y una segunda sonda para detectar un primer marcador del segundo agente biológico.

En diversas realizaciones, los kits de la invención pueden usarse para detectar el intervalo de agentes biológicos como se describe en este documento, por ejemplo, células bacterianas, partículas víricas, toxinas biológicas, y similares. Los marcadores contemplados incluyen aquellos descritos en este documento, por ejemplo, ácidos nucleicos, proteínas, y polisacáridos. En una realización preferida, los marcadores son ácidos nucleicos, por ejemplo, secuencias génicas. Las sondas que pueden incluirse en el kit incluyen, por ejemplo, ácidos nucleicos y anticuerpos. Las sondas pueden marcarse usando cualquiera de varios marcadores detectables bien conocidos para

los especialistas en la técnica y descritos en detalle en este documento. En realizaciones preferidas, el marcador detectable es un marcador fluorescente.

Sistemas de la invención

La Fig. 1 muestra un diagrama de bloques esquemático de un sistema 10 para detectar al menos un primer y segundo agentes biológicos. El primer agente comprende un primer y segundo marcadores, y el segundo agente comprende un tercer y cuarto marcadores. El sistema incluye al menos un primer y segundo recipientes 12A y 12B. El primer recipiente 12A aloja reactivos para detectar el primer y tercer marcadores y el segundo recipiente 12B aloja reactivos para detectar el segundo y cuarto marcadores. Los recipientes adecuados incluyen, aunque sin limitación, vasos de reacción, tubos, cubetas, o cartuchos. En una realización particularmente preferida, el primer, segundo, tercer y cuarto marcadores comprenden una primera, segunda, tercera y cuarta secuencias de ácido nucleico, y el primer y segundo recipientes son cartuchos para extraer el ácido nucleico de una muestra y para alojar el ácido nucleico para detección. Dichos cartuchos se describen en la patente de Estados Unidos 6.374.684 y la patente de Estados Unidos 6.391.541 cuya descripción se incorpora por referencia en este documento.

El sistema 10 también incluye al menos un detector dispuesto para detectar a presencia o ausencia de los marcadores en los recipientes 12A y 12B. En una realización preferida, el sistema 20 incluye al menos un primer y segundo detectores 14A y 14B. El primer detector 14A está dispuesto para detectar la presencia o ausencia de los marcadores en el primer recipiente 12A, y el segundo detector 14B está dispuesto para detectar la presencia o ausencia de los marcadores en el segundo recipiente 12B. Aunque se prefieren múltiples detectores, es bien sabido que también podría usarse un único detector para detectar marcadores en múltiples recipientes colocando el detector individual en comunicación óptica con cada recipiente usando dispositivos ópticos tales como fibra óptica, guías de onda, tubos de luz, etc. Los detectores 14A y 14B son preferiblemente fluorímetros para detectar y medir marcadores fluorescentes en los recipientes 12A y 12B. Dichos dispositivos generalmente incluyen al menos una fuente de luz para excitar el marcador fluorescente y al menos un fotodetector para medir la fluorescencia emitida. Estos dispositivos son bien conocidos en la técnica y están ampliamente disponibles en el mercado, tal como los módulos I-CORE® de Cepheid citados anteriormente. Otros detectores adecuados incluyen, aunque sin limitación, dispositivos para detectar marcadores fosforescentes, quimioluminiscentes, o electroquimioluminiscentes.

El sistema 10 también incluye al menos un controlador 16 (por ejemplo, un ordenador o microprocesador) en comunicación con el al menos un detector. El controlador está programado con instrucciones legibles por ordenador para realizar una serie de operaciones, incluyendo el inicio de las reacciones de detección en los recipientes 12A y 12B. En una realización preferida, los marcadores que identifican los agentes son ácidos nucleicos, los reactivos alojados en el primer recipiente 12A son sondas de ácido nucleico que reconocen específicamente el primer y tercer marcadores, los reactivos alojados en el segundo recipiente 12B son sondas de ácido nucleico que reconocen específicamente el segundo y cuarto marcadores, y la reacción de detección comprende amplificación de ácido nucleico. Los métodos adecuados de amplificación de ácido nucleico incluyen reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y reacción en cadena de la ligasa (LCR). Son adecuadas reacciones de amplificación isotérmicas y pueden usarse de acuerdo con los métodos de la invención. Ejemplos de reacciones de amplificación isotérmicas incluyen amplificación por desplazamiento de hebra (SDA) (Walker, et al. *Nucleic Acids Res.* 20(7):1691-6 (1992); Walker *PCR Methods Appl* 3(1):1-6 (1993)), amplificación mediada por transcripción (Phyffer, et al., *J. Clin. Microbiol.* 34:834-841 (1996); Vuorinen, et al., *J. Clin. Microbiol.* 33:1856-1859 (1995)), amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA) (Compton, *Nature* 350(6313):91-2 (1991), amplificación por círculo rodante (RCA) (Lisby, *Mol. Biotechnol.* 12(1):75-99 (1999)); Hatch et al., *Genet. Anal.* 15(2):35-40 (1999)) y amplificación de señal de ADN ramificado (bDNA) (véase, por ejemplo, Iqbal et al., *Mol. Cell Probes* 13(4):315-320 (1999)). Otros métodos de amplificación conocidos para los especialistas en la técnica incluyen CPR (reacción de sonda de ciclado), SSR (replicación de secuencia auto-sostenida), SDA (amplificación por desplazamiento de hebra), QBR (replicasa Q-Beta), Re-AMP (antiguamente RAMP), RCR (reacción en cadena de reparación), TAS (sistema de amplificación basado en transcripción), y HCS.

El sistema 10 opcionalmente incluye al menos un controlador de temperatura. El controlador de temperatura es opcional porque no todas las reacciones de detección requieren control de la temperatura de la mezcla de reacción. Sin embargo, en realizaciones preferidas donde la reacción de detección es amplificación de ácido nucleico, el sistema 10 incluye al menos un controlador de temperatura, tal como los controladores de temperatura 18A y 18B para someter mezclas de reacción en los recipientes 12A y 12B a condiciones de amplificación de ácido nucleico. Aunque se prefieren múltiples controladores de temperatura, es bien sabido que también podría usarse un único controlador de temperatura (por ejemplo, un bloque de metal para alojar múltiples recipientes de muestra o un sistema de aire forzado para calentar/enfriar múltiples recipientes) para controlar la temperatura de mezclas de reacción en múltiples recipientes. En realizaciones particularmente preferidas donde la reacción de detección es PCR, el al menos un controlador de temperatura es un termociclador para calentar y enfriar las mezclas de reacción en los recipientes 12A y 12B de acuerdo con perfiles programados de tiempo/temperatura. Los termocicladores con detector o detectores incorporados que funcionan bajo el control del ordenador son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, el sistema Smart Cycler® de Cepheid (por ejemplo, patentes de Estados Unidos N° 6.369.893 y 6.565.815); termocicladores ABI (por ejemplo, patentes de Estados Unidos N° 5.656.493 y 5.038.852); y Lightcycler de Roche (por ejemplo, patentes de Estados Unidos N° 5.455.175 y 5.935.522).

La Fig. 2 es un diagrama de flujo que muestra las etapas que el controlador 16 está programado para ejecutar para detectar la presencia o ausencia de múltiples agentes biológicos. En la etapa 100, el controlador 16 inicia una reacción de detección en el primer recipiente 12A. En la etapa 102, el controlador 16 recibe datos del detector 14A. En la etapa de decisión 104, el controlador 16 determina a partir de los datos la presencia o ausencia del primer y tercer marcadores en el primer recipiente 12A. Esto se consigue preferiblemente comparando la señal de detección para cada marcador con un valor umbral mínimo. Si no está presente ninguno del primer o tercer marcadores en el primer recipiente, entonces el controlador registra un resultado negativo en la etapa 106 y no tiene que ejecutarse la reacción de detección en el segundo recipiente 12B. Si, sin embargo, se detecta el primer o tercer marcadores en el primer recipiente 12A, entonces el controlador 16 inicia una segunda reacción de detección en el segundo recipiente, etapa 108. En la etapa 110, el controlador 16 recibe datos de detección del detector 14B. En la etapa 112, el controlador determina a partir de los datos de detección la presencia o ausencia del segundo o cuarto marcadores en el segundo recipiente, y por tanto la presencia o ausencia del primer y segundo agentes. La presencia del primer y segundo marcadores en el primer y segundo recipientes, respectivamente, indica la presencia del primer agente biológico en una muestra, y la presencia del tercer y cuarto marcadores en el primer y segundo recipientes, respectivamente, indica la presencia del segundo agente biológico en la muestra.

La Fig. 3 muestra un sistema automatizado 20 para determinar la presencia o ausencia de una pluralidad de agentes biológicos de acuerdo con otra realización de la invención. Cada uno de los agentes comprende respectivas primera y segunda secuencias de ácido nucleico que diferencian al agente de los otros agentes. El sistema 20 incluye al menos un sistema de control de la temperatura, tal como los sistemas de control de la temperatura 28A y 28B, para someter a la primera y segunda mezclas de reacción que se sospecha que contienen los agentes, a condiciones de amplificación de ácido nucleico en vasos de reacción 22A y 22B, respectivamente. La primera mezcla de reacción en el vaso de reacción 22A contiene reactivos y sondas para amplificar y detectar la primera secuencia de ácido nucleico de cada uno de los agentes. La segunda mezcla de reacción en el vaso de reacción 22B contiene reactivos y sondas para amplificar y detectar la segunda secuencia de ácido nucleico de cada uno de los agentes. Aunque se prefieren múltiples sistemas de control de la temperatura, es bien sabido que también podría usarse un único sistema de control de la temperatura (por ejemplo, un bloque de metal para alojar múltiples recipientes de muestra o un sistema de aire forzado para calentar/enfriar múltiples recipientes) para controlar la temperatura de las mezclas de reacción en múltiples recipientes. En realizaciones particularmente preferidas donde la reacción de detección es PCR, el al menos un sistema de control de la temperatura es un termociclador para calentar y enfriar las mezclas de reacción en los recipientes 22A y 22B de acuerdo con perfiles programados de tiempo/temperatura. Los termocicladores con detector o detectores incorporados que funcionan bajo el control del ordenador son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, el sistema Smart Cycler® de Cepheid (por ejemplo, patentes de Estados Unidos N° 6.369.893 y 6.565.815); termocicladores ABI (por ejemplo, patentes de Estados Unidos N° 5.656.493 y 5.038.852); y Lightcycler de Roche (por ejemplo, patentes de Estados Unidos N° 5.455.175 y 5.935.522).

