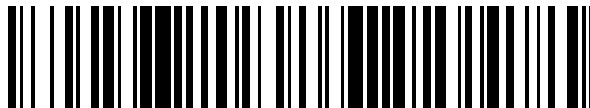


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 405**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.04.2010 E 10714461 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016 EP 2419524**

54 Título: **Detección de bacterias y hongos**

30 Prioridad:

17.04.2009 GB 0906643
07.05.2009 GB 0907785

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.06.2016

73 Titular/es:

MOMENTUM BIOSCIENCE LIMITED (100.0%)
Unit 19 Willowbrook Technology Park Llandogo
Road
St. Mellons Cardiff, Wales CF 3 0EF, GB

72 Inventor/es:

WILSON, STUART y
MULLEN, WILLIAM

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 573 405 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 de bacterias y hongos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de detectar microorganismos, en particular distinguir entre infección por bacterias u hongos y levaduras. Los métodos de la invención son altamente sensibles y tienen numerosas aplicaciones. Se describen métodos y kits que dependen de novedosos indicadores de viabilidad de microorganismos.

Antecedentes de la invención

Existe una necesidad de detección rápida de bacterias y hongos en muestras clínicas y existe un requisito de distinguir entre una infección bacteriana y una fúngica. Pueden usarse estrategias de cultivo, pero dichas técnicas requieren varios días para completarse, especialmente cuando se intenta detectar pequeñas cantidades de bacterias y también cuando se detectan microorganismos de crecimiento más lento.

Pueden llevarse a cabo ensayos basándose en medir la presencia de una molécula que puede estar vinculada con la presencia en la muestra de una célula bacteriana o fúngica. La molécula detectada de la forma más habitual es Adenosina Trifosfato (ATP). También se ha propuesto la detección de ADN y ARN, aunque la correlación entre la presencia de ADN y ARN y la viabilidad no está bien definida debido a la variable persistencia de ácidos nucleicos en muestras después de la muerte del microorganismo (Keer & Birch, Journal of Microbiological Methods 53 (2003) 175-183). También se ha propuesto la detección de adenilato quinasa como indicador de viabilidad (Squirrell DJ, Murphy MJ, Leslie RL, Green JCD: A comparison of ATP and adenylate kinase as bacterial cell markers: correlation with agar plate counts. En Bioluminescence and chemiluminescence progress and current applications. Editado por: Stanley RA, Kricka LJ. John Wiley and Sons; 2002 y el documento WO 96/02665).

Un método empleado de forma rutinaria para determinar niveles de ATP implica el uso de bioluminiscencia. El método usa la dependencia de ATP de la reacción en la que luciferasa emisora de luz cataliza la oxidación de luciferina. El método puede usarse para medir concentraciones relativamente bajas de ATP. Kits útiles para detectar ATP usando bioluminiscencia están disponibles en el mercado de Roche, New Horizons Diagnostics Corp, Celsis, etc.

Las ligasas son enzimas que catalizan el ligamiento de moléculas de ácido nucleico. La reacción de ligamiento requiere ATP o NAD+ como cofactor dependiendo de la ligasa involucrada. El documento WO 2009/007719 describe el uso de NAD ligasas para detectar bacterias viables.

Sumario de la invención

La presente invención describe un procedimiento para detectar microorganismos que expresan ligasa, tales como hongos (y bacterias) en una muestra, tal como un espécimen o muestra de mamífero que contiene células de mamífero, midiendo la ligasa (dependiente de ATP y/o dependiente de NAD) presente en la muestra después de la lisis de cualesquiera células fúngicas presentes, normalmente después de una etapa de reducción de fondo para eliminar actividad ligasa dependiente de ATP de mamífero. La invención también describe un procedimiento para distinguir entre células fúngicas y bacterianas midiendo tanto el contenido de ligasa dependiente de NAD en una muestra como el contenido de ligasa dependiente de ATP. Si solamente está presente ligasa dependiente de ATP, entonces solamente están presentes células fúngicas, si ambas actividades enzimáticas están presentes, entonces una población mixta de células bacterianas/fúngicas están presentes. Si solamente está presente actividad de ligasa dependiente de NAD, la muestra contiene células bacterianas solamente.

En un primer aspecto, la invención proporciona un método de detección de un microorganismo que expresa ligasa en una muestra, que comprende:

- (a) tratar la muestra en condiciones que inhiben la actividad de ligasa dependiente de ATP procedente de células de mamífero pero que no inhiben la actividad de las ligasas microbianas,
- (b) poner en contacto la muestra o una parte de la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para actividad de ligasa en la muestra,
- (c) incubar la muestra puesta en contacto de este modo en condiciones adecuadas para actividad de ligasa; y
- (d) determinar específicamente la presencia y/o la cantidad de una molécula de ácido nucleico ligada que resulta de la acción de la ligasa sobre la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la presencia del microorganismo que expresa ligasa.

En ciertas realizaciones, el microorganismo que expresa ligasa comprende células fúngicas o bacterianas o ambas. La ligasa expresada por el microorganismo puede comprender, por lo tanto, una ligasa dependiente de ATP, una ligasa dependiente de NAD o ambas, dependiendo de los tipos celulares presentes en la muestra. La presencia de

actividad de ligasa dependiente de NAD en la muestra indica la presencia de células bacterianas (en particular células eubacterianas). El empleo de condiciones adecuadas en la muestra, o una parte de la misma, puede permitir que la actividad de ligasa dependiente de NAD y de ATP se determine, respectivamente, tal como se describe en el presente documento.

5 La invención también proporciona un método de detección de un microorganismo que expresa ligasa dependiente de ATP en una muestra, que comprende:

- 10 (a) poner en contacto la muestra o una parte de la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para actividad de ligasa dependiente de ATP en la muestra,
- (b) incubar la muestra puesta en contacto de este modo en condiciones adecuadas para actividad de ligasa dependiente de ATP; y
- 15 (c) determinar específicamente la presencia y/o la cantidad de una molécula de ácido nucleico ligada que resulta de la acción de la ligasa dependiente de ATP sobre la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la presencia del microorganismo que expresa ligasa dependiente de ATP.

En realizaciones específicas, el microorganismo que expresa ligasa dependiente de ATP comprende células fúngicas o bacterianas o ambas. Los métodos también comprenden, ante de la etapa

- 20 (a), tratar la muestra en condiciones que inhiben la actividad de ligasa dependiente de ATP procedente de células de mamífero pero que no inhiben la actividad de las ligasas dependientes de ATP microbianas. Condiciones adecuadas se describen en detalle en el presente documento. Estos métodos comprenden adicionalmente:
- 25 (d) poner en contacto la muestra o una parte de la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para actividad de ligasa dependiente de NAD en la muestra,
- (e) incubar la muestra puesta en contacto de este modo en condiciones adecuadas para actividad de ligasa dependiente de NAD; y
- 30 (f) determinar específicamente la presencia (y/o la cantidad) de una molécula de ácido nucleico ligada que resulta de la acción de la ligasa dependiente de NAD sobre la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la presencia de células bacterianas en la muestra.

En dichos métodos, la presencia de actividad de ligasa dependiente de ATP y la ausencia de actividad de ligasa dependiente de NAD en la muestra indica que la muestra contiene células fúngicas o un microorganismo no bacteriano. En ciertas realizaciones, por ejemplo cuando no es necesaria discriminación entre células bacterianas o fúngicas en la muestra, puede usarse la misma molécula de ácido nucleico como sustrato tanto para actividad de ligasa dependiente de NAD como para actividad de ligasa dependiente de ATP.

Por consiguiente, la invención proporciona un método de detección de células fúngicas o bacterianas o ambas, que comprende:

- 40 (a) poner en contacto la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para actividad de ligasa dependiente de ATP en la muestra,
- (b) incubar la muestra puesta en contacto de este modo en condiciones adecuadas para actividad de ligasa dependiente de ATP; y
- 45 (c) determinar específicamente la presencia (y/o la cantidad) de una molécula de ácido nucleico ligada que resulta de la acción de la ligasa dependiente de ATP sobre la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la presencia de hongos y/o bacterias
- (d) poner en contacto la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para actividad de ligasa dependiente de NAD en la muestra, que puede ser la misma molécula de ácido nucleico que se usa como sustrato para ATP ligasa
- 50 (e) incubar la muestra puesta en contacto de este modo en condiciones adecuadas para actividad de ligasa dependiente de NAD; y
- (f) determinar específicamente la presencia (y/o la cantidad) de una molécula de ácido nucleico ligada que resulta de la acción de la ligasa dependiente de NAD sobre la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la presencia de bacterias solamente.
- 55

La invención también proporciona un método de distinguir células fúngicas de células bacterianas presentes en una muestra con inhibición del fondo de mamífero de ligasa dependiente de ATP antes de la lisis de las células fúngicas y bacterianas y detectar la ligasa dependiente de ATP fúngica liberada o la ligasa dependiente de NAD bacteriana liberada.

Por consiguiente, en un aspecto adicional, la invención proporciona un método de detección de células fúngicas o bacterianas o ambas, que comprende:

- 65 (a) tratar la muestra en condiciones que inhiben la señal de fondo de mamífero de ligasa dependiente de ATP pero que no afectan a las ligasas dependientes de NAD microbianas y dependientes de ATP fúngicas

- (b) lisar la muestra para liberar las ligasas dependientes de NAD bacterianas y dependientes de ATP fúngicas
 (c) poner en contacto la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para actividad de ligasa dependiente de ATP en la muestra,
 5 (d) incubar la muestra puesta en contacto de este modo en condiciones adecuadas para actividad de ligasa dependiente de ATP; y
 (e) determinar específicamente la presencia (y/o la cantidad) de una molécula de ácido nucleico ligada que resulta de la acción de la ligasa dependiente de ATP sobre la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la presencia de hongos y/o bacterias
 10 (f) poner en contacto la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para actividad de ligasa dependiente de NAD en la muestra,
 (g) incubar la muestra puesta en contacto de este modo en condiciones adecuadas para actividad de ligasa dependiente de NAD; y
 15 (h) determinar específicamente la presencia (y/o la cantidad) de una molécula de ácido nucleico ligada que resulta de la acción de la ligasa dependiente de NAD sobre la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la presencia de bacterias solamente.

Se define que una "muestra" en el contexto de la presente invención incluye cualquier muestra en la que es deseable ensayar la presencia de bacterias que expresan una ligasa dependiente de NAD u hongos que expresan una ligasa dependiente de ATP o ambos. Por lo tanto, la muestra es, generalmente, una muestra de la que se sospecha que contiene, o que en algunas circunstancias se sabe que contiene, un microorganismo. La detección de actividad de ligasa en la muestra se considera indicativa de la presencia del microorganismo. La muestra es, generalmente, una que puede contener células de mamífero, que también expresan actividad ligasa. Sin embargo, los métodos de la invención permiten que la actividad de ligasa en la muestra que resulta de la presencia de células de mamífero se elimine selectivamente (a través de inactivación) antes de la detección de actividad de ligasa microbiana. La etapa de eliminar cualquier actividad de ligasa dependiente de ATP de células de mamífero puede no ser necesaria en muestras donde se sabe que no hay células de mamífero presentes. Éste puede ser el caso, por ejemplo, donde se investiga actividad de ligasa dependiente de NAD frente a de ATP para determinar si células fúngicas y/o bacterianas están presentes en la muestra.

