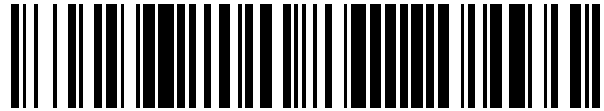


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 037**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2011** **E 11717590 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015** **EP 2566976**

54 Título: **Estuche de diagnóstico y procedimiento para detectar un microorganismo en una muestra que comprende un control exógeno coloreado**

30 Prioridad:

04.05.2010 FR 1053462

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

10.02.2016

73 Titular/es:

AES CHEMUNEX (100.0%)

Route de Dol

35270 Combours, FR

72 Inventor/es:

BERTRAND, EMMANUEL y

BLANCHARD, BÉATRICE

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 559 037 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

Estuche de diagnóstico y procedimiento para detectar un microorganismo en una muestra que comprende un control exógeno coloreado.

5 La presente invención se refiere a unos estuches de diagnóstico y a unos procedimientos para la detección de un microorganismo en una muestra que incorpora una validación de las diferentes etapas de reacción con la ayuda de un control de extracción exógeno combinado con un indicador coloreado de pH.

10 Desarrollada por K. Mullis en 1985 (Premio Nobel en 1993), la técnica PCR (Polymerase Chain Reaction) experimenta un auge considerable a partir de los años 1990 en el campo de la investigación y del diagnóstico. Se utiliza actualmente tanto en los campos de diagnóstico clínico, veterinario, medioambiental como agroalimentario. Los ensayos basados en la PCR o en unos métodos de amplificación derivados de la PCR permiten detectar una secuencia de ácido nucleico en una muestra biológica con una extraordinaria sensibilidad y especificidad.

15 En algunos campos, la PCR se realiza en la actualidad en laboratorios no especialistas en biología molecular gracias a la utilización de estuches comerciales (o "kits") listos para el uso y fáciles de usar. A pesar de la existencia de unos estuches comerciales de este tipo que facilitan mucho la realización de reacciones de amplificación complejas, existe una necesidad importante de simplificación de estos estuches y de validación de las manipulaciones efectuadas con el fin de disminuir el número de errores y hacer más fácil la utilización de estos estuches. Unos controles de este tipo serían particularmente útiles cuando la detección del microorganismo en la muestra implica unas etapas de extracción de los ácidos nucleicos previas a la amplificación de los ácidos nucleicos específicos del microorganismo diana, que necesita unas manipulaciones y unas mezclas sucesivas de diferentes reactivos. Una sucesión de etapas de reacción de este tipo puede conducir a errores de manipulación y es poco tranquilizadora para el operario que no dispone durante estas manipulaciones de controles que le permitan validar cada etapa a medida que se desarrolla el ensayo. Estos problemas se encuentran en particular en el campo de los ensayos agroalimentarios y de diagnóstico medioambiental, que se realizan habitualmente en laboratorios no especializados en biología molecular.

20 Con el fin de validar las diferentes etapas de reacción, era conocido introducir unos controles positivos así como unos controles negativos realizados de manera concomitante con la amplificación del ácido nucleico específico del microorganismo diana. Un ácido nucleico control es entonces amplificado al mismo tiempo que la secuencia diana que permite verificar el buen desarrollo de las etapas de reacción en ausencia de amplificación y de detección de la secuencia diana. Sin embargo, la simple adición de un ácido nucleico no permite verificar el buen funcionamiento de la etapa de extracción, sino sólo la reacción de amplificación. A la inversa, la presencia de un control negativo permite en general validar la ausencia de contaminación con unos ácidos nucleicos diana.

25 Además, durante la realización de un análisis de tipo PCR, el operario tiene que manipular un gran número de veces pequeños volúmenes de líquido incoloro. Siendo la dificultada para el operario la de estar seguro que ha añadido, en cada etapa de reacción, el líquido incoloro en otro líquido incoloro y así sucesivamente. Una de las maneras de asegurarse que las adiciones de líquido sucesivas se han realizado correctamente es utilizar para cada una de las etapas unos reactivos coloreados. Por eso, también se conocía utilizar unos colorantes o unos reactivos coloreados con el fin de permitir una validación visual de ciertas etapas para el operario. Típicamente, con el fin de verificar la adición de una enzima esencial para el desarrollo de la reacción, esta última puede ser puesta a disposición en un tampón coloreado, siendo la manipulación de un líquido coloreado más fácil para el operario.

30 La solicitud de patente US 2007/0015169 describe unos procedimientos de purificación de ácidos nucleicos que utilizan unos tampones coloreados. La presencia de tampones coloreados está, no obstante, destinada únicamente al control del buen desarrollo de las etapas de mezcla de reactivo y de lisis. No se describe un control de las etapas de amplificación. Por otro lado, estos procedimientos no comprenden ningún control que permita excluir la inhibición de la reacción de amplificación debida a la muestra.