Las reacciones adecuadas de amplificación de ácido nucleico incluyen reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y reacción en cadena de la ligasa (LCR). Son adecuadas reacciones de amplificación isotérmicas y pueden usarse de acuerdo con los métodos de la invención. Ejemplos de reacciones de amplificación isotérmicas incluyen amplificación por desplazamiento de hebra (SDA) (Walker, et al. *Nucleic Acids Res.* 20(7):1691-6 (1992); Walker *PCR Methods Appl* 3(1):1-6 (1993)), amplificación mediada por transcripción (Phyffer, et al., *J. Clin. Microbiol.* 34:834-841 (1996); Vuorinen, et al., *J. Clin. Microbiol.* 33:1856-1859 (1995)), amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA) (Compton, *Nature* 350(6313):91-2 (1991), amplificación por círculo rodante (RCA) (Lisby, *Mol. Biotechnol.* 12(1):75-99 (1999)); Hatch et al., *Genet. Anal.* 15(2):35-40 (1999)) y amplificación de señal de ADN ramificado (bDNA) (véase, por ejemplo, Iqbal et al., *Mol. Cell Sondas* 13(4):315-320 (1999)). Otros métodos de amplificación conocidos para los especialistas en la técnica incluyen CPR (reacción de sonda de ciclado), SSR (replicación de secuencia auto-sostenida), SDA (amplificación por desplazamiento de hebra), QBR (replicasa Q-Beta), Re-AMP (antiguamente RAMP), RCR (reacción en cadena de reparación), TAS (sistema de amplificación basado en transcripción), y HCS.

El sistema 20 también incluye al menos un mecanismo de detección dispuesto para detectar señales de sonda de las mezclas de reacción en los recipientes 22A y 22B. En una realización preferida, el sistema 20 incluye al menos un primer y segundo mecanismos de detección 24A y 24B. El primer mecanismo de detección 24A está dispuesto para detectar la presencia o ausencia de las secuencias de ácido nucleico diana en el primer recipiente 22A, y el segundo mecanismo de detección 24B está dispuesto para detectar la presencia o ausencia de las secuencias de ácido nucleico diana en el segundo recipiente 22B. Aunque se prefieren múltiples mecanismos de detección, es bien sabido que también podría usarse un único detector para detectar marcadores en múltiples recipientes colocando el único detector en comunicación óptica con cada recipiente usando dispositivos ópticos tales como fibra óptica, guías de onda, tubos de luz, etc. Los mecanismos de detección 24A y 24B son preferiblemente fluorímetros para detectar y medir marcadores fluorescentes en las mezclas de reacción. Dichos dispositivos generalmente incluyen al menos una fuente de luz para excitar el marcador fluorescente y al menos un fotodetector para medir la fluorescencia emitida. Estos dispositivos son bien conocidos en la técnica y están ampliamente disponibles en el mercado, tales como los módulos I-CORE® de Cepheid citados anteriormente. Otros mecanismos de detección adecuados incluyen, aunque sin limitación, dispositivos para detectar marcadores fosforescentes, quimioluminiscentes, o electroquimioluminiscentes.

El sistema 20 también incluye al menos un controlador 26 (por ejemplo, un ordenador o microprocesador) en comunicación con los sistemas de control de la temperatura 28A y 28B y con los mecanismos de detección 24A y 24B. El controlador está programado para realizar etapas para determinar la presencia o ausencia de una pluralidad de agentes biológicos.

La Fig. 4 es un diagrama de flujo que muestra las etapas que el controlador 26 está programado para realizar para detectar la presencia o ausencia de múltiples agentes biológicos. En la etapa 200, el controlador 26 envía señales de control al primer sistema de control de la temperatura 28A para someter la primera mezcla de reacción en el recipiente 22A a condiciones de amplificación de ácido nucleico. En la etapa 202, el controlador 26 recibe datos de señal de sonda del detector 24A. En la etapa de decisión 204; el controlador 26 determina a partir de las señales de sonda recibidas de la primera mezcla de reacción en el recipiente 22A si la primera secuencia de ácido nucleico de cualquiera de los agentes está presente en la primera mezcla de reacción. Esto se consigue preferiblemente comparando la señal de sonda para cada secuencia de ácido nucleico diana con un valor umbral mínimo. Si ninguna de las secuencias de ácido nucleico diana se detecta en la primera mezcla de reacción, entonces el controlador registra un resultado negativo en la etapa 206 y no tiene que ejecutarse la reacción de amplificación en el segundo recipiente 22B. Si, sin embargo, la primera secuencia de ácido nucleico diana de cualquiera de los agentes se detecta en la primera mezcla de reacción en el recipiente 22A, entonces el controlador 26 envía señales de control al segundo sistema de control de la temperatura 28B para someter la segunda mezcla de reacción en el recipiente 22B a condiciones de amplificación de ácido nucleico, etapa 208. En la etapa 210, el controlador 26 recibe datos de detección del detector 24B. En la etapa 212, el controlador determina a partir de las señales de sonda recibidas de la mezcla de reacción si la segunda secuencia de ácido nucleico de cualquiera de los agentes está presente en la segunda mezcla de reacción, y por tanto la presencia o ausencia de los múltiples agentes. La presencia de la primera y segunda secuencias de ácido nucleico de cualquiera de los agentes (detectados en reacciones diferentes) es indicativa de la presencia de ese agente.

Agente biológico

Los métodos de la invención se usan para analizar muestras para la presencia o ausencia de cualquiera de varios agentes biológicos diferentes. Los agentes biológicos ejemplares identificados usando los métodos de la invención incluyen, aunque sin limitación, ácidos nucleicos, proteínas incluyendo complejos proteicos, células, por ejemplo, células bacterianas, partículas víricas, y carbohidratos complejos.

Recogida y procesamiento de muestras

Las muestras que posiblemente contienen agentes biológicos detectables con la presente invención pueden encontrarse en fuentes tanto biológicas como ambientales. Cultivos biológicos ejemplares incluyen cultivos celulares, por ejemplo, cultivos bacterianos, extractos celulares, sangre, muestras tisulares, secreciones y excreciones corporales y celulares y similares. Las fuentes ambientales incluyen el aire, acuíferos, suelo, rocas, hielo, agua de mar, desperdicios y similares.

Las muestras biológicas para análisis usando la presente invención pueden recogerse usando cualquier técnica adecuada conocida en la técnica. A modo de ejemplo, puede extraerse sangre con una aguja hipodérmica; recogerse muestras tisulares por raspado o retirada quirúrgica de una parte del tejido; los cultivos celulares pueden sedimentarse por, por ejemplo, centrifugación de una suspensión celular. Los extractos celulares pueden fraccionarse usando cualquiera de diversas técnicas incluyendo, aunque sin limitación, centrifugación, cromatografía, precipitación diferencial en sal y/o disolvente orgánico, electroforesis y similares.

Las muestras ambientales pueden recogerse usando cualquier técnica conocida. Por ejemplo, los agentes biológicos aéreos pueden repartirse en una solución por burbujeo o filtración de aire a través de un disolvente líquido, permitiendo de este modo que los agentes biológicos aéreos se repartan en la fase líquida, experimentando preferiblemente concentración concomitante. Los agentes biológicos en fuentes ambientales líquidas pueden concentrarse y/o purificarse a través de destilación o filtración, separación cromatográfica y similares. Los agentes biológicos sobre superficies sólidas en el entorno pueden recogerse limpiando o frotando la superficie sólida, rescatándose el agente biológico después de la toallita o hisopo. Los sólidos que están en forma de polvos o pueden reducirse a polvos también pueden extraerse usando disolventes acuosos u orgánicos conocidos para los especialistas en la técnica.

Una vez recogidas, las muestras pueden estar en una forma purificada/parcialmente purificada o en una mezcla completa que están en un estado líquido, semi-líquido, o suspensión, preferiblemente en un estado acuoso.

Extracción de ácidos nucleicos y proteínas de muestras biológicas

En algunas realizaciones de la invención, es deseable tratar la muestra que se sospecha que incluye un agente biológico, por ejemplo, una célula o virus, antes del análisis de la muestra. Por ejemplo, puede realizarse lisis celular acompañada por extracción de ácidos nucleicos para facilitar la detección por métodos que incluyen, por ejemplo, PCR en tiempo real. La extracción de ácidos nucleicos de células o virus puede realizarse por medios físicos,

químicos, u otros medios, o por una combinación de dichos medios.

En una realización, los métodos de la invención utilizan los cartuchos de fluido Cepheid. Estos cartuchos se describen completamente en la patente de Estados Unidos 6.374.684; la patente de Estados Unidos 6.391.541; y la patente de Estados Unidos 6.440.725, todas las cuales se incorporan por referencia en su totalidad. Estos cartuchos de fluido (por ejemplo, recipientes) realizan automáticamente la extracción de ácido nucleico desde diversos tipos de muestra. Los cartuchos realizan algunas o todas las siguientes funciones: contención y suministro de reactivo; formación de alícuotas y mezcla de muestra y reactivo; separación y concentración de células; lisis celular rápida usando técnicas ultrasónicas; captura de ADN o ARN, enriquecimiento, y purificación; y preparación de mezcla de reacción y llenado de tubo de reacción integrado (por ejemplo, recipiente).