Por lo tanto, la muestra puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en una muestra clínica, o un sistema de ensayo *in vitro* por ejemplo. Las muestras pueden comprender, consistir esencialmente en o consistir en muestras de bebidas o alimentos o preparaciones de las mismas, o productos farmacéuticos o cosméticos, tales como productos para el cuidado personal que incluyen champús, acondicionadores, hidratantes, etc., en todos los cuales se ensaya la contaminación microbiana de forma rutinaria. La muestra puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en tejido o células y puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en un esputo o una muestra de sangre o una muestra de plaquetas, por ejemplo.

Por "ligasa dependiente de ATP" se entiende una ATP ligasa que depende del cofactor adenosina trifosfato (ATP) para la actividad. La actividad de la ligasa dependiente de ATP es la formación de un enlace fosfodiéster entre el extremo 5' de una molécula de ácido nucleico y el extremo 3' de una molécula de ácido nucleico. Por "ligasa dependiente de NAD" se entiende una ADN ligasa que depende del cofactor nicotinamida adenina dinucleótico (NAD+) para actividad. Las ligasas dependientes de NAD pueden distinguirse de las ligasas dependientes de ATP que dependen del cofactor ATP para actividad. La actividad de la ligasa dependiente de NAD es la formación de un enlace fosfodiéster entre el extremo 5' de una molécula de ácido nucleico y el extremo 3' de una molécula de ácido nucleico.

Los métodos de la presente invención proporcionan ventajas técnicas significativas, debido en gran parte al hecho de que se genera una molécula de ácido nucleico novedosa como parte del método. En los métodos de la presente invención, una molécula de ácido nucleico que no reaccionó no contribuirá a la señal y, como resultado, no deben producirse señales falsas positivas cuando se llevan a cabo los métodos.

Además, el método es altamente sensible proporcionando la detección de las ligasas dependientes de ATP y de NAD presentes en la muestra hasta niveles de femtogramo y posiblemente incluso attogramo. La sensibilidad se deriva del hecho de que cada célula bacteriana o fúngica contiene miles de moléculas enzimáticas y, por lo tanto, cada una puede catalizar múltiples acontecimientos de ligamiento en condiciones adecuadas. Cada célula bacteriana y fúngica debe producir actividad ligasa para reparar el daño genómico continuo y esta actividad esencial contribuye a su utilidad como marcador para la presencia de células microbianas viables. Por lo tanto, a diferencia de estrategias de PCR, que deben dirigirse a una o unas pocas copias de un gen por célula o usar etapas o reactivos adicionales para detectar ARN ribosómico o mensajero, la estrategia descrita en el presente documento se dirige a la detección de múltiples copias de la ligasa dependiente de ATP y de NAD por células en un formato de ensayo sencillo. La sensibilidad se potencia adicionalmente en comparación con otras estrategias, ya que cada copia de la ligasa es capaz de modificar múltiples (cientos o miles) moléculas de ácido nucleico sustrato que pueden, cada una, ser detectadas.

Dependiendo del tipo de muestra que puede contener ligasas dependientes de ATP del anfitrión, estas ligasas del anfitrión se inactivan pretratando la muestra de tal manera que las ligasas del anfitrión se inactiven pero las ligasas

- fúngicas o bacterianas permanezcan activas. La estrategia descrita en el presente documento puede, en ciertas realizaciones, depender de la diferencia de estructura de células de mamífero y células bacterianas o fúngicas. Se describen condiciones que lisan o permeabilizan la membrana celular de mamífero pero, por cortesía de las paredes celulares fúngicas y bacterianas, dejan las membranas fúngicas y bacterianas intactas. Una vez que las ligasas son liberadas de las células de mamífero, son expuestas a condiciones que inactivan adicionalmente estas ligasas liberadas. Las condiciones usadas para la lisis de las membranas de mamífero incluyen el uso de detergentes que pueden o no usarse junto con pH elevado o bajo. Las condiciones usadas para la inactivación de ligasas liberadas incluyen el uso de pH elevado.
- Por lo tanto, en ciertas realizaciones los métodos de la invención comprenden el tratamiento de la muestra con un agente que permeabiliza la membrana celular de células de mamífero en la muestra. El agente preferentemente no penetra significativamente en la pared celular de ningún microorganismo en la muestra. El agente puede ser un detergente, del cual muchos ejemplos adecuados se conocen en la técnica y están disponibles en el mercado. Un ejemplo específico que ha mostrado ser eficaz en el presente documento es el tensioactivo/detergente Triton X-100.
- Tal como se ha indicado anteriormente, las condiciones que inhiben la actividad de ligasa dependiente de ATP procedente de células de mamífero pero que no inhiben la actividad de las ligasas microbianas pueden comprender pH elevado. El pH elevado es generalmente un pH de al menos aproximadamente 10, tal como aproximadamente 10, 11, 12, 13 o 14. El pH bajo es generalmente un pH de menos de o igual a aproximadamente 4, tal como aproximadamente 4, 3, 2 o 1. Alterar el pH de la muestra puede conseguirse usando cualquier medio adecuado, como sería apreciado fácilmente por un experto en la materia. En el presente documento se muestra que las ligasas microbianas son sorprendentemente resistentes a extremos de pH, mientras que las ligasas de mamífero se inactivan en las mismas condiciones de pH. Esto permite la detección selectiva de ligasas microbianas en una muestra que contiene tanto células de mamífero como células microbianas. En realizaciones específicas, las condiciones que inhiben la actividad de ligasa dependiente de ATP procedentes de células de mamífero pero que no inhiben la actividad de las ligasas microbianas comprenden tratar la muestra con hidróxido sódico (NaOH) o carbonato sódico (Na₂CO₃). Dichos agentes pueden usarse fácilmente, tal como se muestra en el presente documento, para incrementar el pH de la muestra a pH elevado inactivando de este modo la actividad de ligasa de mamífero mientras se deja la actividad de ligasa microbiana (fúngica y bacteriana). Concentraciones y volúmenes adecuados del agente apropiado pueden ser aplicados por un experto en la materia. En ciertas realizaciones, sin embargo, el NaOH es NaOH aproximadamente 5 mM. En realizaciones adicionales, el pH es de aproximadamente 12 para inactivar la actividad de ligasa dependiente de ATP de mamífero (pero no ligasas microbianas). En otras realizaciones adicionales, los tratamientos se llevan a cabo durante aproximadamente 20 minutos. Los agentes adecuados para rebajar el pH a menos de o igual a aproximadamente 4 incluyen ácidos tales como ácido clorhídrico (HCl) y ácido sulfúrico (H₂SO₄).
- En realizaciones específicas, las condiciones de pH pueden incrementarse a al menos aproximadamente 11, o al menos aproximadamente 11,2. Este tratamiento puede dar como resultado la lisis de microorganismos en la muestra y, por lo tanto, causar liberación de ligasa en la muestra. Esto permite la detección de ligasas en la muestra, que se originan a partir del microorganismo, sin necesidad de una etapa de lisis celular independiente. En estas condiciones, las ligasas de mamífero (tales como ligasas dependientes de ATP sanguíneas) se inactivan.
- En otras realizaciones, los métodos de la invención comprenden además lisis de microorganismos (hongos o bacterias) en la muestra para liberar ligasa dependiente de ATP y de NAD. Esta etapa se lleva a cabo preferentemente antes de que la muestra se ponga en contacto con el sustrato de ácido nucleico, aunque esto no es esencial. Por lo tanto, los métodos de la invención pueden comprender además, después de la etapa de tratamiento, lisis de la muestra para liberar la ligasa microbiana. Sin embargo, tal como se muestra en el presente documento, las ligasas microbianas son mucho más resistentes a condiciones de pH elevado que las ligasas de mamífero. Por lo tanto, los métodos de la invención pueden incorporar una etapa de lisis para lisis de todas las células en la muestra, independientemente de su origen (es decir, para incluir células tanto de microorganismos como de mamífero). Después de esta etapa de lisis, las ligasas de mamífero pueden inactivarse selectivamente, por ejemplo usando condiciones de pH elevado, y las ligasas expresadas por cualesquiera microorganismos en la muestra detectarse de acuerdo con los métodos de la invención.
- En realizaciones específicas, la lisis se realiza mecánicamente, aunque la lisis también puede realizarse químicamente. Agentes adecuados para lisis de células bacterianas y fúngicas selectivamente se conocen en la técnica e incluyen reactivos de extracción de proteínas bacterianas tales como B-PER (Pierce) y Y-PER (Pierce), por ejemplo. La mecánica puede conseguirse a través de sonicación o Prensa Francesa o ribolisis (técnica "bead beating") por ejemplo. Sin embargo, la lisis puede no ser esencial en todas las realizaciones de la invención. En particular, incrementar la permeabilidad de la pared y/o membrana celular bacteriana o fúngica puede ser, en ciertas realizaciones, suficiente para permitir la detección de actividad de ligasa dependiente de ATP o de NAD de acuerdo con los métodos de la invención. Agentes y técnicas adecuadas para conseguir este incremento de la permeabilidad son conocidas en la técnica e incluyen condiciones de pH elevado tal como se describe en el presente documento.
- Tal como se ha indicado en el presente documento, una etapa en los métodos de ensayo de ligasa de la invención comprende, consiste esencialmente en o consiste en poner en contacto la muestra con una molécula de ácido

nucleico que actúa como sustrato para actividad ligasa (dependiente de ATP o de NAD) microbiana en la muestra. Cualquier molécula ligable adecuada que pueda detectarse específicamente una vez ligada puede utilizarse en los métodos de la invención.

5 Para despejar dudas, por el presente se afirma que la molécula de ácido nucleico ligada es generalmente una molécula de ácido nucleico detectable novedosa que tiene una estructura global diferente de la de la molécula de ácido nucleico (sustrato) original. Por lo tanto, la molécula de ácido nucleico detectable novedosa puede contener moléculas adicionales, de modo que la molécula de ácido nucleico novedosa pueda identificarse exclusivamente, por ejemplo mediante amplificación utilizando cebadores que pueden unirse solamente a y producir un producto de
10 amplificación usando la molécula de ácido nucleico ligada como plantilla. Sin embargo, puede ser que solamente una cadena se extienda en comparación con la molécula de ácido nucleico sustrato (original), por ejemplo la ligasa puede sellar una muesca en una cadena de una molécula sustrato bicatenaria.