35 Estos estuches de PCR no comprenden sin embargo ningún control eficaz para las etapas que se desarrollan aguas arriba de la reacción de amplificación que incluyen en particular la extracción de los ácidos nucleicos a partir de una muestra y después la mezcla del producto obtenido con los reactivos de amplificación. La utilización de células que llevan el material genético del control interno permite controlar, por un lado, la eficacia de la extracción y, por otro lado, el buen funcionamiento de la etapa de amplificación. En efecto, unas células de este tipo sufrirán la misma lisis que los gérmenes buscados en la muestra de manera concomitante. Este sistema es aún más razonable por cuanto que los productos de extracción de las células control y de la muestra son de las mismas naturalezas (ácidos nucleicos) y sirven de base a la reacción común de PCR. Además, la utilización de líquidos coloreados permite que el operario mejor y distinga vea los diferentes líquidos manipulados, pero no hay posibilidad de verificar que las adiciones sucesivas se han efectuado correctamente.

40 La presente invención propone unos procedimientos y unos estuches comerciales que combinan un indicador coloreado de pH y un control de extracción y de amplificación exógeno. El control exógeno consiste en un microorganismo control que incorpora una secuencia de ADN control cuya amplificación permite verificar al mismo

tiempo el buen desarrollo de la preparación de la muestra que comprende la extracción de los ácidos nucleicos y el buen desarrollo de la reacción de amplificación. Este control de extracción y de amplificación exógeno está combinado con un indicador coloreado de pH de tal manera que no sólo es posible colorear los líquidos de reacción para una manipulación más fácil, sino también verificar el buen desarrollo de las diferentes etapas de extracción y de amplificación visualizando el o los cambios del indicador coloreado de pH.

Ventajosamente, el indicador coloreado de pH no interfiere ni con la reacción enzimática de amplificación, ni con la detección de los productos de amplificación con la ayuda de fluoróforos, por ejemplo.

Ventajosamente, el indicador coloreado de pH es no tóxico y no presenta por lo tanto riesgos particulares para el operario.

Ventajosamente, el indicador coloreado de pH cambia dos veces de color durante el procedimiento para un buen seguimiento del conjunto de las etapas de extracción y de amplificación.

Ventajosamente, el color del indicador coloreado de pH no está afectado ni por unos cambios bruscos de temperaturas ni por unas temperaturas elevadas superiores a 90°C.

Listado de secuencias

- SEC ID nº 1: Cebador sentido EPC1 (24 nucleótidos)
- SEC ID nº 2: Cebador antisentido EPC2 (20 nucleótidos)

Sumario de la invención

La invención se refiere a un procedimiento para detectar un microorganismo diana en una muestra mediante la extracción de los ácidos nucleicos de dicho microorganismo diana seguida de la amplificación de un ácido nucleico específico de dicho microorganismo diana en el que el desarrollo de la extracción y de la amplificación son validados por la realización concomitante de las siguientes etapas:

- a) puesta a disposición de un contenedor que comprende, en el estado seco, un indicador coloreado de pH y un microorganismo control que incluye un ácido nucleico control,
- b) adición, en el estado líquido, de un reactivo de extracción que tiene un pH inferior a 7 y obtención de una mezcla de reacción de extracción que tiene el color de la forma ácida del indicador coloreado de pH,
- c) tratamiento de la mezcla de reacción de extracción para liberar los ácidos nucleicos presentes en dicha mezcla de reacción de extracción,
- d) mezcla de una alícuota de dicha mezcla de reacción de extracción tratada con un reactivo de amplificación que tiene un pH superior a 7 y obtención de una mezcla de reacción de amplificación que tiene el color de la forma básica del indicador de pH,
- e) amplificación del ácido nucleico control.

En un primer modo de realización, la extracción de los ácidos nucleicos de dicho microorganismo diana seguida de la amplificación de un ácido nucleico específico de dicho microorganismo diana se realiza en el o en los mismos contenedores que la extracción de los ácidos nucleicos del microorganismo control y la amplificación del ácido nucleico control.

En otro modo de realización, la extracción de los ácidos nucleicos de dicho microorganismo diana seguida de la amplificación de un ácido nucleico específico de dicho microorganismo diana se realiza en uno o unos contenedores distintos del o de los contenedores utilizados para la extracción de los ácidos nucleicos del microorganismo control y la amplificación del ácido nucleico control. En este caso, la extracción de los ácidos nucleicos de dicho microorganismo diana seguida de la amplificación de un ácido nucleico específico de dicho microorganismo diana se realiza preferentemente en uno o unos contenedores que comprenden el indicador coloreado de pH.

En un modo de realización ventajoso de la invención, el contenedor comprende, en el estado seco, dicho indicador coloreado de pH, un microorganismo control que incluye un ácido nucleico control y un agente de conservación seleccionado de entre la fructosa, la glucosa, la manosa, el almidón, la trehalosa, la galactosa y la sacarosa.

Preferentemente, el microorganismo control es un microorganismo Gram negativo.

Preferentemente, el indicador coloreado de pH tiene por lo menos una zona de cambio a un pH comprendido entre el pH del reactivo de extracción y el pH del reactivo de amplificación.

Ventajosamente, el indicador coloreado de pH se selecciona de entre el rojo cresol y el azul de bromotimol.

5 En unos modos de realización ventajosos, el indicador coloreado de pH tiene por lo menos una zona de cambio a un pH inferior al pH del reactivo de extracción y por lo menos una zona de cambio a un pH comprendido entre el pH del reactivo de extracción y el pH del reactivo de amplificación.