Otros métodos de preparación de muestra para la extracción de ácido nucleico y/o marcadores proteicos para usar los métodos de la invención son conocidos para los especialistas en la técnica. Los medios físicos incluyen la alteración mecánica de las células, tal como por vibración de perlas de vidrio o plástico u otras partículas, por impacto de las células diana o virus en microestructuras afiladas, o mediante un instrumento de presión que pasa una solución de microorganismos a través de un orificio de diámetro muy pequeño a elevada presión liberando de este modo las células. También puede usarse transferencia de energía térmica, tal como calentando una suspensión de virus hasta 95 °C o por congelación-descongelación repetida de esporas bacterianas activadas para alterar las paredes celulares.

La alteración mecánica de células diana o virus puede realizarse con regiones interactivas diseñadas para rasgar la membrana superficial o pared celular del organismo diana mediante cizalla o vibración. La vibración puede realizarse conteniendo perlas de vidrio u otras perlas en una cámara, y acoplado a la cámara una piezomembrana también incorporada en el cartucho. Como alternativa, puede acoplarse un transductor ultrasónico, tal como una bocina ultrasónica, a una pared de la cámara para transferir energía ultrasónica a las células. La frecuencia y amplitud del ultrasonido se afina para corresponder con la frecuencia resonante de las células diana y se optimiza para realizar la lisis con calentamiento o cavitación mínimos, aunque lo último puede ser necesario para una lisis eficaz. Se describen algunos métodos ultrasónicos por Murphy et al. en la patente de Estados Unidos N° 5.374.522, y por Li en la patente de Estados Unidos N° 4.983.523.

Puede emplearse lisado químico solo o en combinación con lisado físico o ultrasónico. Los agentes típicos de lisado químico caen en varias categorías, tales como enzimas, detergentes, y caótropos. La lisozima es una enzima que ataca hidrolíticamente las paredes celulares de muchas bacterias; la tripsina es una enzima proteasa que rompe la membrana celular de la mayoría de las células eucariotas. Pueden emplearse otras proteasas con especificidad por ciertas secuencias peptídicas y se prefieren si el resto diana está expuesto a ciertas proteasas. La proteinasa K se usa a menudo porque también digiere proteínas nucleares y enzimas de la célula hospedadora que pueden interferir con reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para células eucariotas, detergentes tales como Triton X-100 o dodecil sulfato sódico solubilizan la membrana celular y liberan los contenidos intracelulares. Pueden usarse caótropos tales como isotiocianato de guanidina o urea para lisar células y tienen el beneficio adicional de inhibir las RNAsas que pueden destruir el ARN diana. Ejemplos de métodos químicos se describen en la patente de Estados Unidos N° 5.652.141 de Henco et al. y la patente de Estados Unidos N° 5.856.174 de Lipshutz et al.

También pueden usarse otros métodos de extracción celular, por ejemplo, que emplean un canal con dimensiones restringidas de sección transversal de modo que el estrés de rotura causa lisis celular cuando la muestra se pasa a través del canal a presión suficientemente elevada. Como alternativa, puede realizarse extracción celular y desnaturalización de proteínas contaminantes aplicando una corriente eléctrica alterna a la muestra.

Marcadores y sondas

Los métodos de la invención incluyen detectar marcadores de cada agente biológico que tenga que identificarse. La detección de un marcador incluye identificar de forma distintiva características macromoleculares, microscópicas o moleculares del agente biológico en análisis. Las características de identificación distintiva que sirven como marcadores de la presente invención no tienen que identificar de forma única al agente biológico, sino que los marcadores preferiblemente indican con al menos un 80 %, más preferiblemente un 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 98 %, 99 % o mayor certeza que el agente biológico está presente cuando se detecta el marcador. Por lo tanto, la identificación de más de un marcador, por ejemplo, al menos 2 marcadores, para un agente biológico en una muestra indica con certeza casi absoluta que el agente biológico está presente en la muestra. Por tanto, en la mayoría de situaciones, son preferibles dos marcadores por agente para diferenciar dos agentes.

Los marcadores preferidos adecuados para su uso en la presente invención incluyen cualquier característica molecular o macromolecular que pueda reconocerse con una sonda de la presente invención. Las combinaciones marcado-sonda además incluyen receptor-ligando, enzima-sustrato, antígeno (o epítipo)-anticuerpo, y secuencias complementarias de ácido nucleico.

Diversas realizaciones de la invención usan sondas que son ácidos nucleicos (por ejemplo, oligonucleótidos complementarios), proteínas (por ejemplo, ligandos, sustratos, antígenos, anticuerpos,) y similares. Se contempla

que cualquier sonda usada en la presente invención se marcará con un marcador detectable de modo que la sonda sea detectable en un sistema apropiado de detección.

Los marcadores y/o sondas pueden ser ácidos nucleicos. En una realización, al menos un marcador es una secuencia de ácido nucleico del agente biológico, por ejemplo, célula bacteriana o virus. Por consiguiente, en este ejemplo, la sonda es un oligonucleótido complementario que hibrida con la secuencia de ácido nucleico. Como norma general, la cantidad de secuencias necesaria para apoyar un resultado de confirmación altamente específico varía de dos a seis secuencias. En la mayoría de los casos, son preferibles dos secuencias para diferenciar un agente, por ejemplo, un organismo, de organismos muy próximos potencialmente raros, cepas curadas en plásmido, o fondos no caracterizados o inesperados.

Una sonda proteica es preferiblemente un compañero de unión de afinidad, preferiblemente un compañero de unión de inmunofinidad, del marcador de interés. Por ejemplo, cuando el marcado es una enzima, la sonda puede ser un sustrato de origen natural de la enzima, o un sustrato análogo derivado sintéticamente. Si el marcador es un receptor, la sonda puede ser un ligando natural o sintético del receptor. Preferiblemente, las sondas proteicas son anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo, que reconocen específicamente uno o más marcadores epitópicos. Por consiguiente, en una realización alternativa, al menos un marcador es un antígeno del agente biológico y la sonda es un anticuerpo.

Sondas de ácido nucleico

Son adecuadas muchas sondas de hibridación de ácido nucleico diferentes para la práctica de la invención. Numerosos tipos de sondas son capaces de hibridar con y detectar secuencias polinucleotídicas particulares. En algunos casos, la sonda comprende un fluoróforo o enzima, que permite la detección de la unión de la sonda a su complemento.

Una sonda de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria. Un ácido nucleico de la presente invención generalmente contendrá enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, como se resume a continuación, se incluyen análogos de ácido nucleico que pueden tener estructuras alternativas. El ácido nucleico puede ser ADN, tanto genómico como ADNc, ARN o un híbrido, donde el ácido nucleico contienen cualquier combinación de desoxirribo- y ribonucleótidos, y cualquier combinación de bases, incluyendo uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina hipoxantina, isocitosina, isoguanina, etc., incluyendo análogos nucleotídicos, y nucleósidos modificados tales como nucleósidos modificados amino.

La concentración de sonda debe ser suficiente para unirse a la cantidad de secuencias diana o de control que se amplifican para proporcionar una evaluación precisa de la cantidad de secuencia amplificada. Los especialistas en la técnica reconocerán que la cantidad de concentración de sonda variará de acuerdo con la afinidad de unión de la sonda así como la cantidad de secuencia a unirse.

Normalmente, para la generación de señal, las sondas utilizan un cambio en la fluorescencia de un fluoróforo debido a un cambio en su interacción con otra molécula o resto producido cambiando la distancia entre el fluoróforo y la molécula o resto de interacción. Como alternativa, se proporcionan otros métodos para detectar un polinucleótido en una muestra, incluyendo el uso de sondas marcadas de forma radiactiva.

Los ensayos basados en fluorescencia pueden depender de la generación de señales sobre transferencia de energía de resonancia de fluorescencia, o "FRET". FRET es conocida en la técnica. En resumen, el método mide un cambio en la fluorescencia causado por un cambio en la distancia que separa un primer fluoróforo de un aceptor de energía de resonancia, otro fluoróforo o un inactivador. Las combinaciones de un fluoróforo y una molécula o resto de interacción, incluyendo moléculas o restos de inactivación, son conocidas como "pares FRET". El mecanismo de interacción del par FRET requiere que el espectro de absorción de un miembro del par solape con el espectro de emisión del otro miembro, el primer fluoróforo. Si la molécula o resto de interacción es un inactivador, su espectro de absorción debe solapar con el espectro de emisión del fluoróforo (Stryer, L., Ann. Rev. Biochem. 47: 819-846 (1978); Biophysical Chemistry parte II, Techniques for the Study of Biological Structure and Function, C. R. Cantor y P. R. Schimmel, páginas 448-455 (W. H. Freeman and Co., San Francisco, EEUU, 1980); y Selvin, P. R., Methods in Enzymology 246: 300-335 (1995)). También pueden usarse sondas fluorescentes no FRET, tales como las descritas en, por ejemplo, Tyagi et al., patente de Estados Unidos N° 6.150.097.

Sondas proteicas

Se proporcionan métodos para ensayar el uso de secuencias peptídicas o análogos peptídicos por la invención. Las sondas proteicas pueden comprender un marcador fluorescente, un marcador radiactivo, o cualquier marcador aceptable conocido en la técnica. En algunas realizaciones, puede marcarse la proteína diana en lugar de la sonda.

En un aspecto de la invención, la diana a detectar preferiblemente comprende una secuencia peptídica o una secuencia análoga tipo péptido tal como, por ejemplo, un dipéptido, tripéptido, polipéptido, proteína o un complejo multi-proteína. En un aspecto, la diana a detectar es una proteína que tiene al menos un sitio receptor para la sonda.

Las proteínas detectables de la invención pueden detectarse mediante una sonda que comprende un aminoácido o análogo de aminoácido. Por ejemplo, las sondas adecuadas pueden comprender un único aminoácido, único análogo de aminoácido, un análogo tipo péptido, peptidoide, peptidomimético, péptido, dipéptido, tripéptido, polipéptido, proteína o un complejo multi-proteína.