15 Las moléculas de ácido nucleico sustrato para uso en los métodos, y la inclusión en los kits, de la invención, deben ser de secuencia y estructura tales que la ligasa dependiente de ATP o de NAD pueda actuar sobre la molécula como puede ser el caso para producir una molécula de ácido nucleico (novedosa) ligada detectable.

Moléculas de ácido nucleico sustrato adecuadas para uso en la invención comprenden, consisten esencialmente en o consisten en las secuencias de nucleótidos presentadas como SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y SEQ ID NO: 6, 7 y 8
20 respectivamente y descritas en más detalle en la sección experimental a continuación. Se observa que pueden utilizarse variantes de estas secuencias en la presente invención. Por ejemplo, pueden añadirse secuencias flanqueantes adicionales. Las secuencias variantes pueden tener al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia de nucleótidos con las secuencias de nucleótidos del ácido nucleico
25 sustrato. Las moléculas de ácido nucleico pueden incorporar análogos de nucleótidos sintéticos según sea apropiado o pueden basarse en ARN o APN por ejemplo, o mezclas de los mismos. Estas pueden marcarse, tal como usando una marca fluorescente, o par FRET, en ciertas realizaciones para facilitar la detección. En el presente documento se describen métodos de detección adecuados.

30 En el presente documento se define que "ácido nucleico" incluye cualquier ácido nucleico natural y análogos naturales o sintéticos que son capaces de ser ligados por una ligasa dependiente de ATP o de NAD para generar una molécula de ácido nucleico (detectable novedosa) ligada. La reacción de ligamiento puede implicar unión de dos moléculas de ADN o sellar una muesca en una molécula de ácido nucleico para producir una molécula de ácido
35 nucleico ligada detectable, por ejemplo. Las moléculas de ácido nucleico adecuadas pueden estar compuestas por, por ejemplo, ADN bi- o monocatenario y ARN bi- o monocatenario. Las moléculas de ácido nucleico que son parcialmente bicatenarias y parcialmente monocatenarias también se contemplan en ciertas realizaciones de la invención. En ciertas realizaciones, la molécula de ácido nucleico sustrato comprende, consiste esencialmente en o consiste en ADN_{bc}, para incluir ADN_{bc} con muescas. La expresión "ácido nucleico" abarca análogos sintéticos que son capaces de ser ligados mediante ligasa dependiente de ATP o de NAD en una muestra de una manera análoga
40 a ácidos nucleicos naturales, por ejemplo análogos de ácidos nucleicos que incorporan bases no naturales o derivatizadas, o análogos de ácidos nucleicos que tienen una cadena principal modificada. En particular, debe interpretarse que la expresión "ADN bicatenario" o "ADN_{bc}" abarca ADN_{bc} que contiene bases no naturales.

Aunque el sustrato de ácido nucleico puede comprender, consistir esencialmente en o consisten en una molécula de
45 ADN bicatenario de extremo romo, en una realización independiente el sustrato de ácido nucleico para la ligasa dependiente de ATP o de NAD comprende, consiste esencialmente en o consiste en dos moléculas de ADN bicatenario con un saliente complementario y grupos fosfato 5' en los extremos a unir. En una realización específica, el saliente complementario está entre 2 y 10, tales como 3 o 5 pares de bases. En una realización alternativa, el sustrato de ácido nucleico comprende, consiste esencialmente en o consiste en una molécula de ADN parcialmente
50 bicatenaria con una muesca que comprende un fosfato 5'. Moléculas de ácido nucleico sintetizadas están disponibles en el mercado y pueden fabricarse a petición con un grupo fosfato 5' terminal unido. Esto tiene la ventaja técnica de que el 100 % de las moléculas de ácido nucleico usadas en los métodos de la invención estarán marcadas con un grupo fosfato 5'. Además, los sustratos de ácido nucleico pueden estar diseñados para especificación, por ejemplo para incluir moléculas de biotina para posterior captura post-ligamiento si se desea, tal
55 como se describe en el presente documento.

Por lo tanto, en realizaciones de la invención, la molécula de ácido nucleico novedosa que se detecta, se genera mediante ligamiento del extremo 3' de la molécula de ácido nucleico al extremo 5' de una molécula de ácido nucleico
60 adicional. En estas realizaciones, si la ligasa está presente en la muestra, ésta catalizará el ligamiento y se formará una molécula de ácido nucleico ligada (que incorpora una secuencia novedosa global) que puede detectarse mediante un proceso posterior, tal como se detalla en el presente documento (tal como un proceso de amplificación de ácidos nucleicos por ejemplo).

65 Por lo tanto, la molécula de ácido nucleico sustrato puede, de hecho, comprender, consistir esencialmente en o consistir en dos o más moléculas de ácido nucleico, según sea apropiado. Esto se aplica generalmente a los métodos y kits de la invención.

En ciertas realizaciones, el sustrato de ácido nucleico comprende, consiste esencialmente en o consiste en dos moléculas de ácido nucleico bicatenarias con salientes complementarios monocatenarios.

- 5 El extremo 3' de moléculas sustrato de ácido nucleico que no están unidas de forma productiva en términos de producir un producto ligado que es detectado a continuación (que se desea unir), puede estar bloqueado con un grupo de bloqueo adecuado para garantizar que no puedan participar en una reacción de ligamiento. Puede utilizarse cualquier grupo de bloqueo apropiado.
- 10 En realizaciones específicas, la molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para actividad de ligasa dependiente de ATP o de NAD en la muestra comprende, consiste esencialmente en o consiste en una molécula de ácido nucleico bicatenario con muescas. En realizaciones específicas, el sustrato global puede estar compuesto por tres moléculas de ADN monocatenario específicas (ADNmc). Dos o más de las moléculas de ADNmc pueden ser de secuencia idéntica. Una molécula de ADNmc puede hibridar con las otras dos moléculas de ácido nucleico de tal manera que se forme una región bicatenaria que contiene una muesca. La actividad de ligasa dependiente de NAD, si está presente en la muestra, puede sellar la muesca, produciendo de este modo una molécula de ADN bicatenario que puede ser detectada de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.
- 15

- 20 En realizaciones específicas adicionales, la molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para actividad de ligasa dependiente de ATP o de NAD en la muestra comprende, consiste esencialmente en o consiste en dos moléculas de ácido nucleico que pueden ligarse entre sí.

Preferentemente, el sustrato de ácido nucleico está presente en exceso, y en particular en gran exceso molar, respecto a la ligasa en la muestra. Ésta es una importante distinción técnica respecto a métodos de la técnica anterior. Dado que una molécula de ácido nucleico ligada novedosa es detectada, solamente la presencia de esta molécula en la muestra es esencial para que los métodos de detección funcionen eficazmente. Por lo tanto, no es perjudicial para los métodos de la invención que otras moléculas de ácido nucleico estén presentes en la muestra, tal como procedente de las bacterias u hongos a detectar o de fuentes de mamífero que pueden encontrarse en la muestra a ensayar, por ejemplo.

25

Preferentemente, las moléculas de ácido nucleico sustrato están diseñadas de modo que no tengan niveles elevados de homología con el genoma de las una o más bacterias u otros microorganismos que producen la ligasa dependiente de ATP o de NAD que debe detectarse en la muestra. Esto significa que, incluso en presencia de moléculas de ácido nucleico contaminantes, solamente la molécula de ácido nucleico ligada novedosa puede ser detectada. Por lo tanto, el sustrato debe tener niveles suficientemente bajos de identidad de secuencia con el ADN genómico de las bacterias u hongos a detectar para prevenir la amplificación inespecífica de ADN genómico que produce un resultado falso positivo. La secuencia del sustrato puede estar diseñada, por lo tanto, con las bacterias diana en mente. En particular, los cebadores para amplificar específicamente la molécula de ácido nucleico ligada novedosa se diseñan de modo que no produzcan un producto de amplificación a partir del ADN genómico bacteriano. Por ejemplo, el sustrato y los cebadores pueden incorporar moléculas de origen no natural complementarias que pueden emparejar bases entre sí, y permiten la amplificación específica de ADN genómico bacteriano. Como ejemplo, pueden incorporarse pyDAD y puADA en cebadores y moléculas sustrato según sea apropiado (Sismour y col., *Nucleic Acids Research*, 2004, Vol. 32, No. 2: 728-735).

30

35

40

Preferentemente, la homología es menor de aproximadamente el 5 %, menor de aproximadamente el 10 %, menor de aproximadamente el 12,5 %, menor de aproximadamente el 15 %, menor de aproximadamente el 20 %, menor de aproximadamente el 30 %, menor de aproximadamente el 40 %, 50 %, 60 %, 70 % u 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos correspondiente de las una o más bacterias u otros microorganismos que producen la ligasa dependiente de ATP o de NAD que debe detectarse en la muestra. En una realización, no existe ninguna identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos correspondiente de las una o más bacterias u otros microorganismos que producen la ligasa dependiente de ATP o de NAD que debe detectarse en la muestra sobre aproximadamente 10, 20, 30, 40 o 50 nucleótidos contiguos. En otra realización, existe menos de aproximadamente el 10 % o menos de aproximadamente el 12,5 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o 60 % de identidad de secuencia sobre aproximadamente 10, 20, 30, 40 o 50 nucleótidos contiguos con la secuencia de nucleótidos correspondiente de las una o más bacterias u otros microondas que producen la ligasa dependiente de ATP o de NAD que debe detectarse en la muestra.

45

50

55

Una etapa adicional de los métodos de la invención comprende, consiste esencialmente en o consiste en incubar la muestra en condiciones adecuadas para actividad de ligasa dependiente de ATP y/o de NAD. Pueden emplearse cualesquiera condiciones adecuadas, tal como sería determinado fácilmente por un experto en la materia. Por ejemplo, puede producirse ligamiento a cualquier temperatura entre aproximadamente 4 y 80 °C dependiendo de la ligasa involucrada (las bacterias termófilas pueden detectarse usando reacciones incubadas a temperaturas más elevadas que bacterias mesófilas, por ejemplo). Las temperaturas de incubación preferidas están entre aproximadamente 4 y 40 °C, más preferentemente entre aproximadamente 20 y 37 °C y de la forma más preferente a temperatura ambiente para detección bacteriana o fúngica general (viable). Los tiempos de incubación adecuados pueden estar entre aproximadamente 10 minutos y 10 horas, tal como entre aproximadamente 30 minutos, 1 hora o

60

65

2 horas y 5, 6, 7, 8 o 9 horas. La incubación puede producirse en un tampón adecuado. Los tampones de ligasa disponibles en el mercado incluyen tampón de ligasa de *E. coli* disponible de NEB. Las condiciones de incubación adecuadas para uso de una ligasa también se conocen en la técnica y están recomendadas con ligasas disponibles en el mercado. Un cofactor adecuado puede añadirse a la muestra para facilitar la detección de la ligasa microbiana apropiada. Para células fúngicas éste puede ser ATP, mientras que para células bacterianas, puede añadirse NAD.