Preferentemente, la amplificación del ácido nucleico control y, llegado el caso, del ácido nucleico específico del microorganismo diana se efectúa mediante un método de PCR cuantitativa que utiliza unos fluoróforos.

10 La invención se refiere también a unos estuches de diagnóstico para detectar un microorganismo diana en una muestra que comprende un primer contenedor que comprende, en el estado seco, un indicador coloreado de pH, un microorganismo control que incluye un ácido nucleico control, y por lo menos un segundo contenedor que comprende un reactivo para la amplificación de ácidos nucleicos que comprenden un ADN polimerasa.

15 Preferentemente, estos estuches que comprenden además un reactivo de extracción que comprende una proteinasa.

Ventajosamente, el indicador coloreado de pH se selecciona de entre el rojo cresol y el azul de bromofenol.

20 Preferentemente, estos estuches comprenden además unos cebadores para la amplificación del ácido nucleico control.

Preferentemente, estos estuches comprenden además unos cebadores para la amplificación de un ácido nucleico específico de dicho microorganismo diana.

25

Descripción de la invención

30 La invención se refiere por lo tanto a unos procedimientos y a unos estuches de diagnóstico para detectar un microorganismo diana en una muestra por amplificación de una secuencia de ácido nucleico específico de dicho microorganismo. Estos procedimientos y estuches utilizan un control positivo interno para las etapas de extracción y de amplificación así como un indicador coloreado de pH cuyo cambio permite seguir las adiciones sucesivas de líquidos de reacción.

35 La invención se refiere más particularmente a un procedimiento para detectar un microorganismo diana en una muestra mediante la extracción de los ácidos nucleicos de dicho microorganismo diana, seguida de la amplificación de un ácido nucleico específico de dicho microorganismo diana, en el que el desarrollo de la extracción y de la amplificación son validados por la realización concomitante de las etapas siguientes:

40 a) puesta a disposición de un contenedor que comprende, en el estado seco, un indicador coloreado de pH y un microorganismo control que incluye un ácido nucleico control,

45 b) adición, en el estado líquido, de la muestra y de un reactivo de extracción que tiene un pH inferior a 7, y obtención de una mezcla de reacción de extracción que tiene el color de la forma ácida del indicador coloreado de pH,

c) tratamiento de la mezcla de reacción de extracción para liberar los ácidos nucleicos presentes en dicha mezcla de reacción de extracción,

50 d) mezcla de una alícuota de dicha mezcla de reacción de extracción tratada con un reactivo de amplificación que tiene un pH superior a 7 y obtención de una mezcla de reacción de amplificación que tiene el color de la forma básica del indicador pH,

e) amplificación del ácido nucleico control,

55 en el que la extracción de los ácidos nucleicos de dicho microorganismo diana seguida de la amplificación de un ácido nucleico específico de dicho microorganismo diana se realiza en el o en los mismos contenedores que la extracción de los ácidos nucleicos del microorganismo control y la amplificación del ácido nucleico control.

60 Las etapas de reacción necesarias para la detección del microorganismo diana se realizan por lo tanto de manera concomitante con la detección del ácido nucleico control del microorganismo control. La realización concomitante de estas etapas de reacción se efectúa por lo tanto en "un solo gesto", dicho de otra manera, en una misma manipulación para el operario del ensayo. La detección del microorganismo diana y del microorganismo control se puede efectuar en el mismo tubo (PCR multiplex) o en unos tubos diferentes. Cuando las etapas de reacción se realizan en unos tubos diferentes, se prefiere que los tubos utilizados para la detección del microorganismo diana comprendan el indicador coloreado de pH para la validación de las adiciones y mezclas de reactivos.

65

La descripción se refiere asimismo a la extracción de los ácidos nucleicos de dicho microorganismo diana seguida de la amplificación de un ácido nucleico específico del microorganismo diana realizadas en uno o unos contenedores distintos del o de los contenedores utilizados para la extracción de los ácidos nucleicos del microorganismo control y la amplificación del ácido nucleico control. En este caso, la extracción de los ácidos nucleicos de dicho microorganismo diana seguida de la amplificación de un ácido nucleico específico de dicho microorganismo diana se realiza, preferentemente, en uno o unos contenedores que comprenden el indicador coloreado de pH.

Por muestra, se entiende en particular cualquier muestra susceptible de contener el microorganismo diana que se desea detectar. Puede tratarse en particular de una muestra biológica derivada de un alimento o de un producto alimenticio. Se citará en particular el agua, los productos lácteos, las carnes, los productos de huevo, los productos del mar, los productos vegetales y las muestras del medio ambiente. En otros modos de realización, la muestra es sangre, plasma, un tejido biológico, un órgano biológico o un fluido corporal.

Típicamente, en los procedimientos y estuches de diagnóstico de la presente invención, para determinar si el microorganismo diana está presente en la muestra, se necesitan por lo menos dos etapas distintas: una primera etapa que conduce a la extracción o a la liberación de los ácidos nucleicos del microorganismo diana y una segunda etapa de amplificación de un ácido nucleico específico de dicho microorganismo diana.