Puede ensayarse diversos complejos de unión con el método de la invención. En algunas realizaciones, la invención se usa para analizar características de unión (incluyendo la presencia o ausencia de unión, y la afinidad de unión) entre proteínas y otros compuestos basados en aminoácidos o análogos de aminoácidos. Las proteínas adecuadas para el análisis incluyen, por ejemplo, de tipo silvestre, mutantes, aisladas, traducidas in vitro, y/o sintetizadas. La invención también puede usarse para analizar la unión de ligandos a receptores proteicos.

Por ejemplo, un complejo de unión que puede ser útil para practicar los métodos de la invención incluye unión específica de un péptido marcado de forma fluorescente a una única proteína o complejo multi-proteína. En este caso la proteína específica se une directamente a la sonda proteica marcada, o está presente en un complejo multi-proteína y por tanto está interactuando con una o más proteínas diferentes en el complejo, pero no necesariamente de está interactuando directamente con la sonda marcada.

Asimismo, la invención también posibilita detectar la unión de un compuesto no marcado a al menos un miembro de un complejo de compuestos complejados, donde al menos uno de los compuestos complejados está marcado por, por ejemplo, mediciones de intensidad fluorescente. El compuesto marcado y el compuesto no marcado no tiene que interactuar incluso directamente para que suceda la detección. Por tanto, la invención posibilita detectar una proteína a través de influencia indirecta o directa sobre las características de unión de una sonda marcada a una diana.

Anticuerpos

En una realización, los marcadores se detectan usando anticuerpos. Las sondas de anticuerpo pueden ser anticuerpos policlonales y monoclonales. Las sondas de anticuerpo también pueden ser formas modificadas por ingeniería genética tales como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados) y anticuerpos heteroconjugados (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), así como formas de unión a antígeno de anticuerpos, incluyendo fragmentos con capacidad de unión a antígeno (por ejemplo, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv y rIgG). Véase también, Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Véase también, por ejemplo, Kuby, J., Immunology, 3^a Ed., W.H. Freeman & Co., Nueva York (1998). El término también se refiere a fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv) recombinantes. El término anticuerpo también puede incluir moléculas bivalentes o biespecíficas, diacuerpos, triacuerpos, y tetracuerpos. Las moléculas bivalentes y biespecíficas se describen en, por ejemplo, Kostelny et al., (1992) J Immunol 148:1547, Pack y Pluckthun (1992) Biochemistry 31:1579, Hollinger *et al.*, 1993, *supra*, Gruber et al. (1994) J Immunol: 5368, Zhu et al. (1997) Protein Sci 6:781, Hu et al. (1996) Cancer Res. 56:3055, Adams et al. (1993) Cancer Res. 53:4026, y McCartney, et al. (1995) Protein Eng. 8:301.

Sondas polisacáridas

Otra realización utiliza marcadores polisacáridos y sondas que reconocen estos marcadores, por ejemplo, lectinas y proteínas de unión a carbohidrato. Los restos polisacáridos pueden localizarse en agentes biológicos, por ejemplo, en glucoproteínas y glucolípidos. Estos marcadores pueden detectarse con sondas marcadas, por ejemplo, glucoproteínas marcadas de forma fluorescente. Los sistemas marcador/sonda basados en polisacárido adecuados son bien conocidos para los especialistas en la técnica y están disponibles en el mercado, por ejemplo, en Molecular Probes.

Ejemplos

Lo siguiente son ejemplos de realizaciones específicas para realizar la presente invención. Los ejemplos se ofrecen únicamente con fines ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ningún modo. Se han hecho esfuerzos por asegurar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero se debe permitir algún error experimental y desviación, por supuesto.

La práctica de la presente invención puede emplear métodos convencionales de química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y amplificación de ácido nucleico, dentro de las habilidades de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, T.E. Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., adición actual); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2^a Edición, 1989); Methods In Enzymology (S. Colowick y N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a Edición (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey and Sundberg Advanced Organic Chemistry 3^a Ed. (Plenum Press) Vol. A y B (1992).

En resumen, como se describe en más detalle a continuación, se usó PCR en tiempo real combinada de 4 canales para detectar dos marcadores de ácido nucleico para cada uno de 3 agentes biológicos en una muestra. Se marcaron sondas de ácido nucleico con uno de cuatro colorantes fluorescentes diferentes. El método se usó para identificar los agentes biológicos en la muestra. Los especialistas en la técnica reconocerán que los métodos expuestos en este documento son ampliamente aplicables a varios sistemas de ensayo, usando cualquier marcador, por ejemplo, fluoróforo, detectable a nivel de molécula individual, y en la detección de un amplio intervalo de restos diana.

Se detectaron dos marcadores por agente y se describen el siguiente modo: gen A de la cepa Ames de *Bacillus anthracis* (número de acceso a GenBank NC003980; gen B de la cepa Ames de *Bacillus anthracis* (número de acceso a GenBank NC003981); genes A y B de estreptococos del Grupo B (GBS) (número de acceso a GenBank X72754); y genes A y B de *Bacillus globigii* (Bg) (número de acceso a GenBank Z28592.1). Cada mezcla de reacción también contenía reactivos para posibilitar la detección de un plásmido de control interno (IC1) (solicitud de patente de Estados Unidos US 20030211527, incorporada en este documento en su totalidad para todos los fines).

Los cebadores de PCR y sondas para la amplificación y detección de los genes marcadores se diseñaron usando las secuencias descritas anteriormente y los principios bien conocidos para los especialistas en la técnica y descritos en más detalle en este documento. Las sondas se marcaron usando LIZ (detectable usando el canal de color 1), Alexa 647 (detectable usando el canal de color 1), FAM (detectable usando el canal de color 2), dROX (detectable usando el canal de color 3), o VIC (detectable usando el canal de color 4).

Los cebadores y sondas se diseñaron usando la secuencia génica marcadora y el software de diseño de cebadores que está comúnmente disponibles, por ejemplo, Oligo 6 (Molecular Biology Insights, Inc); Primer3 (Whitehead Institute for Biomedical Research); y Primer Express (Applied Biosystems, Inc.). Un especialista en la técnica reconocerá que el diseño de los cebadores generalmente seguía una serie de normas: los cebadores eran de 17-28 bases de longitud; la composición de bases fue del 50-60 % (G+C); los cebadores acababan (3') en una G o C, o CG o GC; las Tm fueron preferiblemente entre 55-80 °C; se evitaron preferiblemente ejecuciones de tres o más C o G en los extremos 3' de cebadores (que puede promover mal cebado en secuencias ricas en G o C); los extremos 3' de los cebadores fueron preferiblemente no complementarios; la auto-complementariedad del cebador (capacidad de formar estructuras secundarias tales como horquillas) se evitó preferiblemente; para ensayos combinados, las Tm de cada cebador fueron preferiblemente similares; los amplicones que se generaron fueron preferiblemente de tamaños similares y entre 100 a 250 pb.

Para sondas TaqMan, se siguen normas similares que son bien conocidas para los especialistas en la técnica, incluyendo: la temperatura de fusión (Tm) de la sonda es preferiblemente de 68-70 °C; los contenidos en G-C son preferiblemente en el intervalo del 30-80 %; se evitan ejecuciones de un nucleótido idéntico, especialmente para G; las G en el extremo 5' se evitan preferiblemente; la hebra que da a la sonda más C que G se selecciona preferiblemente. Además, si la sonda TaqMan está diseñada para discriminación alélica, la posición del sitio polimórfico (desapareamiento) debe estar aproximadamente en el tercio central de la secuencia.

Ejemplo 1: Identificación de tres (3) diferentes agentes biológicos en una muestra

Preparación de mezclas de reacción

Se prepararon dos mezclas de reacción para posibilitar la detección a tiempo real de tres organismos diferentes: cepa Ames de *Bacillus anthracis* (Ames); *streptococcus* del Grupo B (GBS); y *Bacillus globigii* (Bg). Cada mezcla de reacción también contenía reactivos para posibilitar la detección de un plásmido de control interno (IC1). Se usaron tres canales de color para la detección.

La mezcla de reacción 1 (volumen de mezcla maestra de 81 µl) contenía cebador superior 600 nM, cebador inferior 600 nM y sonda marcada con FAM 100 nM para la detección de gen A de *B. anthracis*; cebador superior 500 nM, cebador inferior 500 nM y sonda marcada con FAM 300 nM para la detección de gen A de GBS; cebador superior 500 nM, cebador inferior 500 nM y sonda marcada con Alexa 647 500 nM para la detección de gen A de Bg; cebador superior 200 nM, cebador inferior 200 nM y sonda marcada con dROX 75 nM para la detección del plásmido IC; 4fg de ADN de plásmido IC; y 9,0 µl de tampón de liofilización Cepheid 4x. La mezcla maestra se usó para resuspender una perla de reactivo enzimático liofilizado que contenía 10 unidades de complejo de polimerasa AmpliTaq/anticuerpo contra polimerasa Taq. La concentración final de MgCl₂ fue aproximadamente 6 mM.

La mezcla de reacción 2 (volumen de mezcla maestra de 81 µl) contenía cebador superior 400 nM, cebador inferior 400 nM y sonda marcada con LIZ 75 nM para la detección de gen B de *B. anthracis*; cebador superior 500 nM, cebador inferior 500 nM y sonda marcada con FAM 200 nM para la detección de gen B de GBS; cebador superior 500 nM, cebador inferior 500 nM y sonda marcada con Alexa 647 300 nM para la detección de gen B de Bg; cebador superior 200 nM, cebador inferior 200 nM y sonda marcada con dROX 75 nM para la detección del plásmido IC; 4fg de ADN de plásmido IC y 9,0 µl de tampón de liofilización Cepheid 4x. La mezcla maestra se usó para resuspender una perla de reactivo enzimático liofilizado que contenía 10 unidades de complejo de polimerasa AmpliTaq/anticuerpo contra polimerasa Taq. La concentración final de MgCl₂ fue aproximadamente 6 mM.