En realizaciones donde la muestra se evalúa para distinguir entre la presencia de bacterias que expresan ligasa dependiente de NAD (en particular eubacterias) y hongos que expresan ligasa dependiente de ATP, las condiciones pueden alterarse para permitir la detección de las actividades de ligasa respectivas. Esto puede implicar dividir la muestra y ensayar la actividad de ligasa dependiente de NAD específicamente en una parte de la muestra y la actividad de ligasa dependiente de ATP específicamente en otra, o la otra, parte de la muestra. La división puede producirse antes o después de la etapa de tratar la muestra en condiciones que inhiben la actividad de ligasa dependiente de ATP procedente de células de mamífero pero que no inhiben la actividad de las ligasas microbianas. En cada muestra respectiva, solamente el cofactor apropiado (ATP o NAD) puede añadirse para permitir cualquier actividad de ligasa adecuada en esa muestra a detectar. La ausencia del cofactor esencial debe impedir que la otra ligasa sea detectada. Si se requiere, la parte de muestra puede empobrecerse en cualquier cofactor endógeno antes de ensayar la actividad de ligasa. Por ejemplo, puede añadirse luciferasa a una muestra para empobrecer la muestra en ATP. Pueden usarse enzimas adecuadas tales como oxidorreductasas para empobrecer la muestra en NAD antes de la detección de la ligasa.

Los métodos de la invención pueden incorporar controles adecuados. Esto puede ser útil junto con ciertas técnicas de detección sensibles, tales como técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (tal como se describe en el presente documento) para garantizar que se han obtenido resultados precisos. Por ejemplo, los controles pueden incorporar ensayar una muestra en la que se sabe que está presente actividad de ligasa (dependiente de ATP y/o de NAD) microbiana. Si no se produce ninguna molécula de ácido nucleico ligada cuando se añade el sustrato a esta muestra, está claro que hay un problema por ejemplo con los reactivos usados en los métodos o con la técnica de detección. Un control negativo adecuado puede ser una muestra en la que se sabe que no hay actividad de ligasa dependiente de ATP o de NAD. De nuevo, un resultado/detección positiva de niveles similares de producto como se encuentran en la muestra de ensayo es una indicación de que hay un problema. Un control en el que no se añade ninguna molécula sustrato basada en ácido nucleico también puede emplearse para garantizar que los métodos no están detectando un acontecimiento de ligamiento no relacionado. Todas las combinaciones y permutaciones de controles apropiados están previstas en la presente invención. Los controles adecuados para uso en reacciones de amplificación de ácidos nucleicos se emplean en realizaciones específicas de la invención, tal como se describe en el presente documento.

En realizaciones preferidas de la invención, la molécula de ácido nucleico novedosa, producida de acuerdo con la presencia de actividad de ligasa (dependiente de ATP o de NAD) microbiana en la muestra (como indicador de la presencia de una o más microorganismos (viables), en particular hongos y/o bacterias en la muestra), se detecta usando técnicas de amplificación de ácidos nucleicos.

Esto sirve para hacer a los métodos de la invención sensibles al máximo. Dichas técnicas de amplificación son bien conocidas en la técnica, e incluyen métodos tales como PCR, NASBA (Compton, 1991), 3SR (Fahy y col., 1991), replicación en círculo rodante, amplificación mediada por transcripción (TMA), y amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) *Clinical Chemistry* 45: 777-784, 1999, los procesos de auto-ensamblaje de oligómeros de ADN descritos en el documento US6261846 (incorporado en el presente documento como referencia), reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Barringer y col., 1990), amplificación selectiva de secuencias de polinucleótidos diana (US 6410276), PCR cebada de forma arbitraria (WO 90/06995), PCR cebada con secuencia consenso (US 4437975), tecnología de invasor, tecnología de desplazamiento de cadena y amplificación por desplazamiento de muesca (WO 2004/067726). La lista anterior no pretende ser exhaustiva. Puede usarse cualquier técnica de amplificación de ácidos nucleicos, siempre que el producto de ácido nucleico apropiado se amplifique específicamente.

La amplificación se consigue con el uso de cebadores de amplificación específicos para la secuencia de la molécula de ácido nucleico novedosa/ligada que debe detectarse. Para proporcionar específicamente moléculas de ácido nucleico, pueden seleccionarse sitios de unión del cebador correspondientes a una región adecuado de la secuencia. El lector experto en la materia apreciará que las moléculas de ácido nucleico también pueden incluir secuencias diferentes de sitios de unión del cebador que se requieren para detección de la molécula de ácido nucleico novedosa producida por la actividad de ligasa dependiente de NAD en la muestra, por ejemplo sitios de unión de ARN polimerasa o secuencias promotoras pueden requerirse para tecnologías de amplificación isotérmica, tales como NASBA, 3SR y TMA.

Uno o más sitios de unión del cebador pueden salvar el límite de ligamiento de la molécula de ácido nucleico sustrato, de modo que un producto de amplificación se genere solamente si se ha producido ligamiento, por ejemplo. Como alternativa, los cebadores pueden unirse a cualquier lado del límite de ligamiento y dirigir la amplificación a través del límite de modo que un producto de amplificación se genera solamente (exponencialmente) si se forma la molécula de ácido nucleico ligada. Tal como se ha descrito anteriormente, los cebadores y las una o más moléculas

de ácido nucleico sustrato pueden diseñarse para evitar amplificación inespecífica de ADN genómico bacteriano.

Los cebadores adecuados para uso en los métodos de la invención comprenden, consisten esencialmente en o consisten en las secuencias de nucleótidos presentadas como SEQ ID NO: 4 y 5 y las SEQ ID NO: 9 y 10 y se describen con más detalle en la sección experimental a continuación. Estos cebadores forman un aspecto independiente de la invención. Se observa que variantes de estas secuencias pueden utilizarse en la presente invención. En particular, pueden añadirse secuencias flanqueantes específicas de secuencia adicionales, por ejemplo para mejorar la especificidad de unión, según se requiera. Las secuencias variantes pueden tener al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % de identidad de secuencia de nucleótidos con las secuencias de nucleótidos de los cebadores presentados en el ejemplo. Los cebadores pueden incorporar análogos de nucleótidos sintéticos según sea apropiado o pueden basarse en ARN o APN por ejemplo, o mezclas de los mismos. Los cebadores pueden marcarse, tal como con marcas fluorescentes y/o pares FRET, dependiendo del modo de detección empleado. Pueden utilizarse sondas, de nuevo que pueden marcarse, según se desee.

Por lo tanto, en ciertos aspectos, los métodos de la invención se llevan a cabo usando técnicas de amplificación de ácidos nucleicos para detectar la molécula de ácido nucleico novedosa producida como un resultado directo de la acción de actividad de ligasa dependiente de ATP o de NAD sobre la molécula de ácido nucleico sustrato, lo que indica la presencia de una células bacteriana u otro microorganismo que expresa ligasa dependiente de NAD en la muestra. En ciertas realizaciones la técnica usada se selecciona entre PCR, NASBA, 3SR, TMA, SDA y auto-ensamblaje de oligómeros de ADN.

La detección de los productos de amplificación puede ser mediante métodos rutinarios, tales como, por ejemplo, electroforesis en gel pero se lleva a cabo preferentemente usando métodos de detección en tiempo real o de punto final.

En la técnica se conocen una serie de técnicas para detección en tiempo real o de punto final de los productos de una reacción de amplificación. Éstas incluyen el uso de colorantes fluorescentes intercalantes tales como SYBR Green I (Sambrook y Russell, *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Tercera edición), lo que permite que el rendimiento de ADN amplificado se estime basándose en la cantidad de fluorescencia producida. Muchos de los métodos de detección en tiempo real producen una lectura fluorescente que puede monitorizarse de forma continua; ejemplos específicos que incluyen balizas moleculares y sondas de transferencia de energía por resonancia fluorescente. Las técnicas en tiempo real o de punto final son desventajosas porque mantienen la reacción en un "único tubo". Esto significa que no hay necesidad de análisis aguas abajo para obtener resultados, lo que conduce a resultados obtenidos más rápidamente. Además, mantener la reacción en un entorno de "único tubo" reduce el riesgo de contaminación cruzada y permite una salida cuantitativa de los métodos de la invención. Esto puede ser particularmente importante en el contexto de la presente invención donde las cuestiones de salud y seguridad pueden ser de vital importancia (tal como en la detección de contaminación bacteriana potencial de muestras de plaquetas, por ejemplo).

Cuantificación en tiempo real y de punto final de reacciones de PCR puede conseguirse usando el sistema TaqMan® (Applied Biosystems), véase los documentos Holland y col; *Detection of specific polymerase chain reaction*, Gelmini y col. *Quantitative polymerase chain reaction-based homogeneous assay with fluorogenic probes to measure C-Erb-2 oncogene amplification*. *Clin. Chem.* 43, 752-758 (1997) y Livak y col. *Towards fully automated genome wide polymorphism screening*. *Nat. Genet.* 9, 341-342 (1995). Este tipo de sonda puede denominarse genéricamente una sonda hidrófoba. Las sondas hidrolíticas/Taqman adecuadas para uso en detección en tiempo real y de punto final también se proporcionan. Éstas pueden comprender, consistir esencialmente en o consistir en la secuencia de nucleótidos presentada como SEQ ID NO: 11. La sonda está marcada adecuadamente, por ejemplo usando las marcas detalladas a continuación.

En el sistema Molecular Beacon, véase el documento Tyagi & Kramer. *Molecular beacons - probes that fluoresce upon hybridization*. *Nat. Biotechnol.* 14, 303-308 (1996) y Tyagi y col. *Multicolor molecular beacons for allele discrimination*. *Nat. Biotechnol.* 16, 49-53 (1998)), las balizas son sondas en forma de horquilla con un fluoróforo inactivado internamente cuya fluorescencia se restaura cuando está unido a su diana. Estas sondas pueden denominarse sondas de horquilla.

Un sistema basado en fluorescencia en tiempo real adicional que puede incorporarse en los métodos de la invención es el sistema Scorpion de Zeneca, Véase el documento *Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence* de Whitcombe y col. *Nature Biotechnology* 17, 804 - 807 (01 de agosto de 1999). Técnicas de detección en tiempo real o de punto final adicionales que son conocidas por los expertos en la materia y que están disponibles en el mercado incluyen la tecnología Lightcycler®, la tecnología de cebadores Amplifluor®, cebadores DzyNA (Todd y col., *Clinical Chemistry* 46: 5, 625-630 (2000)), o los sistemas Plexor™ de qPCR y qRT-PCR.