En algunos modos de realización, la muestra podrá ser utilizada directamente en los procedimientos y los estuches de la presente invención. Esto podrá ser en particular el caso para las muestras que se presentan naturalmente en el estado líquido tales como el agua, la leche o el plasma, por ejemplo. Alternativamente, la muestra puede ser objeto de un tratamiento previo tal como, por ejemplo, una trituración o una puesta en cultivo. Así, la muestra puede ser colocada previamente en un medio de cultivo e incubada a una temperatura dada durante un tiempo dado. Alternativamente, una muestra sólida puede ser triturada previamente y transformada del estado sólido al estado líquido.

Por "microorganismo diana" se entiende cualquier microorganismo pluricelular o unicelular y en particular los virus, las bacterias o también las levaduras. Los estuches y los procedimientos de la presente invención permiten detectar más particularmente unos microorganismos patógenos en unas muestras variadas, incluyendo unas muestras alimentarias. Entre los microorganismos diana, se podrá citar en particular *Escherichia coli*, *Salmonelle spp*, las enterobacterias, *Listeria spp*, *Campylobacter spp*, *Klesiella spp*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Clostridium spp*, *Candida spp*, *Fusarium*, *Saccharomyces Aspergillus* y los enterovirus. Los estuches de diagnóstico y los procedimientos de la presente invención son susceptibles de detectar cualquier microorganismo diana en una muestra por amplificación de un ácido nucleico específico de dicho microorganismo diana.

Los estuches y los procedimientos de la presente invención combinan un control de extracción y de amplificación exógena en forma de un microorganismo control que comprende un ácido nucleico control con un indicador coloreado de pH. El control exógeno y el indicador coloreado de pH son ventajosamente suministrados listos para el uso, en el estado seco, en un contenedor en el que se realizará la primera etapa de extracción de los ácidos nucleicos. El indicador coloreado de pH y el microorganismo control están presentes en el estado desecado o deshidratado.

Por "contenedor" se entiende todo lo que puede contener un líquido de reacción y en particular cualquier tipo de recipiente o de tubo. En un modo de realización preferido, el contenedor es un tubo, una placa multipocillos o una regleta que comprende una multitud de pocillos/tubos.

El contenedor utilizado en los estuches y en los procedimientos de la presente invención se presenta por lo tanto en forma de un tubo o de un soporte que comprende por lo menos un pocillo en el fondo del cual se deposita un residuo seco coloreado que comprende el indicador coloreado de pH y el microorganismo control.

En unos modos de realización ventajosos de la invención, dicho contenedor comprende, en el estado seco, dicho microorganismo control que incluye un ácido nucleico control, un indicador pH y un agente de conservación. Este agente de conservación permite mantener y preservar la integridad del microorganismo en el estado seco cuando resulte necesario. El agente de conservación se selecciona de entre: la fructosa, la glucosa, la manosa, el almidón, la trehalosa, la galactosa y la sacarosa. Preferentemente, se pueden utilizar la glucosa y la trehalosa a una concentración que va de 0,1 a 5M.

En los estuches de diagnóstico y los procedimientos según la invención, el microorganismo control puede ser cualquier microorganismo que contiene un ácido nucleico control. En unos modos de realización preferidos, el microorganismo control es un microorganismo Gram negativo.

En los procedimientos según la invención, se liberan los ácidos nucleicos del microorganismo control y después se amplifica el ácido nucleico control. Este microorganismo control permite así disponer de un control positivo exógeno al mismo tiempo para la etapa de extracción de los ácidos nucleicos y para la etapa de amplificación. Este control permite verificar el buen desarrollo al mismo tiempo de la extracción y de la amplificación. Este control permite