Lo siguiente es una representación tabular de los marcadores de sonda y asignaciones de cartucho para este experimento, y los resultados esperados (tabla de reclamo):

	Cartucho 1			Cartucho 2		
Agente	Canal 1	Canal 2	Canal 3	Canal 1	Canal 2	Canal 3
Ames		gen A de Ames		gen B de Ames		
GBS		gen A de GBS			gen B de GBS	
Bg	gen A de Bg			gen B de Bg		
IC1			IC1			IC1

Agente	Cartucho 1	Cartucho 2
cepa Ames	2	1
GBS	2	2
Bg	1	1
IC1	3	3

5

Detección de cepa Ames de *B. antracis*

Se sonicaron esporas de la cepa Ames de *B. antracis* para liberar el ADN y se añadieron 4,0 µl de 63 cfu/µl a la mezcla de reacción 1 y a la mezcla de reacción 2, Cada reacción se realizó por triplicado; se obtuvieron resultados idénticos para las tres reacciones en una serie. Se dividieron tres alícuotas de 25 µl de cada mezcla en tres tubos I-CORE de 25 µl. El termociclado se realizó en instrumentos Smart Cycler® usando el siguiente protocolo: mantenimiento a 95 °C durante 3 minutos; después 45 ciclos de 95 °C, 5 segundos; 60 °C 14 segundos; 72 °C 5 segundos. Se recogieron datos de fluorescencia a tiempo real durante la etapa de hibridación a 60 °C.

10

15

Los resultados se presentan en la siguiente tabla. Se detectó una señal positiva en el canal 2 de la mezcla de reacción 1 y el canal 1 de la mezcla de reacción 2. Este resultado confirmó la presencia del agente biológico cepa Ames de *B. antracis* en la muestra. La ausencia de señal en el canal 2 en la mezcla de reacción 2 confirmó la ausencia de GBS en la muestra. La ausencia de señal en el canal 1 en la mezcla de reacción 1 confirmó la ausencia de Bg en la muestra. Una señal positiva para el canal 3 en ambas reacciones confirmó la presencia de IC1 en ambas reacciones y ausencia de inhibición del ensayo.

20

	Cartucho 1	Cartucho 2
Canal 1	---	+++
Canal 2	+++	---
Canal 3	+++	+++

Detección de GBS

Se añadieron 4,0 µl de ADN de GBS (1000 copias/µl) a la mezcla de reacción 1 y a la mezcla de reacción 2. Cada reacción se realizó por triplicado; se obtuvieron resultados idénticos para las tres reacciones en una serie. Se dividieron tres alícuotas de 25 µl de cada mezcla en tres tubos I-CORE de 25 µl. El termociclado se realizó en instrumentos Smart Cycler® usando el siguiente protocolo: mantenimiento a 95 °C durante 3 minutos; después 45 ciclos de 95 °C, 5 segundos; 60 °C 14 segundos; 72 °C 5 segundos. Se recogieron datos de fluorescencia a tiempo real durante la etapa de hibridación a 60 °C.

25

30

Los resultados se presentan en la siguiente tabla. Se detectó una señal positiva en el canal 2 en ambas mezclas de reacción 1 y 2. Este resultado confirmó la presencia del agente biológico GBS en la muestra. La ausencia de señal en el canal 1 en la mezcla de reacción 2 confirmó la ausencia de *B. antracis*. La ausencia de señal en el canal 1 en ambas reacciones confirmó la ausencia de Bg. Una señal positiva para el canal 3 en ambas reacciones confirmó la presencia de IC1 en ambas reacciones y ausencia de inhibición del ensayo.

35

	Cartucho 1	Cartucho 2
Canal 1	---	---
Canal 2	+++	+++
Canal 3	+++	+++

Detección de *B. globigii* (Bg)

Se añadieron 4,0 µl de ADN de *B. globigii* (500 copias/µl) a la mezcla de reacción 1 y a la mezcla de reacción 2. Cada reacción se realizó por triplicado; se obtuvieron resultados idénticos para las tres reacciones en una serie. Se dividieron tres alícuotas de 25 µl de cada mezcla en tres tubos I-CORE de 25 µl. El termociclado se realizó en instrumentos Smart Cycler® usando el siguiente protocolo: mantenimiento a 95 °C durante 3 minutos; después 45 ciclos de 95 °C, 5 segundos; 60 °C 14 segundos; 72 °C 5 segundos. Se recogieron datos de fluorescencia a tiempo

40

45

real durante la etapa de hibridación de 60 °C.

Los resultados se presentan en la siguiente tabla. Se detectó una señal positiva en el canal 1 en ambas mezclas de reacción 1 y 2. Este resultado confirmó la presencia del agente biológico Bg en la muestra. La ausencia de señal en el canal 2 en la mezcla de reacción 1 confirmó la ausencia de Ames en la muestra. La ausencia de señal en el canal 2 en ambas reacciones confirmó la ausencia de GBS. Una señal positiva para el canal 3 en ambas reacciones confirmó la presencia de IC1 en ambas reacciones y ausencia de inhibición del ensayo.

	Cartucho 1	Cartucho 2
Canal 1	+++	+++
Canal 2	---	---
Canal 3	+++	+++

Ejemplo 2: Identificación de tres (3) agentes biológicos diferentes en una muestra que contiene más de un agente

Preparación de mezclas de reacción

Se preparan dos mezclas de reacción para detección por PCR en tiempo real de tres organismos diferentes: cepa Ames de *Bacillus antracis* (Ames); *streptococcus* del Grupo B (GBS); y - *Bacillus globigii* (Bg). Cada mezcla de reacción también contiene reactivos para posibilitar la detección de un plásmido de control interno (IC1) y una espora de control interno (IC2) como control para el procedimiento de lisis celular.

Las mezclas de reacción se preparan como en el Ejemplo 1.

Lo siguiente es una representación tabular de los marcadores de sonda y asignaciones de cartucho para este experimento, y los resultados esperados (tabla de reclamo):

Agente	Cartucho 1				Cartucho 2			
	Canal 1	Canal 2	Canal 3	Canal 4	Canal 1	Canal 2	Canal 3	Canal 4
Ames	gen A de Ames				gen B de Ames			
GBS	gen A de GBS				gen B de GBS			
Bg	gen A de Bg				gen B de Bg			
IC1				IC1				IC1
IC2				IC2				IC2

Agente	Cartucho 1	Cartucho 2
cepa Ames	2	1
GBS	2	2
Bg	1	1
IC1	3	3
IC2	4	4

Detección de cepa Ames y GBS

Se sonicán esporas de cepa Ames de *B. antracis* para liberar el ADN y se añaden 4,0 µl de 63 cfu/µl a la mezcla de reacción 1 y a la mezcla de reacción 2. A continuación se añaden 40 µl de ADN de GBS (1000 copias/µl) a la mezcla de reacción 1 y a la mezcla de reacción 2. Cada reacción se realiza por triplicado; se obtienen resultados idénticos para las tres reacciones en una serie. Se dividen tres alícuotas de 25 µ de cada mezcla en tres tubos I-CORE de 25 µl. El termociclado se realiza en instrumentos Smart Cycler® usando el siguiente protocolo: mantenimiento a 95 °C durante 3 minutos; después 45 ciclos de 95 °C, 5 segundos, 60 °C 14 segundos, 72 °C 5 segundos. Se recogen datos de fluorescencia a tiempo real durante la etapa de hibridación de 60 °C.

Los resultados se presentan en la siguiente tabla. Se detecta una señal positiva en el canal 2 en las mezclas de reacción 1 y 2 y una señal positiva en el canal 1 en la mezcla de reacción 2. Este resultado confirma la presencia de ambos agentes biológicos *B. antracis* y GBS en la muestra. La ausencia de señal positiva en el canal 1 en la mezcla de reacción 1 confirma la ausencia de Bg. Una señal positiva en ambos canales 3 y 4 en ambas reacciones confirma la presencia de IC1 e IC2 en ambas reacciones y ausencia de inhibición del ensayo.

	Cartucho 1	Cartucho 2
Canal 1	---	+++
Canal 2	+++	+++
Canal 3	+++	+++
Canal 4	+++	+++

Detección de GBS y Bg

Se añaden 4,0 µl de ADN de GBS (1000 copias/µl) y 4,0 µl de ADN de *B. globigii* (500 copias/µl) cada uno a la mezcla de reacción 1 y a la mezcla de reacción 2. Cada reacción se realiza por triplicado; se obtienen resultados idénticos para las tres reacciones en una serie. Se dividen tres alícuotas de 25 µl de cada mezcla en tres tubos I-CORE de 25 µl. El termociclado se realiza en instrumentos Smart Cycler® usando el siguiente protocolo: mantenimiento a 95 °C durante 3 minutos; después 45 ciclos de 95 °C, 5 segundos; 60 °C 14 segundos; 72 °C 5 segundos. Se recogen datos de fluorescencia a tiempo real durante la etapa de hibridación de 60 °C.

Los resultados se presentan en la siguiente tabla. Se detecta una señal positiva en el canal 2 en ambas mezclas de reacción 1 y 2. Este resultado confirma la presencia del agente biológico GBS en la muestra. Se detecta una señal positiva en el canal 1 en ambas mezclas de reacción 1 y 2. Este resultado confirma la presencia del agente biológico Bg en la muestra. Una señal positiva en ambos canales 3 y 4 en ambas reacciones confirma la presencia de IC1 e IC2 en ambas reacciones y ausencia de inhibición del ensayo.

	Cartucho 1	Cartucho 2
Canal 1	+++	+++
Canal 2	+++	+++
Canal 3	+++	+++
Canal 4	+++	+++

Detección de cepa Ames

Se sonicen esporas de la cepa Ames de *B. antracis* para liberar el ADN y se añaden 4,0 µl de 63 cfu/µl a la mezcla de reacción 1 y a la mezcla de reacción 2. A continuación, se añaden 4,0 µl de ADN de *B. globigii* (500 copias/µl) a la mezcla de reacción 1 y a la mezcla de reacción 2. Cada reacción se realiza por triplicado; se obtienen resultados idénticos para las tres reacciones en una serie. Se dividen tres alícuotas de 25 µl de cada mezcla en tres tubos I-CORE de 25 µl. El termociclado se realiza en instrumentos Smart Cycler® usando el siguiente protocolo: mantenimiento a 95 °C durante 3 minutos; después 45 ciclos de 95 °C, 5 segundos; 60 °C 14 segundos; 72 °C 5 segundos. Se recogen datos de fluorescencia a tiempo real durante la etapa de hibridación de 60 °C.