Por lo tanto, en aspectos adicionales de la invención, los productos de amplificación de ácidos nucleicos se detectan usando técnicas en tiempo real o de punto final. En realizaciones específicas de la invención, las técnicas en tiempo real consisten en usar una cualquiera de sondas hidrolíticas (el sistema Taqman®), sondas FRET (sistema

Lightcycler®), cebadores de horquilla (sistema Amplifluor®), sondas de horquilla (el sistema Molecular beacons), sondas de horquilla incorporadas en un cebador (el sistema de sondas Scorpion®), cebadores que incorporan la secuencia complementaria de una ADNzima y un sustrato de ADNzima fluorescente escindible (DzYNA), Plexor qPCR y sistemas de bloqueo de oligonucleótidos.

5 En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción contendrá todos de; la muestra que está siendo ensayada, las una o más moléculas de ácido nucleico sustrato, reactivos, tampones y enzimas requeridas para amplificación de la molécula de ácido nucleico (ligada) novedosa opcionalmente, además, los reactivos requeridos para permitir
10 detección en tiempo real o de punto final de productos de amplificación. Por lo tanto, todo el método de detección para la ligasa dependiente de ATP o de NAD (procedente de las una o más células bacterianas u hongos de interés) puede producirse en una única reacción, con una salida cuantitativa, y sin necesidad de ninguna etapa de lavado intermedia. El uso de una reacción de "único tubo" es ventajosa porque no existe necesidad de análisis aguas abajo para obtener resultados, que conducen a resultados obtenidos más rápidamente. Además, mantener la reacción en un entorno de "único tubo" reduce el riesgo de contaminación cruzada y permite una salida cuantitativa de los
15 métodos de la invención. Además, las reacciones de único tubo single están más susceptibles a automatización, por ejemplo en un contexto de alto rendimiento.

Como alternativa, los métodos de la invención pueden llevarse a cabo por etapas. Por lo tanto, en una primera etapa puede ser necesario, en primer lugar, preparar la muestra en una forma adecuada para uso en el método de la invención. Por ejemplo, tal como se describe en el presente documento, puede requerirse lisis celular selectiva o permeabilidad celular en aumento.

Los métodos de la invención también pueden demostrar tener utilidad de diagnóstico, con lo que una infección puede detectarse de forma específica y sensible en las fases tempranas, cuando solamente niveles mínimos de las células bacterianas o fúngicas infecciosas que expresan una ligasa dependiente de ATP o de NAD están presentes y se desea determinar qué tipo de organismo es activo en la infección. Por lo tanto, los métodos de la invención pueden usarse para diagnosticar el microorganismo responsable de una infección, o una enfermedad asociada con la presencia de un microorganismo. Todos los aspectos de la invención y etapas del método, tal como se describe en el presente documento son, por lo tanto, aplicables a un método de diagnóstico del organismo responsable de una infección, o una enfermedad asociada con la presencia de un microorganismo, tal como una célula bacteriana o fúngica.

Por lo tanto, en un aspecto adicional específico, se proporciona un método de diagnóstico del organismo responsable de una infección, o una enfermedad asociada con la presencia de una célula bacteriana o fúngica, que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en las etapas de, en una muestra obtenida del sujeto:

- (a) poner en contacto la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para actividad de ligasa dependiente de ATP en la muestra,
- (b) incubar la muestra puesta en contacto de este modo en condiciones adecuadas para actividad de ligasa dependiente de ATP; y
- (c) determinar específicamente la presencia (y/o la cantidad) de una molécula de ácido nucleico ligada que resulta de la acción de la ligasa dependiente de ATP sobre la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la presencia de hongos y/o bacterias que causan la infección

45 El método puede comprender adicionalmente:

- (d) poner en contacto la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para actividad de ligasa dependiente de NAD en la muestra,
- (e) incubar la muestra puesta en contacto de este modo en condiciones adecuadas para actividad de ligasa dependiente de NAD; y
- (f) determinar específicamente la presencia (y/o la cantidad) de una molécula de ácido nucleico ligada que resulta de la acción de la ligasa dependiente de NAD sobre la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la presencia de bacterias que causan la infección solamente.

55 Análogamente, se proporciona un método de diagnóstico del organismo responsable de una infección, o una enfermedad asociada con la presencia de una célula bacteriana o fúngica, que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en las etapas de, en una muestra obtenida del sujeto:

- (a) tratar la muestra en condiciones que inhiben el fondo de mamífero de ligasa dependiente de ATP pero que no afectan a ligasas dependientes de NAD y dependientes de ATP microbianas
- (b) lisar la muestra para liberar las ligasas dependientes de NAD y dependientes de ATP microbianas
- (c) poner en contacto la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para actividad de ligasa dependiente de ATP en la muestra,

65

El método puede comprender adicionalmente:

(d) incubar la muestra puesta en contacto de este modo en condiciones adecuadas para actividad de ligasa dependiente de ATP; y

(e) determinar específicamente la presencia (y/o la cantidad) de una molécula de ácido nucleico ligada que resulta de la acción de la ligasa dependiente de ATP sobre la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la presencia de hongos y/o bacterias que causan la infección

(f) poner en contacto la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para actividad de ligasa dependiente de NAD en la muestra,

(g) incubar la muestra puesta en contacto de este modo en condiciones adecuadas para actividad de ligasa dependiente de NAD; y

(h) determinar específicamente la presencia (y/o la cantidad) de una molécula de ácido nucleico ligada que resulta de la acción de la ligasa dependiente de NAD sobre la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la presencia de bacterias que causan la infección solamente.

En este contexto la "muestra" será generalmente una muestra clínica. La muestra que está siendo usada dependerá de la condición que está siendo ensayada. Muestras típicas que pueden usarse, pero que no pretenden limitar la invención, incluyen muestras de sangre completa, suero, plasma, plaquetas y orina etc., tomadas de un paciente, de la forma más preferente un paciente humano. Tal como se ha mencionado anteriormente, las muestras contendrán células de mamífero. Los métodos de la invención permiten que la actividad de ligasa de células de mamífero se elimine de la muestra antes de la detección de la actividad de ligasa microbiana, permitiendo de este modo que los métodos tengan utilidad de diagnóstico.

En una realización preferida, el ensayo será un ensayo *in vitro* llevado a cabo en una muestra eliminada de un sujeto.

Los métodos de diagnóstico descritos anteriormente pueden basarse adicionalmente en la etapa de obtener la muestra de un sujeto. Los métodos de obtener una muestra adecuada de un sujeto son bien conocidos en la técnica. El método puede llevarse a cabo comenzando con una muestra que ya ha sido aislada del paciente en un procedimiento independiente. Los métodos de diagnóstico se llevarán a cabo de la forma más preferente en una muestra procedente de un ser humano, pero el método de la invención puede tener utilidad de diagnóstico para muchos animales.

Los métodos de diagnóstico de la invención pueden usarse para complementar cualesquiera técnicas de diagnóstico ya disponibles, potencialmente como un método de confirmación de un diagnóstico inicial. Como alternativa, los métodos pueden usarse como un método de diagnóstico preliminar por derecho propio, dado que los métodos proporcionan un medio de diagnóstico rápido y conveniente. Además, debido a su inherente sensibilidad, los métodos de diagnóstico de la invención requieren solamente una muestra mínima, impidiendo de este modo cirugía invasiva innecesaria. Además, una muestra grande pero no concentrada también puede ensayarse eficazmente de acuerdo con los métodos de la invención.

Por lo tanto, los métodos de la invención tienen múltiples aplicaciones más allá de la detección de organismos contaminantes en una muestra. La descripción proporcionada anteriormente con respecto a los aspectos de detección básica de la invención se aplica *mutatis mutandis* a los aspectos adicionales de la invención y no se repite por razones de concisión. Por ejemplo, todas las etapas de los métodos y controles adecuados pueden incorporarse en estos métodos de la invención.

En realizaciones específicas la ligasa, más específicamente dependiente de NAD, microbiana se deriva de un microorganismo patógeno, en particular una bacteria patógena.

La bacteria puede ser cualquier bacteria que es capaz de causar infección o enfermedad en un sujeto, preferentemente un sujeto humano. En una realización, las bacterias comprenden o consisten esencialmente en o consisten en una o más cualquiera de especies de *Staphylococcus*, en particular *Staphylococcus aureus* y preferentemente cepas resistentes a meticilina, especies de *Enterococcus*, especies de *Streptococcus*, especies de *Mycobacterium*, en particular *Mycobacterium tuberculosis*, especies de *Vibrio*, en particular *Vibrio cholerae*, *Salmonella* y/o *Escherichia coli* etc. Las bacterias pueden comprender, consistir esencialmente en o consistir en especies de *Clostridium* y en particular *C. difficile* en ciertas realizaciones. *C. difficile* es la causa principal de diarrea y colitis asociadas a antibióticos, una infección intestinal asociada a la atención sanitaria que afecta en su mayoría a pacientes ancianos con otras enfermedades subyacentes.

En realizaciones específicas, la ligasa, más específicamente dependiente de ATP, microbiana se deriva de hongos patógenos. Los hongos pueden ser cualesquiera hongos que son capaces de causar infección o enfermedad en un sujeto, preferentemente un sujeto humano. En una realización, el hongo comprende o consiste esencialmente en o consiste en uno o más cualquiera de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* y *Pneumocystis jirovecii*.

También se desvelan kits de ensayo para realizar estos métodos de la invención. El kit de ensayo puede ser un kit de ensayo desechable en ciertas realizaciones. Cada componente del kit de ensayo puede suministrarse en un compartimento un portador independiente, o uno o más de los componentes pueden combinarse - siempre que los componentes puedan almacenarse de forma estable conjuntamente.

- 5 Por lo tanto, se desvela un kit para uso en los métodos de la invención que comprende:
- (a) al menos una molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para actividad de ligasa microbiana en la muestra
 - 10 (b) medios para inhibir la actividad de ligasa dependiente de ATP procedente de células de mamífero, medios que no inhiben la actividad de las ligasas microbianas.

15 Todos los aspectos y realizaciones de los métodos de la invención se aplican *mutatis mutandis* a los kits de la divulgación. Por lo tanto, los medios para inhibir la actividad de ligasa dependiente de ATP de células de mamífero, medios que no inhiben la actividad de las ligasas microbianas, pueden comprender un agente adecuado para alterar el pH de la muestra en la que tiene lugar la reacción. En realizaciones particulares, el agente comprende una solución a pH elevado. En realizaciones específicas, los medios para inhibir la actividad de ligasa dependiente de ATP procedente de células de mamífero, medios que no inhiben la actividad de las ligasas dependientes de ATP microbianas comprenden, consisten esencialmente en o consisten en hidróxido sódico (NaOH) o carbonato sódico (Na₂CO₃) (para elevar el pH). El agente puede estar presente en cualquier concentración o volumen adecuado como sería apreciado fácilmente por un experto en la materia. En una realización específica, el NaOH es NaOH 5 mM.