- 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65
- excluir una inhibición parcial o total de la amplificación que podría ser por ejemplo provocada por la muestra en sí misma, por una degradación de los ácidos nucleicos o por la omisión de una etapa esencial del procedimiento. El microorganismo control permite así una validación del buen desarrollo del conjunto de las etapas de reacción. En los estuches de diagnóstico y los procedimientos de la presente invención, el ácido nucleico control puede ser cualquier ácido nucleico contenido en el microorganismo control que puede ser amplificado. Puede tratarse de una secuencia naturalmente presente en el microorganismo control o de una secuencia heteróloga introducida por transformación. En unos modos de realización preferidos, el microorganismo control es una cepa de *E. coli* y el ácido nucleico control es una secuencia de fago lambda. Preferentemente, el microorganismo control se inactiva mediante cualquier método apropiado para impedir su crecimiento durante la realización del ensayo.
- La adición de un indicador coloreado de pH permite al mismo tiempo visualizar mejor los líquidos manipulados y validar las adiciones y mezclas sucesivas de líquidos de reacción mediante el o los cambio(s) del indicador coloreado.
- La combinación del microorganismo control y del indicador coloreado de pH permite validar visualmente (por cambio de color de las mezclas de reacción) y por biología molecular, el buen funcionamiento de la etapa de extracción de los ácidos nucleicos de la muestra tratada y de su análisis por PCR para la búsqueda de un microorganismo diana.
- Por "indicador coloreado de pH" se entiende un compuesto químico que tiene la capacidad de cambiar de color en función del pH. La zona de cambio se remite al campo de valor de pH en el que el indicador de pH cambia de color. En los procedimientos y los estuches de diagnóstico de la presente invención, el indicador coloreado de pH, el reactivo de extracción y el reactivo de amplificación se seleccionan de tal manera que el indicador de pH posea por lo menos una zona de cambio a un pH comprendido entre el pH del reactivo de extracción y el pH del reactivo de amplificación.
- En los estuches y en los procedimientos según la invención, el pH del reactivo de extracción es preferentemente inferior a 3, 4, 5, 6 o 7.
- En los estuches y en los procedimientos de la presente invención, el pH del reactivo de amplificación es el pH de los tampones utilizados habitualmente en las reacciones enzimáticas de amplificación de ácidos nucleicos con unas ADN polimerasas termoestables tal como por ejemplo la Taq polimerasa. El pH del reactivo de amplificación está comprendido por ejemplo entre 7 y 10 y comprendido preferentemente entre 7,5 y 9. Preferentemente, el pH del reactivo de amplificación es superior a 7, 7,5, 8 o 9.
- Cualquier indicador coloreado de pH que posee una zona de cambio en un campo de pH apropiado puede ser utilizado en los estuches y en los procedimientos de la presente invención. El indicador de pH seleccionado debe permanecer estable en los cambios bruscos de temperaturas y a las temperaturas elevadas utilizadas habitualmente en las reacciones de amplificaciones de ácidos nucleicos. Por otro lado, el indicador coloreado seleccionado no debe interferir ni con la reacción enzimática de amplificación ni con los fluoróforos utilizados para la detección de los productos de amplificación, en particular en las técnicas de PCR cuantitativa.
- Preferentemente, el indicador coloreado de pH es no tóxico y presenta unos colores puros o vivos fácilmente identificables por el operario.
- Preferentemente, el indicador coloreado de pH se selecciona de entre el azul de bromofenol, el rojo de congo, el verde de bromocresol, el rojo de metilo, el azul de bromotimol, el rojo de fenol, el rojo de cresol, el púrpura de m-cresol, el rojo de fenol, el rojo neutro, el azul de timol y el púrpura de bromocresol.
- Más preferentemente, el indicador coloreado de pH se selecciona de entre el rojo cresol y el azul de timol.
- En los estuches de diagnósticos y en los procedimientos de la presente invención, el indicador coloreado de pH preferido es el rojo de cresol (orto-cresolsulfonaftaleína). Los colores del rojo cresol son el rojo y el amarillo. Este indicador posee una zona de cambio a un pH comprendido entre pH 7,2 y pH 8,8 (cambio de amarillo a rojo).
- Dos cambios de color del rojo cresol son visibles para el operario durante las diferentes etapas del procedimiento. El residuo que comprende el microorganismo control y el rojo de cresol tiene un color rojo. La solución cambia al amarillo con la adición del tampón de extracción o de lisis cuyo pH es inferior a 7,2. Después de la lisis, se mezcla una alícuota de la mezcla de extracción con un reactivo de amplificación. El rojo de cresol recupera entonces su color rojo y el operario observa una coloración rosada de la mezcla de amplificación.
- La concentración en indicador coloreado de pH en los diferentes líquidos/mezclas de reacción utilizados en los estuches de diagnóstico y los procedimientos de la presente invención está comprendida entre 0,1 mg/ml y 50 mg/ml y preferentemente entre 5 mg/ml y 20 mg/ml.
- Cuando se añade el reactivo de extracción (y llegado el caso la muestra) al residuo seco que comprende el indicador coloreado y el microorganismo control, resulta, después de la agitación, una mezcla de extracción que tiene el color

de la forma ácida del indicador. En efecto, el reactivo de extracción tiene típicamente un pH ácido. Este reactivo de extracción comprende los compuestos necesarios para la extracción o para la liberación de los ácidos nucleicos presentes en la mezcla de extracción, es decir los ácidos nucleicos del microorganismo control (y llegado el caso los ácidos nucleicos de la muestra que comprende eventualmente el microorganismo diana). Estos ácidos nucleicos pueden ser ADN o ARN, preferentemente se trata de ADN.

Esta primera etapa puede ir acompañada ya de un cambio de color del indicador.

En unos modos de realización particulares de la invención, el reactivo de extracción es típicamente una solución acuosa que comprende una proteinasa o una mezcla de proteinasas, así como unos detergentes tales como por ejemplo SDS o Triton X100.

Después de la adición del reactivo de extracción, se trata la mezcla de extracción resultante con el fin de extraer o liberar los ácidos nucleicos presentes en esta mezcla. Esta etapa corresponde también a una etapa de lisis de los microorganismos y eventualmente de digestión de las proteínas que podrían inhibir la reacción de amplificación. Este tratamiento comprende preferentemente una extracción térmica. Preferentemente, este tratamiento comprende así una incubación a una temperatura propicia para la actividad de las proteinasas tal como 65°C durante por lo menos 5, 10, 15 o 20 minutos. Después, las proteinasas se inactivan mediante un calentamiento a 95°C durante por lo menos 5 minutos.