Los resultados se muestran en la siguiente tabla. Se detecta una señal positiva en el canal 2 en la mezcla de reacción 1 y una señal positiva en el canal 1 en la mezcla de reacción 2. Este resultado confirma la presencia del agente biológico Ames en la muestra. Se detecta una señal positiva en el canal 1 en ambas mezclas de reacción 1 y 2. Este resultado confirma la presencia del agente biológico Bg en la muestra. La ausencia de señal en el canal 2 en la mezcla de reacción 2 confirma la ausencia de GBS. Una señal positiva para ambos canales 3 y 4 en ambas reacciones confirmó la presencia tanto de IC1 como de IC2 en ambas reacciones y ausencia de inhibición del ensayo.

	Cartucho 1	Cartucho 2
Canal 1	+++	+++
Canal 2	+++	---
Canal 3	+++	+++
Canal 4	+++	+++

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar al menos un primer y un segundo agentes biológicos, comprendiendo el primer agente un primer y un segundo marcadores, y comprendiendo el segundo agente un tercer y un cuarto marcadores, comprendiendo el método:
- (a) preparar una primera y una segunda mezclas a partir de al menos una y la misma muestra que se sospecha que contiene los agentes;
 - (b) detectar la presencia o la ausencia del primer y del tercer marcadores en la primera mezcla en un primer recipiente; y
 - (c) detectar la presencia o la ausencia del segundo y del cuarto marcadores en la segunda mezcla en un segundo recipiente;
- mediante lo cual la presencia del primer y del segundo marcadores indica la presencia del primer agente biológico en la muestra, y la presencia del tercer y del cuarto marcadores indica la presencia del segundo agente biológico en la muestra, en donde:
- la primera mezcla comprende una primera sonda que reconoce específicamente el primer marcador y una tercera sonda que reconoce específicamente el tercer marcador;
 - la segunda mezcla comprende una segunda sonda que reconoce específicamente el segundo marcador y una cuarta sonda que reconoce específicamente el cuarto marcador;
 - cada una de las sondas tiene un marcador detectable, el marcador detectable de la primera sonda es igual que el marcador detectable de la segunda sonda, y el marcador detectable de la tercera sonda es diferente del marcador detectable de la cuarta sonda;
 - la etapa de detección (b) comprende determinar la presencia o la ausencia de la primera y de la tercera sondas que se unen al primer y al tercer marcadores en la primera mezcla;
 - la etapa de detección (c) comprende determinar la presencia o la ausencia de la segunda y de la cuarta sondas que se unen al segundo y al cuarto marcadores en la segunda mezcla.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el primer, el segundo, el tercer y el cuarto marcadores se seleccionan entre el grupo que consiste en ácidos nucleicos, proteínas y polisacáridos.
3. El método de la reivindicación 1, en el que:
- (a) la primera, la segunda, la tercera o la cuarta sondas se selecciona entre el grupo que consiste en ácidos nucleicos y anticuerpos; o
 - (b) cada una de las sondas tiene un marcador fluorescente, el marcador fluorescente de la primera y segunda sondas tienen longitudes de onda máximas de emisión respectivas en 100 nm entre sí, y los marcadores fluorescentes de la tercera y cuarta sondas tienen longitudes de onda máximas de emisión respectivas que difieren en más de 100 nm; o
 - (c) las sondas y los marcadores son ácidos nucleicos y la detección de la presencia o de la ausencia de los marcadores en las mezclas se realiza usando PCR.
4. El método de la reivindicación 3, en el que al menos la primera sonda es una sonda de ácido nucleico, y al menos la cuarta sonda es un anticuerpo.
5. El método de la reivindicación 4, en el que la detección de la presencia o de la ausencia del primer marcador comprende PCR que amplifica el primer marcador e hibrida la primera sonda con el marcador amplificado; o la detección de la presencia o de la ausencia del cuarto marcador comprende la unión inespecífica de la cuarta sonda al cuarto marcador.
6. El método de la reivindicación 1, en el que el primer, el segundo, el tercer y el cuarto marcadores comprenden una primera, una segunda, una tercera y una cuarta secuencias de ácido nucleico, la primera mezcla contiene sondas de hibridación para marcar la primera y la tercera secuencias de ácido nucleico, y la segunda mezcla contiene sondas de hibridación para marcar la segunda y la cuarta secuencias de ácido nucleico.
7. El método de la reivindicación 1, en el que se detectan al menos 3 agentes biológicos en la muestra.
8. El método de la reivindicación 1, en el que se detectan al menos 4 agentes biológicos en una muestra.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el método es para detectar de forma óptica la presencia o la ausencia de un número de agentes biológicos mayor que el número de canales de color usados para detectar la presencia o la ausencia de los agentes biológicos, teniendo cada uno de los agentes biológicos respectivas primera y segunda secuencias de ácido nucleico que diferencian al agente biológico de los otros agentes biológicos, comprendiendo el método las etapas de:

(a) formar la primera y la segunda mezclas en el primer y el segundo recipientes, respectivamente, a partir de al menos una y la misma muestra que se sospecha que contiene los agentes biológicos, en donde:

- (i) la primera mezcla contiene, para cada uno de los agentes biológicos, un conjunto respectivo de primera sonda para marcar la primera secuencia de ácido nucleico del agente biológico;
- (ii) la segunda mezcla contiene, para cada uno de los agentes biológicos, un conjunto respectivo de segunda sonda para marcar la segunda secuencia de ácido nucleico del agente biológico;
- (iii) al menos dos de los conjuntos de primera sonda en la primera mezcla tienen los mismos intervalos de longitud de onda de emisión a detectar en el mismo canal de color, y los al menos dos conjuntos correspondientes de segunda sonda en la segunda mezcla tienen diferentes intervalos de longitud de onda de emisión a detectar en diferentes canales de color;

(b) leer de forma óptica la presencia o la ausencia de señales de sonda a partir de los al menos dos conjuntos de primera sonda en la primera mezcla que tienen los mismos intervalos de longitud de onda de emisión;

(c) leer de forma óptica la presencia o la ausencia de señales de sonda a partir de los al menos dos conjuntos correspondientes de segunda sonda en la segunda mezcla que tienen diferentes intervalos de longitud de onda de emisión; y

(d) determinar a partir de la combinación de señales de sonda recibidas de cada una de la mezclas la presencia o la ausencia de los agentes biológicos.

10. Un método para detectar al menos un primer y un segundo agentes biológicos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el método comprende:

(a) preparar una primera mezcla en un primer recipiente a partir de al menos una muestra que se sospecha que contiene los agentes;

(b) detectar la presencia o la ausencia del primer y del tercer marcadores en el primer recipiente;

(c) si cualquiera del primer o del tercer marcadores está presente en el primer recipiente, preparar una segunda mezcla en un segundo recipiente a partir de al menos una muestra; y

(d) detectar la presencia o la ausencia del segundo y del cuarto marcadores en el segundo recipiente;

mediante lo cual la presencia del primer y del segundo marcadores indica la presencia del primer agente biológico en la muestra, y la presencia del tercer y del cuarto marcadores indica la presencia del segundo agente biológico en la muestra.

11. El método de la reivindicación 10, en el que el primer, el segundo, el tercer y el cuarto marcadores comprenden una primera, una segunda, una tercera y una cuarta secuencias de ácido nucleico, la primera mezcla contiene reactivos y sondas para amplificar y detectar la primera y la tercera secuencias de ácido nucleico, y la etapa de detección de la presencia o de la ausencia del primer y del tercer marcadores en el primer recipiente comprende someter la primera mezcla a condiciones de amplificación de ácido nucleico y determinar a partir de las señales de sonda si cualquiera de la primera o de la tercera secuencias de ácido nucleico está presente en la primera mezcla.

12. El método de la reivindicación 11, en el que la segunda mezcla contiene reactivos y sondas para amplificar y detectar la segunda y la cuarta secuencias de ácido nucleico, y la etapa de detección de la presencia o de la ausencia del segundo y del cuarto marcadores en el segundo recipiente comprende someter la segunda mezcla a condiciones de amplificación de ácido nucleico y determinar a partir de las señales de sonda si cualquiera de la segunda o de la cuarta secuencias de ácido nucleico está presente en la segunda mezcla.

13. Un sistema para detectar al menos un primer y un segundo agentes biológicos a partir de al menos una y la misma muestra, en donde el primer agente comprende un primer y un segundo marcadores, y el segundo agente comprende un tercer y un cuarto marcadores, comprendiendo el sistema:

(a) al menos un primer y un segundo recipientes, alojando el primer recipiente reactivos para detectar el primer y el tercer marcadores y alojando el segundo recipiente reactivos para detectar el segundo y el cuarto marcadores, comprendiendo dichos primeros reactivos una primera sonda que reconoce específicamente el primer marcador y una tercera sonda que reconoce específicamente el tercer marcador, comprendiendo dichos segundos reactivos una segunda sonda que reconoce específicamente el segundo marcador y una cuarta sonda que reconoce específicamente el cuarto marcador, en donde cada una de las sondas tiene un marcador detectable, el marcador detectable de la primera sonda es igual que el marcador detectable de la segunda sonda, y el marcador detectable de la tercera sonda es diferente del marcador detectable de la cuarta sonda;

(b) al menos un detector dispuesto para detectar la presencia o la ausencia de los marcadores en los recipientes; y

(c) al menos un controlador en comunicación con el al menos un detector, estando programado el controlador con instrucciones legibles por ordenador para realizar una serie de operaciones que comprenden:

(i) iniciar una reacción de detección en el primer recipiente;

(ii) recibir datos del detector; y

(iii) determinar a partir de los datos la presencia o la ausencia del primer y del tercer marcadores en el primer recipiente; en donde si el primer o el tercer marcadores están presentes en el primer recipiente, el controlador realiza una segunda serie de operaciones que comprenden;

(iv) iniciar una segunda reacción de detección en el segundo recipiente;

(v) recibir datos adicionales del detector; y

(vi) determinar a partir de los datos adicionales la presencia o la ausencia del segundo o del cuarto marcadores en el segundo recipiente;

mediante lo cual la presencia del primer y del segundo marcadores indica la presencia del primer agente biológico en una muestra, y la presencia del tercer y del cuarto marcadores indica la presencia del segundo agente biológico en la muestra.