25 El tratamiento con medios adecuados para inhibir la actividad de ligasa dependiente de ATP procedente de células de mamífero, tal como se describe en el presente documento, puede requerir inicialmente aplicación de un agente para penetrar selectivamente la membrana celular de células de mamífero. Por lo tanto, los kits de la divulgación pueden además comprender, consistir esencialmente en o consistir en un agente que permeabiliza la membrana celular de mamífero pero que no penetra en la pared celular del microorganismo. Pueden emplearse cualquier agente adecuado. En realizaciones específicas, el agente es un detergente, tal como Triton X-100.

30 Los kits pueden comprender además cebadores para detección específica de una molécula de ácido nucleico ligada producida mediante actividad de ligasa microbiana en la muestra sobre la molécula de ácido nucleico sustrato. Los cebadores adecuados comprenden, consisten esencialmente en o consisten en las secuencias de nucleótidos presentadas como SEQ ID NO: 4 y 5 y SEQ ID NO: 9 y 10.

35 En realizaciones adicionales, la al menos una molécula de ácido nucleico se inmoviliza sobre un soporte sólido o se proporciona junto con medios para inmovilizar la molécula de ácido nucleico sustrato sobre dicho soporte sólido. La inmovilización de la molécula de ácido nucleico sustrato sobre un soporte sólido permite la captura eficaz de la ligasa microbiana procedente de la muestra. La interacción de la molécula de ácido nucleico sustrato inmovilizada con la ligasa da como resultado la generación de una molécula de ácido nucleico ligada, novedosa. Por lo tanto, los kits de la divulgación pueden comprender además un soporte sólido. El sustrato puede o no proporcionarse cargado previamente sobre el soporte sólido. Si no está inmovilizado previamente sobre el soporte sólido, reactivos adecuados para permitir la inmovilización pueden proporcionarse en el kit, opcionalmente junto con instrucciones adecuadas. Reactivos para permitir la inmovilización serían bien conocidos para un experto en la materia. Puede utilizarse cualquier medio de inmovilización siempre que no tenga un efecto adverso sobre la implementación de los métodos de la invención, especialmente en términos de especificidad y sensibilidad de detección de la ligasa microbiana a partir de las una o más células bacterianas o fúngicas o microorganismos diana.

50 Cualquier soporte sólido adecuado puede incluirse en los kits de la divulgación. La naturaleza del soporte sólido no es crítica para el rendimiento de la invención, siempre que la molécula de ácido nucleico sustrato pueda inmovilizarse sobre él sin afectar de forma adversa a la actividad de ligasa microbiana, incluyendo la capacidad de la enzima para interactuar con la molécula de ácido nucleico. Ejemplos no limitantes de soportes sólidos incluyen cualquiera de perlas, tales como perlas de poliestireno y perlas paramagnéticas y derivados de las mismas, columnas de afinidad, placas de microvaloración, etc. Donde la molécula de ácido nucleico sustrato es, de hecho, dos (o más) moléculas de ácido nucleico que están ligadas entre sí, una o ambas de las moléculas de ácido nucleico sustrato pueden inmovilizarse sobre un soporte sólido. En realizaciones específicas, las moléculas de ácido nucleico sustrato independientes pueden inmovilizarse sobre el mismo soporte que otra. Esto permite que las moléculas estén próximas para garantizar que el ligamiento sea eficiente si la ligasa microbiana (bacteriana y/o fúngica) está presente en la muestra que se está ensayando. Reactivos de biotina y/o estreptavidina pueden incorporarse en los kits para facilitar la inmovilización, por ejemplo.

65 El kit también puede comprender medios para facilitar la lisis o para incrementar la permeabilidad de las células microbianas en la muestra, para permitir que la actividad de ligasa microbiana se detecte. La descripción de medios adecuados en el presente documento se aplica *mutatis mutandis* a los kits de la divulgación. En una realización, el kit comprende además perlas para facilitar la lisis de células microbianas en la muestra (a través del uso de una técnica de rotura física con perlas "bead-beater"). En realizaciones específicas, las perlas tienen aproximadamente 1

mm de diámetro para facilitar la lisis de células fúngicas. Para la lisis de células bacterianas, pueden emplearse perlas más pequeñas, de aproximadamente 10 µm. por lo tanto, el kit puede incluir perlas de un intervalo de diámetros en ciertas realizaciones.

- 5 El kit también puede incorporar reactivos necesarios para la amplificación de ácidos nucleicos. El empleo de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos permite la detección sensible de la presencia de una molécula de ácido nucleico ligada novedosa. Técnicas adecuadas y los reactivos necesarios serían inmediatamente evidentes para un experto en la materia. Por lo tanto, los kits pueden incorporar en particular cebadores adecuados para detección específica de la molécula de ácido nucleico ligada - tal como se describe en más detalle en el presente documento. Los kits también pueden incorporar reactivos adecuados para detección en tiempo real de productos de amplificación.

15 Los kits pueden incorporar un portador adecuado en el que tienen lugar las reacciones. Ventajosamente, dicho portador puede comprender una placa de múltiples pocillos, tal como una placa de 48 o 96 pocillos, por ejemplo. Dicho portador permite que los métodos de detección se lleven a cabo en volúmenes relativamente pequeños - facilitando de este modo el aumento a escala y minimizando el volumen de muestra requerido.

20 Los kits incorporarán normalmente instrucciones adecuadas. Estas instrucciones permiten que los métodos de la invención se lleven a cabo de forma fiable usando los kits de la divulgación.

Breve descripción de los dibujos

25 La figura 1 muestra resultados de ensayo en tiempo real para el ensayo de PCR. Las curvas mostradas son, de izquierda a derecha: 24000 células, 2400 células, 240 células, 0 células, las trazas restantes son controles de tampón.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

30 La invención se entenderá con respecto a los siguientes ejemplos no limitantes:

Ejemplo 1. Ensayo en caldo de sangre para levadura

Preparación de las soluciones de ensayo:

10x Tampón de reacción de ADN ligasa T4	(NEB, n.º de cat. B0202S)
Triton-X-100 al 10 %	(Sigma, n.º de cat. T8532)
BSA al 5 %	(Sigma, n.º de cat. A7906)
Tris Cl 1 M pH 7,5	(a partir de Tris HCl y Tris base, Sigma, n.º de cat. T3253, T1503) pH hasta 7,5
H2O	(Sigma, n.º de cat. W4502) a través de filtro de 0,2 µm a continuación autoclavado, usar este H2O
-	donde se requiera en el ensayo
25 ADN	(secuencias de MWG)
NaOH 1 M	(Sigma n.º de cat. 221465)
DTT	

- 35 Perlas de lisis de cerámica (1 mm de diámetro) suministradas por Idexx Laboratories Inc. se bloquearon con 1 ml de BSA al 5 % durante una noche y se lavaron con 1x tampón de reacción, 1 ml de B0202S. Se resuspendieron en 1 x tampón de reacción, 1 ml de B0202S.

40 Componentes de ADN se disolvieron (oligonucleótidos suministrados por MWG Eurofins) a una concentración de trabajo de 1 ng/µl en H2O mediante diluciones sucesivas en EDTA 10 mM (sigma n.º de cat. E7889).

Las secuencias fueron:

S1 ACCAAATCCCACCACAACAGAACTACCAACCAAACACACACAACAAC (SEQ ID NO:

1)

- 45 S2 CCACGCTCACCTCGGCTCCCTCTTCTGACTCCTTCC (SEQ ID NO: 2)
AS GAGGTGAGCGTGGGTTGTTGTGTGTGTTTCC (SEQ ID NO: 3)
F CCCACCACAACAGAACTACCAACC (SEQ ID NO: 4)
R GGAAGGAGTCAGAGAAGAGGGAGCC (SEQ ID NO: 5)

donde F y R se refiere a cebadores directo e inverso, S1, S2 y AS son los 3 componentes del sustrato.

Protocolo de ensayo

- 5 1. Añadir 10 ml de caldo de sangre (diluidos a 1:4) a tubos falcon de 15 ml estériles
- 2. Añadir 10 perlas de cerámica bloqueadas y lavadas
- 3. Añadir 0,2 ml de Triton al 10 %, invertir para mezclar
- 4. Centrifugar a 4000 rpm durante 20 minutos en centrifuga de mesa
- 5. Aspirar el sobrenadante
- 10 6. Añadir 1 ml de H₂O
- 7. Resuspender el sedimento
- 8. Añadir 9 ml de H₂O
- 9. Añadir 0,5 ml de BSA al 5 %
- 10. Añadir 50 µl de NaOH 1 M (dando NaOH 5 mM pH 12), invertir para mezclar
- 15 11. Centrifugar a 4000 rpm durante 20 minutos
- 12. Aspirar el sobrenadante, dejando perlas secas, neutralizar con 10 ml de TrisCl 50 mM pH 7,5, mezclar mediante vórtice durante 20 s
- 13. Centrifugar a 4000 rpm durante 20 minutos, aspirar el sobrenadante
- 14. Retirar la solución restante
- 20 15. Resuspender las perlas y las células de levadura sedimentada en 100 µl de mezcla de lisis mecánica:
 - BSA al 5 %, 20 µl
 - Triton-X-100 al 1 %, 10 µl
 - Tween 20 1 %, 10 µl
 - 10x Tampón de reacción de ADN ligasa T4, 10 µl
 - ADN AS1318 1 ng/µl, 10 µl
 - DTT 1 M, 1 µl
 - H₂O, 39 µl
- 30 16. Transferir a tubos de lisis mecánica (tubos estériles Sarstedt de 2 ml, n.º de cat. 72. 694. 006)
- 17. Ribolizar a potencia 5 m/s durante 45 s, esperar 2 minutos, a continuación repetir
- 18. Breve etapa de centrifugado (2 minutos)
- 19. Incubar a 37 °C durante 30 minutos
- 35 20. 2 µl a PCR
 - Programa del ciclo térmico
 - 50 grados, 2 minutos
 - 95 grados, 15 minutos 1x
 - 94 grados, 10 s
 - 72 grados, 5 s 30x

La mezcla de PCR contenía 10 µl de SYBR Green 2X (Eurogentec mix, n.º de cat. RT-SN2X-03+NR), 2,25 µl de cebador F 10 µM, 2,25 µl de cebador R 10 µM, 3,5 µl de H₂O

Resultados

La figura muestra resultados de ensayo en tiempo real para el ensayo de PCR, 10 curvas son (de izquierda a derecha): 24000 células, 2400 células, 240 células, 0 células, las trazas restantes son controles del tampón.

Ejemplo 2. Demostración de la inactivación de ligasa dependiente de ATP del anfitrión con NaOH

Fundamento. Este experimento se realizó para demostrar la capacidad del pH alcalino de inactivar ligasa dependiente de ATP del anfitrión liberada desde leucocitos de mamífero.