Después de este tratamiento, la totalidad o por lo menos una alícuota de la mezcla de extracción tratada se mezcla con un reactivo de amplificación. Este reactivo de amplificación comprende todos los constituyentes necesarios para la amplificación del ácido nucleico control (y llegado el caso del ácido nucleico específico del microorganismo diana). Este reactivo de amplificación puede así comprender una ADN polimerasa termoestable de tipo Taq polimerasa así como unos nucleótidos (dNTPs), un tampón y unos cebadores apropiados. Para unos métodos basados en las técnicas de PCR en tiempo real, el reactivo de amplificación puede comprender además unas sondas marcadas. La mezcla de amplificación obtenida después de la mezcla o de la agitación toma el color de la forma básica del indicador pH. Así, cuando tiene lugar la adición de una alícuota de la mezcla de extracción tratada con el reactivo de amplificación, el indicador coloreado de pH cambia de color, lo cual permite que el operario verifique el buen desarrollo de esta etapa.

Cualquier método de amplificación de ácidos nucleicos y más particularmente de ADN puede ser utilizado en los procedimientos y los estuches de diagnóstico de la presente invención. Estos métodos de amplificación son preferentemente unos métodos de tipo PCR o unos métodos derivados de la PCR. Más preferentemente, la amplificación se realiza mediante unos métodos de PCR en los que la detección de los productos de amplificación utiliza unos fluoróforos.

La invención se refiere también a unos estuches de diagnóstico para detectar un microorganismo diana en una muestra que comprende un primer contenedor que comprende, en el estado seco, un indicador coloreado de pH, un microorganismo control que incluye un ácido nucleico control, y por lo menos un segundo contenedor que comprende un reactivo para la amplificación de ácidos nucleicos que comprenden un reactivo para la amplificación de ácidos nucleicos seleccionado de entre un tampón de amplificación, unos dNTPs y una ADN polimerasa.

Preferentemente, los estuches según la presente invención comprenden un tercer contenedor que comprende un reactivo de extracción que comprende una proteinasa. Este reactivo comprende preferentemente también un detergente seleccionado de entre el SDS y el Triton X100.

De manera ventajosa, los estuches de diagnóstico según la invención comprenden también unos cebadores que permiten amplificar el ácido nucleico control así como, llegado del caso, unos cebadores que permiten amplificar un ácido nucleico específico del microorganismo a ensayar.

La coloración obtenida no perturba la reacción PCR tanto desde el punto de vista enzimático (PCR, PCR cuantitativa) como desde el punto de vista de lectura de fluorescencia. La reacción de PCR permite amplificar la diana y el control exógeno o bien en un mismo contenedor (reacción PCR multiplex) o de forma separada (PCR simplex).

La presencia de amplificación del control exógeno permite validar el buen funcionamiento de la reacción de PCR.

Los procedimientos según la presente invención se ilustran mediante la figura 1 cuando el indicador es el rojo de cresol. En la primera etapa, el residuo que comprende el control exógeno secado con el carbohidrato y el indicador de pH presenta una coloración rojo oscuro. Se añade al residuo, de 1 a 500 µl de muestra (muestra de un cultivo bacteriano) y el tampón de lisis de 5 a 1 ml. El control exógeno resuspendido se encuentra entonces en una mezcla a pH ácido que provoca un cambio de color del indicador de pH (color amarillo). El lisado obtenido en la etapa 2 se añade a una mezcla de reacción de PCR (denominada mix PCR). La mix PCR presenta un pH básico que provoca un cambio de color (paso del amarillo al color rojo) del indicador de pH.

Figuras

Figura 1: Esquema del procedimiento que comprende la extracción y la amplificación

5 Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación del control exógeno de extracción

10 El control exógeno de extracción puede ser fabricado de la siguiente manera. La naturaleza del control exógeno puede ser de origen procariota (*Escherichia coli*, *Bacillus*, etc.) o eucariota. El objetivo es transformar un microorganismo no patógeno con un fragmento de ADN de secuencia quimérica o identificada (fago lambda por ejemplo).

15 Una secuencia de fago lambda (de 100 pb a 3000 pb) puede ser amplificada por una ADN polimerasa poliA (por ejemplo HotGold Star, Eurogentec) con una mezcla de reacción siguiente: Tampón PCR 1X, MgCl₂ 2mM, dNTPs 0,2 mM, cebadores sentido EPC1 y antisentido EPC2 0,2 μM cada uno, Taq polimerasa 0,2 u/reacción, ADN de fago 2 μl/reacción. El programa térmico de amplificación puede ser de 10 minutos a 95°C y después de 40 ciclos de 30 s a 95°C - 30 s a 55°C - 30 s a 3 minutos a 72°C y por último 7 minutos a 72°C. El fragmento amplificado presenta unas extensiones poliA para los extremos 5' y 3'.

20 El fragmento así obtenido puede estar incluido en un vector de tipo plasmídico (PGEM T) gracias a una enzima de tipo ligasa (T4 DNA Ligase, Promega). Se puede realizar la mezcla siguiente: Tampón de ligación 1X, vector 1 μl/r, producto de PCR 1 μl/r, T4 ADN Ligasa 1 u/r, agua csp 10 μl). Se necesita una incubación de la mezcla a 4°C durante 8h-10h.

25 Un microorganismo competente (*E. coli* EC219) puede ser transformado por el vector que comprende la secuencia de interés. Esta transformación se puede realizar por choque térmico, por ejemplo 1 minuto a 42°C y después 5 minutos en hielo. La selección de los clones se realiza por un aislamiento en una gelosa nutritiva LB (Lennox Broth por ejemplo) más ampicilina (100 μg/ml). Las células transformadas se cultivan en medio líquido LB + ampicilina (100 μg/ml) a 37°C durante 16-24 horas. Una estimación del *quorum* celular puede ser estimada mediante la medición de la densidad óptica a 600 nm y por numeración sobre medio gelosado (LB + ampicilina).