14. El sistema de la reivindicación 13, en el que los marcadores son ácidos nucleicos, los reactivos alojados en el primer recipiente son sondas de ácido nucleico que reconocen específicamente el primer y el tercer marcadores, y los reactivos alojados en el segundo recipiente son sondas de ácido nucleico que reconocen específicamente el segundo y el cuarto marcadores.

15. El sistema de la reivindicación 14, en el que la reacción de detección comprende amplificación de ácido nucleico.

16. El sistema de la reivindicación 13, en donde el sistema comprende al menos un primer y un segundo detectores en comunicación con el controlador, estando dispuesto el primer detector para detectar la presencia o la ausencia de uno o más de los marcadores en el primer recipiente, y estando dispuesto el segundo detector para detectar la presencia o la ausencia de uno o más de los marcadores en el segundo recipiente.

17. El sistema de la reivindicación 13, en el que el primer, el segundo, el tercer y el cuarto marcadores comprenden una primera, una segunda, una tercera y una cuarta secuencias de ácido nucleico, y en donde el primer y el segundo recipientes comprenden cartuchos para extraer ácido nucleico de una muestra y para alojar el ácido nucleico para detección.

18. El sistema de la reivindicación 13, en donde dicho sistema es un sistema automatizado para determinar la presencia o la ausencia de una pluralidad de agentes en al menos una y la misma muestra, comprendiendo cada uno de los agentes respectivas primera y segunda secuencias de ácido nucleico que diferencian el agente de los otros agentes, comprendiendo el sistema automatizado:

a) primera y segunda mezclas de reacción que se sospecha que contienen los agentes, conteniendo la primera mezcla de reacción reactivos y sondas para amplificar y detectar la primera secuencia de ácido nucleico de cada uno de los agentes, y conteniendo la segunda mezcla de reacción reactivos y sondas para amplificar y detectar la segunda secuencia de ácido nucleico de cada uno de los agentes;

b) al menos un sistema de control de la temperatura para someter dichas primera y segunda mezclas de reacción que se sospecha que contienen los agentes, a condiciones de amplificación de ácido nucleico;

c) al menos un mecanismo de detección dispuesto para detectar señales de sonda de las mezclas de reacción; y

d) al menos un controlador en comunicación con el al menos un sistema de control de la temperatura y con el al menos un mecanismo de detección, estando programado el controlador para realizar las etapas de:

i) enviar señales de control al sistema de control de la temperatura para someter la primera mezcla de reacción a condiciones de amplificación de ácido nucleico;

ii) determinar a partir de las señales de sonda recibidas de la primera mezcla de reacción si la primera secuencia de ácido nucleico de cualquiera de los agentes está presente en la primera mezcla de reacción;

iii) si la primera secuencia de ácido nucleico de cualquiera de los agentes está presente en la primera mezcla de reacción, entonces se envían señales de control al sistema de control de la temperatura para someter la segunda mezcla de reacción a condiciones de amplificación de ácido nucleico; y

iv) determinar a partir de las señales de sonda recibidas de la segunda mezcla de reacción si la segunda secuencia de ácido nucleico de cualquiera de los agentes está presente en la segunda mezcla de reacción;

mediante lo cual la presencia de la primera y de la segunda secuencias de ácido nucleico de cualquiera de los agentes es indicativa de la presencia de ese agente.

19. El sistema de la reivindicación 18, en donde el sistema comprende al menos un primer y un segundo mecanismos de detección en comunicación con el controlador, estando dispuesto el primer mecanismo de detección para detectar la presencia o la ausencia de una o más de las secuencias de ácido nucleico en la primera mezcla de reacción, y estando dispuesto el segundo mecanismo de detección para detectar la presencia o la ausencia de una o más de las secuencias de ácido nucleico en la segunda mezcla de reacción.