Método

Para células de mamífero se diluyeron 10 ml de sangre a 50 ml con agua para lisar los glóbulos rojos. Los leucocitos se recogieron mediante centrifugado.

Las células se resuspendieron en hepes 50 mM pH 7 y se lisaron mediante ribolisis tal como se describe en la etapa 15 del ejemplo 1 anterior y a continuación se diluyeron 100 veces en agua.

Una alícuota de las células lisadas se trató con NaOH 5 mM pH 12 durante 20 minutos mientras que otra alícuota permanecía sin tratar. Después del tratamiento con NaOH, las células lisadas se diluyeron en mezcla de ligasa y se

ensayaron para actividad de ligasa, tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 1.

Para bacterias

- 5 E. coli cultivada se diluyó en agua y se trató con NaOH 5 mM, NaOH 5 mM y BPer al 50 % (v/v) (Fisher, N.º de Cat. 78243) (para lisar las células bacterianas) o con Bper solamente. Después del tratamiento durante 20 minutos, las células se diluyeron en mezcla de ligasa y se ensayaron para actividad de ligasa, tal como se ha descrito en el ejemplo 1 excepto que se usó el tampón de ligasa de ADN de E. coli que contenía NAD.

10

Resultados

Después de la PCR, se registraron los ciclos en los que la PCR se volvió positiva (véase a continuación).

- 15 Leucocitos + NaOH 28,3
 Leucocitos - NaOH 19,5
 E. coli + NaOH 20,5
 E. coli + NaOH + BPer 15,2
 E. coli + BPer 15,2

20

Conclusión

- 25 El tratamiento de los leucocitos con NaOH redujo la señal generada por PCR en 9 ciclos en comparación con leucocitos no tratados. Esto se debe a la inactivación de la ligasa del anfitrión mediante NaOH. En contraste, E. coli lisada con BPer producía la misma señal de PCR ya se tratara la ligasa con NaOH o no. Esto demuestra que la ligasa presente en las bacterias es mucho más resistente al tratamiento alcalino con NaOH. Si las bacterias se tratan con NaOH solamente, la señal es baja porque las bacterias permanecen intactas y la ligasa no es liberada en el ensayo.

30 **Ejemplo 3. Ensayo en caldo de sangre para levadura.**

El fin de este experimento es mostrar que la levadura (Candida albicans como ejemplo) puede detectarse de forma sensible en presencia de caldo de sangre.

- 35 La preparación de soluciones de ensayo y los componentes del sustrato fueron tal como se enumeró anteriormente en el ejemplo 1.

Protocolo de ensayo

Un protocolo de ensayo típico es el siguiente.

40

1. A 0,25 ml de Triton X-100 al 10 % (v/v) en un tubo de centrifuga de 15 ml, añadir 10 ml de caldo de sangre y mezclar. Nota: si se adiciona con bacterias u hongos, añadirlos en esta etapa.
2. Incubar durante 5 minutos en la mesa de trabajo, a continuación centrifugar a 3-4000 x g durante 20 minutos.
3. Verter el sobrenadante e invertir el tubo sobre un pañuelo desechable para secar.
- 45 4. Añadir 1 ml de H₂O y pipetear para resuspender.
5. Añadir 9 ml de H₂O e invertir para mezclar. Añadir 1 ml de NaOH 50 mM e invertir para mezclar
6. Incubar 5 minutos en la mesa de trabajo, a continuación centrifugar a 3-4000 x g durante 20 minutos.
7. Verter el sobrenadante e invertir el tubo para secar.
8. Resuspender el sedimento en 1 ml de Tris 50 mM pH 7,5, transferir a un tubo de microcentrifuga, centrifugar a 8.000 rpm 3 minutos, eliminar pipeteando el sobrenadante
- 50 9. Añadir 50 µl de mezcla Ribomix y mezclar con el sedimento resuspendido.
10. Transferir a un tubo de ribolisis de 2 ml que contenía perlas de ribolisis.
11. Ribolizar a una potencia 4 durante 20 s.
12. Colocar el tubo a 37 °C durante 30 minutos para ligamiento.
- 55 13. Centrifugar a 8000 rpm durante 3 minutos
14. Retirar 2 µl para PCR.

Mezcla Ribomix:

BSA al 5 %	10 µl
Triton al 1 %	5 µl
Tween al 1 %	5 µl
10 X tampón rxn	5 µl (que contiene ATP/NAD)
ADN 0,1pmol/µl/µl	5 µl

ES 2 573 405 T3

H2O 20 µl

Mezcla de PCR:

Mezcla SYBR Stratagene 10 µl (# 600830)
 Cebador F 10 µM 2 µl
 Cebador R 10 µM 2 µl
 UDGasa 0,4 µl
 Muestra 2 µl
 Agua 3,6 µl

PROG de PCR

55 grados 10 minutos
 95 grados 10 minutos 1x
 95 grados 10 s
 65 10 s
 72 10 s 40x

5 Secuencias de ADN (todas leídas 5'-3')

COMO ADN **UAG UAC UUC GUG GGU UGU UGU CUC UCG CCU UCC CAG UUC GGC
 CGU UGU CCG AUA UCG GCU 3' fosfato (SEQ ID NO: 6)**
**S1: GCC GAT ATC GGA CAA CGG CCG AAC TGG GAA GGC GAG AGA CAA CAA
 C (SEQ ID NO: 7)**
**S2: 5' fosfato CC ACG AAG TAC TAG CTG GCC GTT TGT CAC CGA CGC CTA
 3' fosfato (SEQ ID NO: 8)**

10 Cebador F GGA CAA CGG CCG AAC TGG GAA GGC G (SEQ ID NO: 9)
 Cebador R TAG GCG TCG GTG ACA AAC GGC CAG C (SEQ ID NO: 10)

Resultados

15 Experimento 1a

C. albicans en medio de cultivo frente a C. albicans en caldo de sangre (tratado con NaOH).
 Cuando se midió C. albicans usando el protocolo anterior, con una etapa de tratamiento con NaOH, los resultados fueron tal como se muestra en la tabla 1 a continuación:

20

Tabla 1.

Número de C. albicans	Medio de cultivo			Caldo de sangre		
	Ct	Diferencia de Ct	Diferencia numérica respecto al control (veces)	Ct	Diferencia de Ct	Diferencia numérica respecto al control (veces)
390 UFC/ml	24,1	3,5	11,3	24,5	4,6	24,3
98 UFC/ml	26,1	1,5	2,8	27,0	2,1	4,3
25 UFC/ml	25,3	2,3	4,9	27,7	1,4	2,6
Control	27,6	0	29,1	29,1	0	

25 Dado que cada diferencia de Ct representa un incremento de dos veces en la señal, las cifras en la columna "diferencia numérica" se dan para mostrar la diferencia real. Por ejemplo, 390 UFC/ml de C albicans dieron un incremento de 11,3 en la señal respecto al fondo o una diferencia de Ct de 3,5 en el medio de cultivo. Los resultados muestran:

- 30
1. C. albicans puede medirse de forma sensible en caldo de sangre.
 2. La señal de fondo en caldo de sangre es muy baja cuando el tratamiento con NaOH ha sido usado.

Experimento 1b

Efecto de exposición a pH elevado sobre la señal de ligasa de ADN sanguíneo

5 En caldo de sangre que no está tratado con NaOH, hay una señal muy elevada incluso después de que las células sanguíneas han sido eliminadas por la etapa de lisis con Triton (etapa 3 anterior). Esto parece deberse a un residuo de lisis de sangre que contiene leucocitos. Se realizó un experimento de acuerdo con el protocolo anterior usando 10 ml de sangre humana estéril diluida a 50 ml en medio de cultivo y medida con y sin tratamiento con NaOH, sin hongos presentes. El sedimento en la etapa 6 se diluyó 100 veces para mantener las señales dentro de un intervalo
10 razonable.

Tabla 2.

	-NaOH	+NaOH
Residuo de lisis de sangre/100	19,5	26,7
Control	29,5	29,5

15 En ausencia de NaOH, la señal sanguínea incluso cuando se diluía 100 veces era de 10 Ct, mucho más alta que el nivel observado con pequeñas cantidades de *C. albicans*. En presencia de NaOH, esta señal de fondo se reduce a 2,8 Ct. Esto es una diferencia de 7,2 Ct o una reducción de 150 veces.

Experimento 1c

20 Efecto de exposición a pH elevado sobre *C. albicans*

¿Lisa el pH elevado *C. albicans* o es el efecto del pH simplemente porque el organismo sigue siendo resistente al pH porque permanece intacto? *C. albicans* en medio de cultivo se expusieron a pH variable durante 20 minutos antes de ensayarlos para actividad de ligasa, tal como se ha descrito anteriormente pero sin la etapa de lisis (etapa 12). Esto se comparó con un ensayo rutinario realizado a pH 7,5 con la etapa de lisis. En este caso, el pH elevado se creó mediante exposición a carbonato sódico en lugar de a hidróxido sódico.
25

Tabla 3.

pH	Ct	Cambio de Ct	Cambio de señal (veces)
7,5	29	0	0
9,6	29,4	-	-
10,2	28,9	0,1	0
11,2	26,8	2,2	4,6
7,5 (lisado)	26,8	2,2	4,6

30 Los resultados muestran no hay ninguna señal significativa de *C. albicans* en ausencia de una etapa de lisis, hasta pH 11,2. A este pH la levadura parece estar lisándose y dando una señal tan potente como la observada en levadura lisada

Si el experimento anterior se repite pero en su lugar se lisan todas las muestras de pH de ensayo, los resultados son tal como se muestra en la tabla 4:
35

Tabla 4.

pH	Ct	Cambio de Ct	Cambio de señal (veces)
7,5	26,2	3,6	12,1
9,6	27,2	2,6	6,1
10,2	27,1	2,7	6,5
11,2	26,5	3,3	9,8
control	29,8	0	

40 Esto demuestra que, cuando las levaduras lisadas se exponen a pH elevado, siguen siendo capaces de dar una señal potente, con la señal a pH 11,2 casi tan elevada como la señal a pH 7,5. Esto contrasta directamente con los resultados usando sangre.

Experimento 2

45 Efecto del pH elevado sobre *Saccharomyces cerevisiae*

El experimento para ensayar el efecto del pH elevado se repitió usando *Saccharomyces cerevisiae* lisada y sin lisar. La etapa de lisis en este caso era exponer al organismo a YPER, un agente de lisis de levadura comercializado por Pierce, en lugar de lisis mecánica.
50

Tabla 5.