35 Se realiza una desactivación de los clones para impedir cualquier crecimiento por cultivo en caldo LB + ampicilina (100 μg/ml) + etanol (10% a 35%) a 37°C durante 3 a 6 horas.

La suspensión de células inactivadas se diluye en agua fisiológica (o caldo tripton sal) de manera que se calibre el número de células utilizadas. La dilución obtenida (de 10⁻¹ a 10⁻⁹) se completa a igualdad de volumen con una solución de carbohidrato (1M a 5M) que contiene un indicador coloreado (rojo de cresol) a 0,1-15 mg/ml.

40 La mezcla se deposita en un soporte de extracción (placa de 96 pocillos, tubo individual, etc.) a razón de 1 μl a 20 μl por pocillo. Se realiza un secado a 37°C-70°C durante 30 minutos a 5 horas. Un residuo coloreado atestigua la presencia del control.

Ejemplo 2: Análisis de un cultivo bacteriano por PCR

45 Un cultivo bacteriano puede ser analizado por PCR según el método detallado a continuación.

50 Se añaden diez microlitros a 90 μl de tampón de lisis (por ejemplo: 1-100 mg de Pronasa o proteinasa K, detergentes SDS o Triton 0,1% a 10%, PVP 1% a 30%) y se depositan en el soporte de extracción que contiene el control secado. Después de la agitación, el residuo se disuelve y provoca una coloración de la mezcla (amarillo) debida a las propiedades del pH ácido (1-6,9). La extracción térmica se puede realizar por una incubación de la mezcla a 65°C durante 20 minutos y después a 95°C durante 5 minutos.

55 La coloración no se altera por los choques térmicos. El lisado así obtenido se añade a razón de 10 a 20 μl a una mix PCR (15-50 μl). El pH básico (7,1-9) de la mix PCR provoca un cambio de color de la mezcla de reacción que atestigua así la adición de la muestra.

60 La coloración de la mezcla de reacción PCR no perturba la reacción PCR tanto a nivel de su eficacia así como de la lectura de fluorescencia.

Listado de secuencias

65 <110> AES CHEMUNEX
BERTRAND, Emmanuel
BLANCHARD, Béatrice

ES 2 559 037 T3

<120> Estuche de diagnóstico y procedimiento para detectar un microorganismo en una muestra que comprende un control exógeno coloreado

5 <130> D28525

<150> FR 1053462
<151> 2010-05-04

10 <160> 2

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 24

15 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sentido EPC1

20 <400> 1

aaaagtgaga ggcacctgtc agat 24

25 <210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> Cebador antisentido EPC2

<400> 2

35 atactgctcc tccccgcaat 20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para detectar un microorganismo diana en una muestra mediante la extracción de los ácidos nucleicos de dicho microorganismo diana seguida de la amplificación de un ácido nucleico específico de dicho microorganismo diana en el que el desarrollo de la extracción y de la amplificación son validados por la realización concomitante de las etapas siguientes:
- 10 a. puesta a disposición de un contenedor que comprende, en el estado seco, un indicador coloreado de pH y un microorganismo control que incluye un ácido nucleico control,
- 15 b. adición, en el estado líquido, de la muestra y de un reactivo de extracción que tiene un pH inferior a 7 y obtención de una mezcla de reacción de extracción que tiene el color de la forma ácida del indicador coloreado de pH,
- 20 c. tratamiento de la mezcla de reacción de extracción para liberar los ácidos nucleicos presentes en dicha mezcla de reacción de extracción,
- d. mezcla de una alícuota de dicha mezcla de reacción de extracción tratada con un reactivo de amplificación que tiene un pH superior a 7 y obtención de una mezcla de reacción de amplificación que tiene el color de la forma básica del indicador de pH,
- e. amplificación del ácido nucleico control.
- 25 en el que la extracción de los ácidos nucleicos de dicho microorganismo diana seguida de la amplificación de un ácido nucleico específico de dicho microorganismo diana se realiza en el o en los mismos contenedores que la extracción de los ácidos nucleicos del microorganismo control y la amplificación del ácido nucleico control.
- 30 2. Procedimiento para detectar un microorganismo diana en una muestra según la reivindicación 1, en el que dicho contenedor comprende, en el estado seco, dicho indicador coloreado de pH, un microorganismo control que incluye un ácido nucleico control y un agente de conservación seleccionado de entre la fructosa, la glucosa, la manosa, el almidón, la trehalosa, la galactosa y la sacarosa.
- 35 3. Procedimiento para detectar un microorganismo diana en una muestra según una de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el microorganismo control es un microorganismo Gram negativo.
- 40 4. Procedimiento para detectar un microorganismo diana en una muestra según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el indicador coloreado de pH tiene por lo menos una zona de cambio a un pH comprendido entre el pH del reactivo de extracción y el pH del reactivo de amplificación.
- 45 5. Procedimiento para detectar un microorganismo diana en una muestra según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el indicador coloreado de pH se selecciona de entre el rojo cresol y el azul de bromotimol.
6. Procedimiento para detectar un microorganismo diana en una muestra según una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la amplificación del ácido nucleico control y, llegado el caso del ácido nucleico específico del microorganismo diana se efectúa por un método de PCR cuantitativa que utiliza unos fluoróforos.
- 50 7. Estuche de diagnóstico para detectar un microorganismo diana en una muestra que comprende un primer contenedor que comprende, en el estado seco, un indicador coloreado de pH, un microorganismo control que incluye un ácido nucleico control, unos cebadores para la amplificación de un ácido nucleico específico de dicho microorganismo diana, y por lo menos un segundo contenedor que comprende un reactivo para la amplificación de ácidos nucleicos que comprenden una ADN polimerasa.
- 55 8. Estuche de diagnóstico para detectar un microorganismo diana en una muestra según la reivindicación 7, que comprende además un reactivo de extracción que comprende una proteinasa.
9. Estuche de diagnóstico para detectar un microorganismo diana en una muestra según una de las reivindicaciones 7 a 8, en el que el indicador coloreado de pH se selecciona de entre el rojo de cresol y el azul de bromofenol.
- 60 10. Estuche de diagnóstico para detectar un microorganismo diana en una muestra según una de las reivindicaciones 7 a 9, que comprende además unos cebadores para la amplificación del ácido nucleico control.