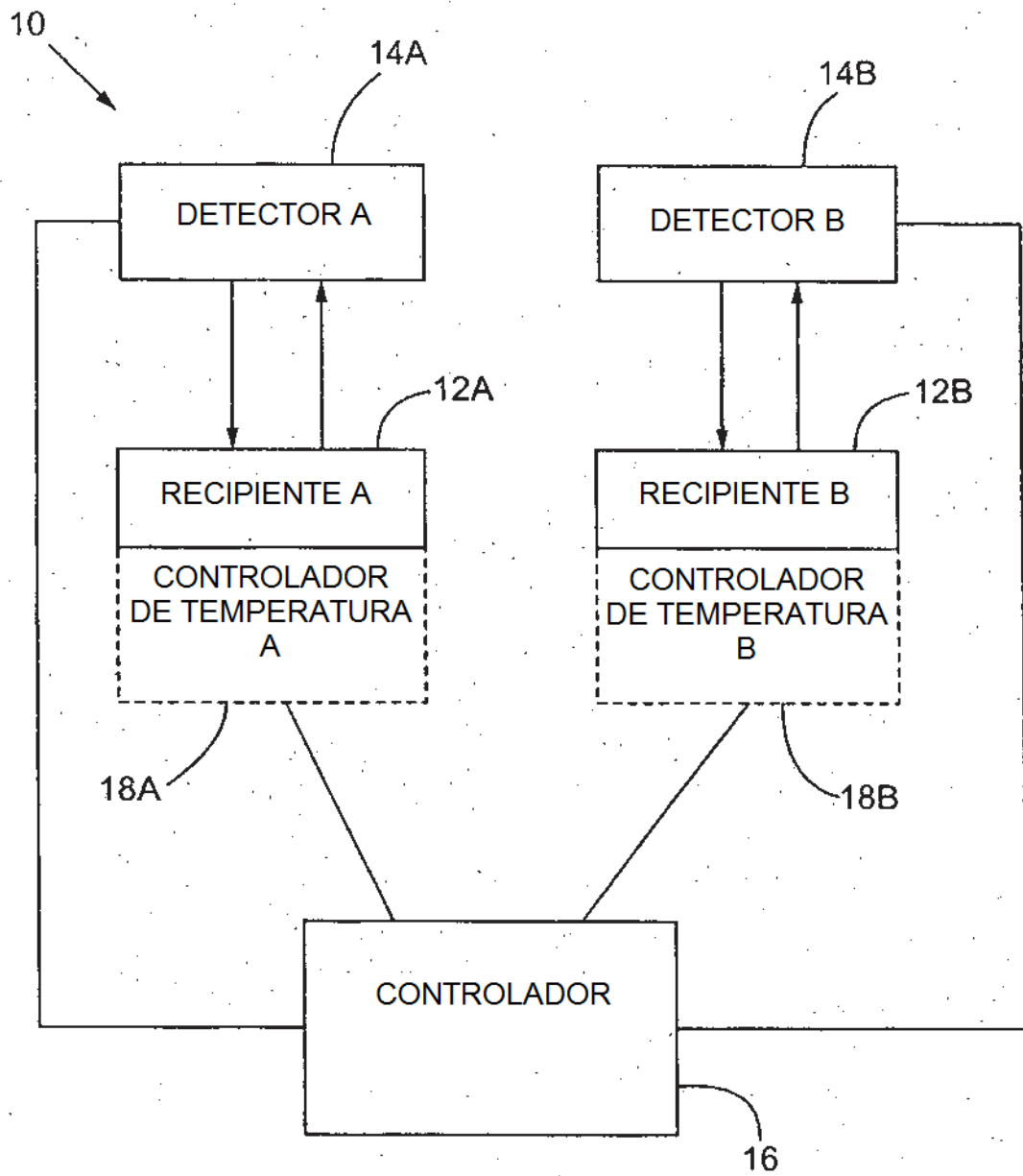


FIG. 1

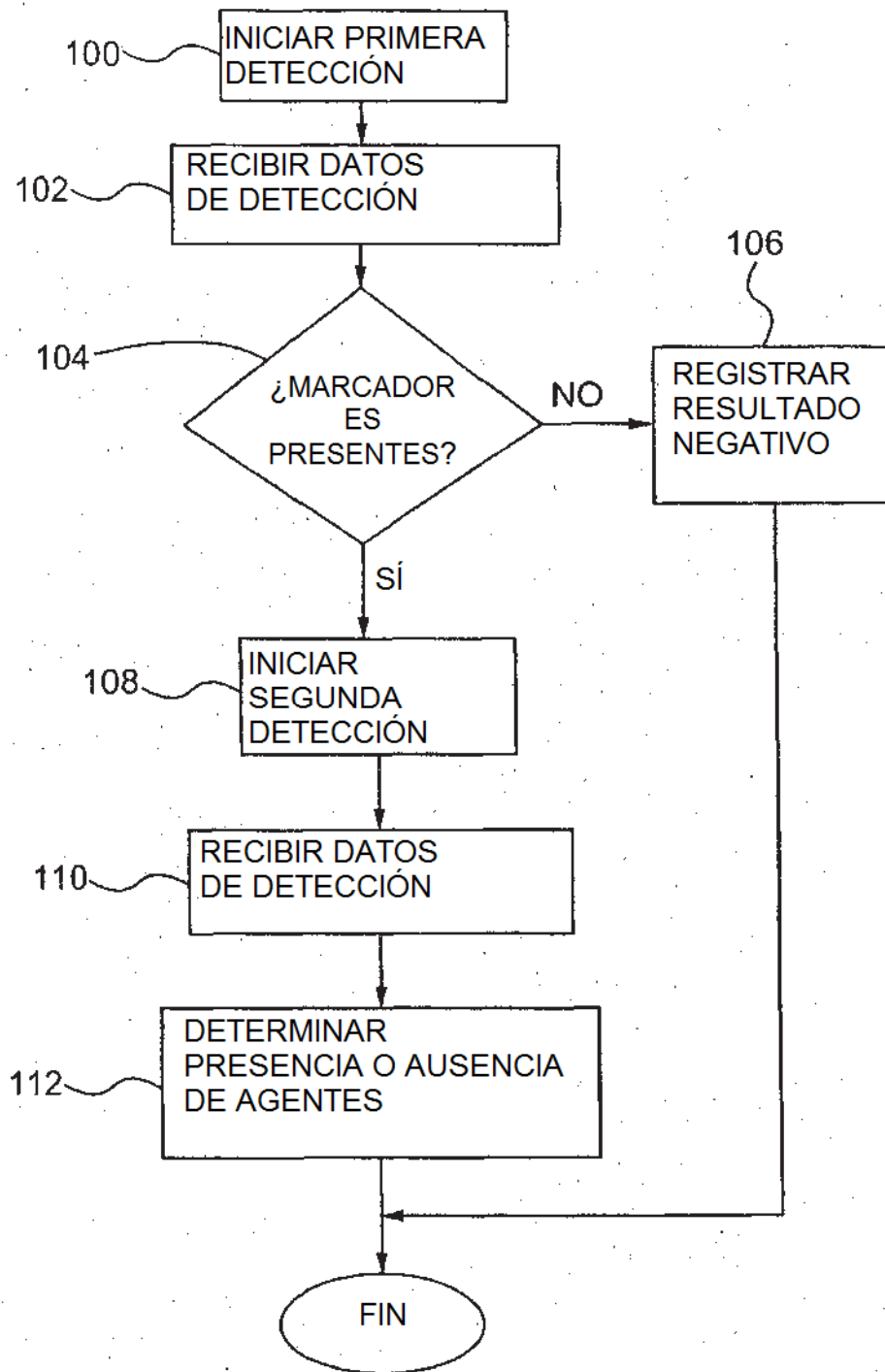


FIG. 2

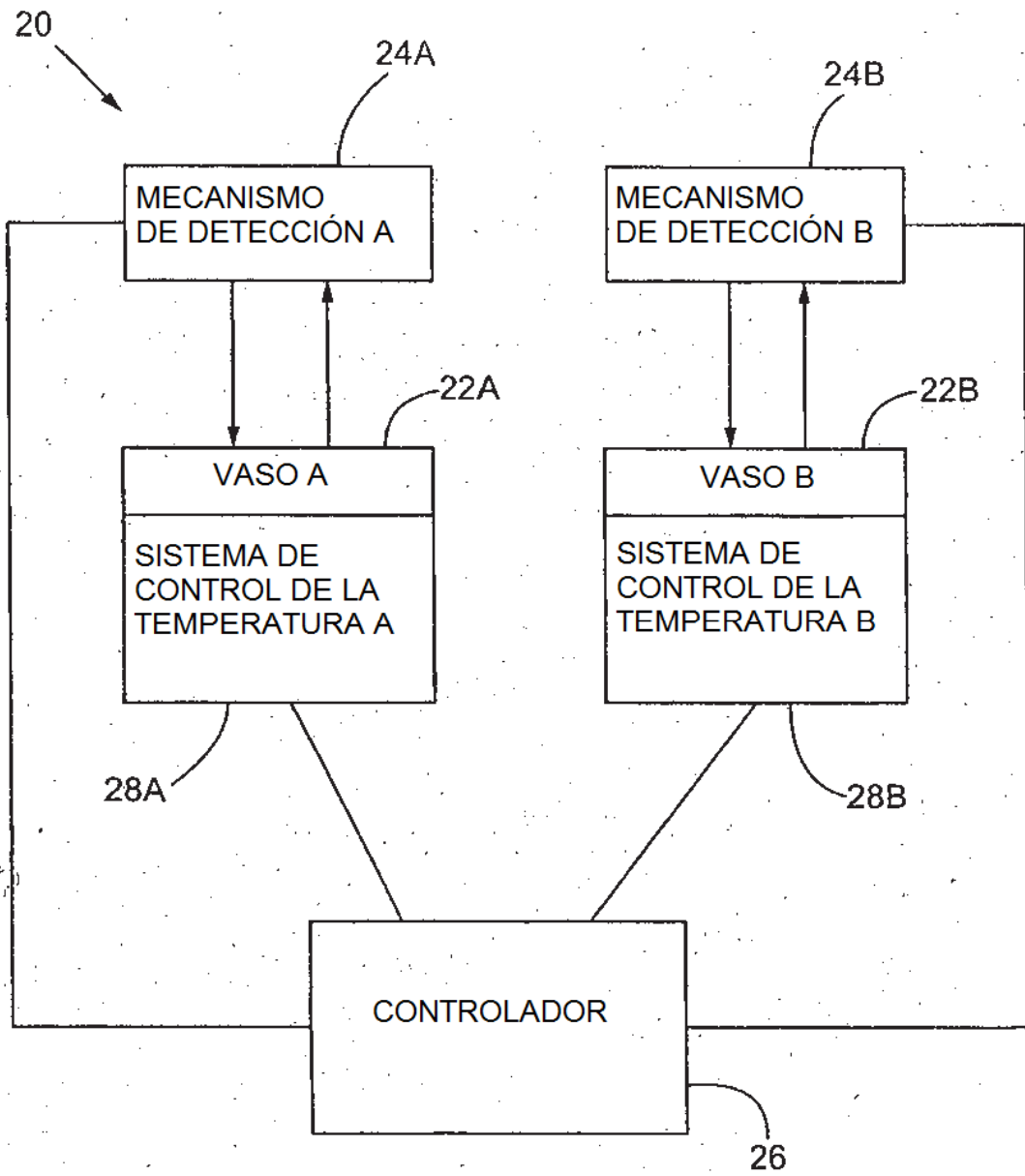


FIG. 3

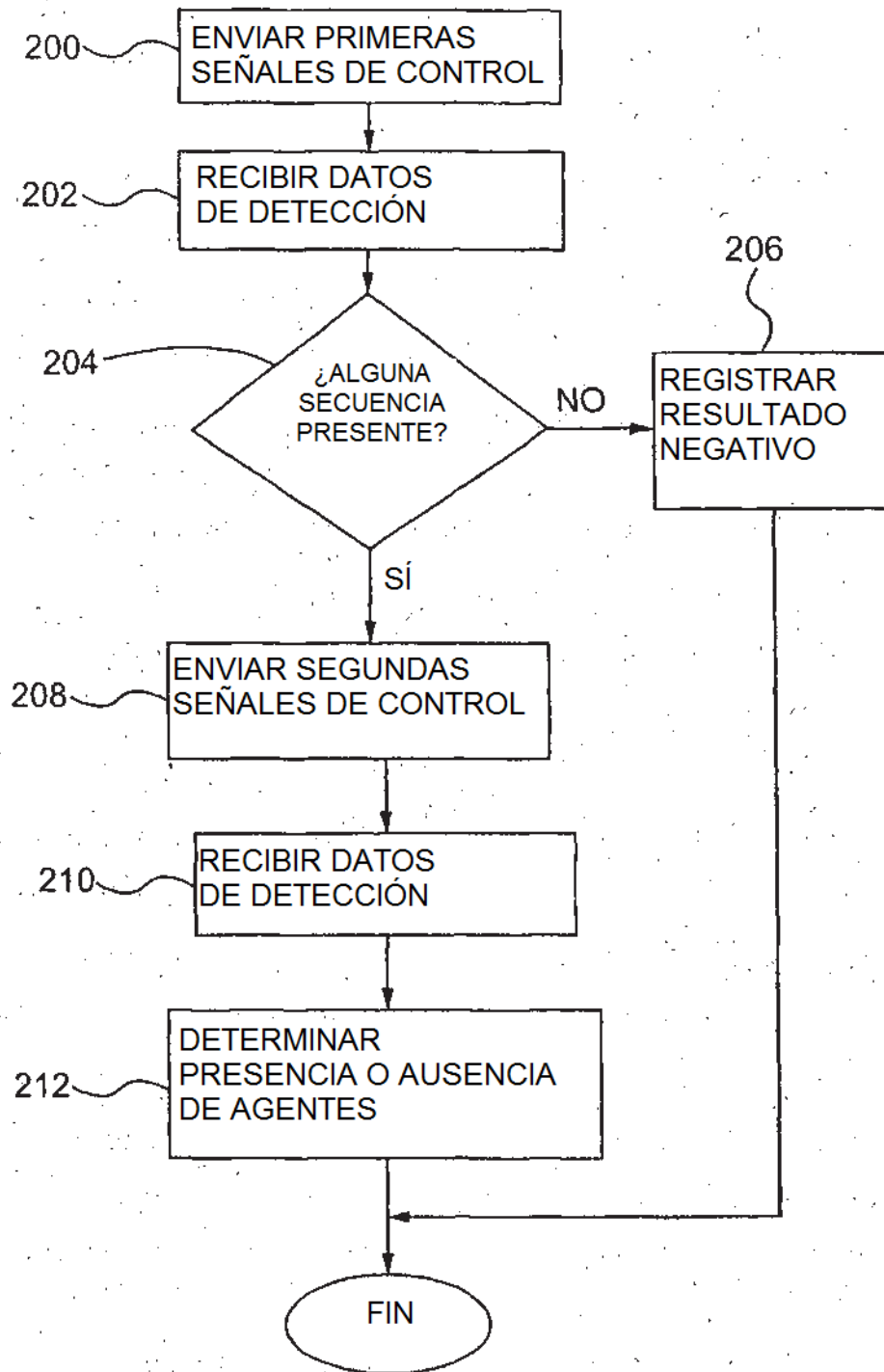


FIG. 4