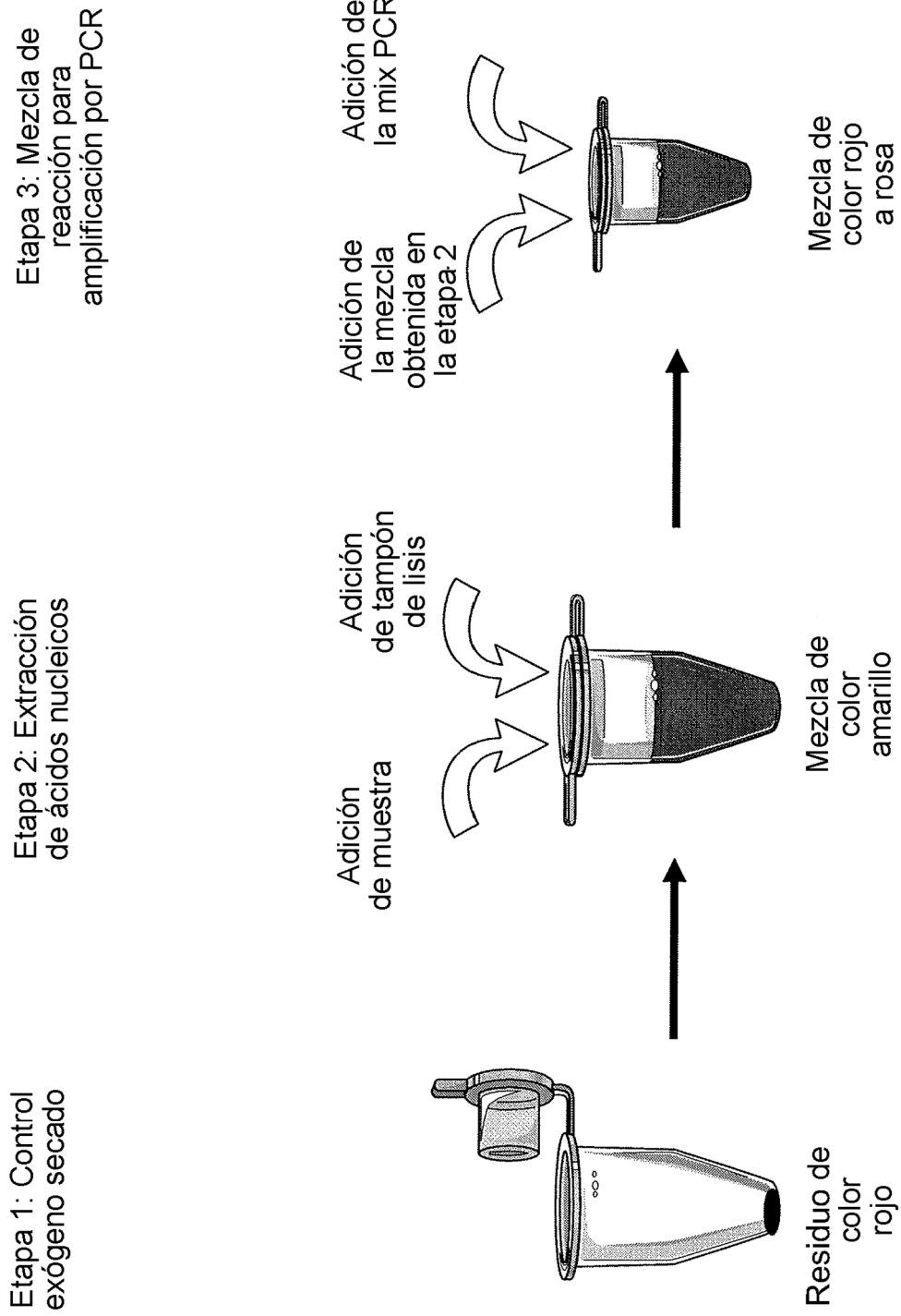


Figura 1