	Ct	Diferencia de Ct	Diferencia numérica (veces)
S. cerevisiae+ YPER	27,3	3,0	8
S. cerevisiae+ NaOH	28,3	2,0	4
S. cerevisiae+ YPER+NaOH	28,3	2,0	4
Control	30,3	0	

El experimento demuestra que S. cerevisiae muestra una buena señal después de exposición a pH elevado incluso aunque haya sido lisado.

5

Experimento 3

Efecto del pH elevado sobre E. coli

- 10 El experimento para ensayar el efecto de pH elevado se repitió usando E. coli lisada y sin lisar. La etapa de lisis en este caso era exponer al organismo a BPER, un agente de lisis bacteriana comercializado por Pierce, en lugar de lisis mecánica.

Tabla 6.

	Ct	Diferencia de Ct	Diferencia numérica (veces)
E. coli + BPER	24,7	5,1	34
E. coli + NaOH	26,6	3,2	9,2
E. coli + BPER+NaOH	23,6	6,2	74
Control	29,8	0	

15

El experimento demuestra que E. coli muestra una señal excelente después de exposición a pH elevado incluso aunque haya sido lisado.

Experimento 4.

20

Efecto de pH elevado sobre ligasa de ADN bacteriana purificada y ligasa de mamífero

Ligasa de ADN de E. coli recombinante (NEB, número de catálogo M0205) se expuso a pH 10,2 durante 20 minutos y la señal se comparó con la enzima no expuesta. Esto se comparó con exposición de actividad ligasa de ATP sanguíneo después del mismo periodo de exposición a pH 10,2.

25

Tabla 7.

	Ct	Diferencia de Ct	Diferencia numérica (veces)
Ligasa de ADN bacteriano -NaOH	12,0	16	63.000
E. coli + NaOH	11,5	16,5	93.000
Control			
Ligasa de ATP sanguíneo - NaOH	23,8	8,3	315
Ligasa de ATP sanguíneo + NaOH	33,4	-	0
Control	32,1		

- 30 El experimento muestra que la enzima bacteriana aislada (en presencia de NAD, su sustrato) es extremadamente robusta respecto a la exposición a pH elevado. En contraste, la actividad de ligasa de mamífero en presencia de ATP se eliminó al mismo pH.

35 La presente invención no debe estar limitada en alcance por las realizaciones específicas descritas en el presente documento. De hecho, diversas modificaciones de la invención además de las descritas en el presente documento se volverán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y las figuras adjuntas. Dichas modificaciones pretenden estar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Además, se considera que todas las realizaciones descritas en el presente documento son ampliamente aplicables y combinables con todas y cada una otras realizaciones consistentes, según sea apropiado.

- 40 En el presente documento se mencionas diversas publicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método de detección de un microorganismo que expresa ligasa en una muestra que contiene células de mamífero, que comprende:
- 5 (a) lisis de células de mamífero y cualesquiera microorganismos presentes en la muestra
 (b) tratar la muestra lisada en condiciones de pH elevado que inhiben la actividad de ligasa dependiente de ATP procedente de células de mamífero pero que no inhiben la actividad de las ligasas microbianas,
 (c) poner en contacto la muestra o una parte de la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para actividad de ligasa en la muestra,
 10 (d) incubar la muestra puesta en contacto de este modo en condiciones adecuadas para actividad de ligasa; y
 (e) determinar específicamente la presencia y/o la cantidad de una molécula de ácido nucleico ligada que resulta de la acción de la ligasa sobre la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la presencia del microorganismo que expresa ligasa.
- 15 2. Un método de detección de un microorganismo que expresa ligasa en una muestra que contiene células de mamífero, que comprende:
- (a) permeabilizar selectivamente la membrana celular de células de mamífero en la muestra mientras se dejan intactos cualesquiera microorganismos en la muestra
 20 (b) tratar la muestra en condiciones de pH elevado que inhiben la actividad de ligasa dependiente de ATP liberada de células de mamífero pero que no inhiben la actividad de las ligasas microbianas,
 (c) lisis de cualesquiera microorganismos en la muestra para liberar ligasa dependiente de ATP y de NAD
 (d) poner en contacto la muestra o una parte de la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para actividad de ligasa en la muestra,
 25 (e) incubar la muestra puesta en contacto de este modo en condiciones adecuadas para actividad de ligasa; y
 (f) determinar específicamente la presencia y/o la cantidad de una molécula de ácido nucleico ligada que resulta de la acción de la ligasa sobre la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la presencia del microorganismo que expresa ligasa.
- 30 3. El método de la reivindicación 1 o 2, donde el microorganismo que expresa ligasa comprende células fúngicas o bacterianas o ambas.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la ligasa expresada por el microorganismo comprende una ligasa dependiente de ATP, una ligasa dependiente de NAD o ambas.
- 35 5. El método de la reivindicación 4, donde la presencia de actividad de ligasa dependiente de NAD en la muestra indica la presencia de células bacterianas.
- 40 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde las condiciones de pH elevado que inhiben la actividad de ligasa dependiente de ATP procedente de células de mamífero pero que no inhiben la actividad de las ligasas microbianas comprenden tratar la muestra con hidróxido sódico (NaOH) o carbonato sódico (Na₂CO₃).
- 45 7. El método de la reivindicación 6, donde:
- (i) el NaOH es NaOH aproximadamente 5 mM; y/o
 (ii) el pH es al menos aproximadamente 10; y/o
 (iii) el tratamiento se lleva a cabo durante aproximadamente 20 minutos.
- 50 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde las condiciones de pH elevado que inhiben la actividad de ligasa dependiente de ATP procedente de células de mamífero pero que no inhiben la actividad de las ligasas microbianas comprenden un pH suficientemente elevado para causar lisis de los microorganismos en la muestra.
- 55 9. El método de la reivindicación 8, donde el pH es al menos aproximadamente 11.
10. El método de cualquier reivindicación anterior, que se usa para diagnosticar el microorganismo responsable de una infección, o una enfermedad asociada con la presencia de un microorganismo.
- 60 11. El método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que se usa la misma molécula de ácido nucleico como sustrato tanto para actividad de ligasa dependiente de NAD como para actividad de ligasa dependiente de ATP.
- 65 12. Un método de detección de células fúngicas o bacterianas o ambas en una muestra que contiene células de mamífero, que comprende:

- (a) lisis de células de mamífero y cualesquiera microorganismos presentes en la muestra
- (b) tratar la muestra lisada en condiciones de pH elevado que inhiben el fondo de mamífero de ligasa dependiente de ATP pero que no afectan a ligasas dependientes de NAD y dependientes de ATP microbianas
- 5 (c) poner en contacto la muestra o una parte de la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para actividad de ligasa dependiente de ATP en la muestra,
- (d) incubar la muestra puesta en contacto de este modo en condiciones adecuadas para actividad de ligasa dependiente de ATP; y
- (e) determinar específicamente la presencia (y/o la cantidad) de una molécula de ácido nucleico ligada que
- 10 resulta de la acción de la ligasa dependiente de ATP sobre la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la presencia de hongos y/o bacterias
- (f) poner en contacto la muestra o una parte de la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para actividad de ligasa dependiente de NAD en la muestra,
- (g) incubar la muestra puesta en contacto de este modo en condiciones adecuadas para actividad de ligasa dependiente de NAD; y
- 15 (h) determinar específicamente la presencia (y/o la cantidad) de una molécula de ácido nucleico ligada que resulta de la acción de la ligasa dependiente de NAD sobre la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la presencia de bacterias solamente.

20 13. Un método de detección de células fúngicas o bacterianas o ambas en una muestra que contiene células de mamífero, que comprende:

- (a) permeabilizar selectivamente la membrana celular de células de mamífero en la muestra mientras se dejan intactos cualesquiera microorganismos en la muestra
- 25 (b) tratar la muestra en condiciones de pH elevado que inhiben el fondo de mamífero de ligasa dependiente de ATP pero que no afectan a ligasas dependientes de NAD y dependientes de ATP microbianas
- (c) lisis de cualesquiera microorganismos en la muestra para liberar ligasa dependiente de ATP y de NAD
- (d) poner en contacto la muestra o una parte de la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para actividad de ligasa dependiente de ATP en la muestra,
- 30 (e) incubar la muestra puesta en contacto de este modo en condiciones adecuadas para actividad de ligasa dependiente de ATP; y
- (f) determinar específicamente la presencia (y/o la cantidad) de una molécula de ácido nucleico ligada que resulta de la acción de la ligasa dependiente de ATP sobre la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la presencia de hongos y/o bacterias
- 35 (g) poner en contacto la muestra o una parte de la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para actividad de ligasa dependiente de NAD en la muestra,
- (h) incubar la muestra puesta en contacto de este modo en condiciones adecuadas para actividad de ligasa dependiente de NAD; y
- 40 (i) determinar específicamente la presencia (y/o la cantidad) de una molécula de ácido nucleico ligada que resulta de la acción de la ligasa dependiente de NAD sobre la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la presencia de bacterias solamente.

14. Un método de detección de células fúngicas en una muestra que contiene células de mamífero, que comprende:

- 45 (a) lisis de células de mamífero y cualesquiera microorganismos presentes en la muestra
- (b) tratar la muestra lisada en condiciones de pH elevado que inhiben la señal de fondo de mamífero de ligasa dependiente de ATP pero que no afectan a ligasas dependientes de ATP fúngicas
- (c) poner en contacto la muestra o una parte de la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para actividad de ligasa dependiente de ATP en la muestra,
- 50 (d) incubar la muestra puesta en contacto de este modo en condiciones adecuadas para actividad de ligasa dependiente de ATP; y
- (e) determinar específicamente la presencia (y/o la cantidad) de una molécula de ácido nucleico ligada que resulta de la acción de la ligasa dependiente de ATP sobre la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la presencia de hongos, donde la ausencia de una molécula de ácido nucleico ligada indica la ausencia de células fúngicas en la muestra.
- 55

15. Un método de detección de células fúngicas en una muestra que contiene células de mamífero, que comprende:

- 60 (a) permeabilizar selectivamente la membrana celular de células de mamífero en la muestra mientras se dejan intactas cualesquiera células fúngicas
- (b) tratar la muestra en condiciones de pH elevado que inhiben la señal de fondo de mamífero de ligasa dependiente de ATP pero que no afectan a ligasas dependientes de ATP fúngicas
- (c) lisis de cualesquiera células fúngicas en la muestra para liberar ligasa dependiente de ATP
- (d) poner en contacto la muestra o una parte de la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para actividad de ligasa dependiente de ATP en la muestra,
- 65 (e) incubar la muestra puesta en contacto de este modo en condiciones adecuadas para actividad de ligasa dependiente de ATP; y

(f) determinar específicamente la presencia (y/o la cantidad) de una molécula de ácido nucleico ligada que resulta de la acción de la ligasa dependiente de ATP sobre la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la presencia de hongos, donde la ausencia de una molécula de ácido nucleico ligada indica la ausencia de células fúngicas en la muestra.

5

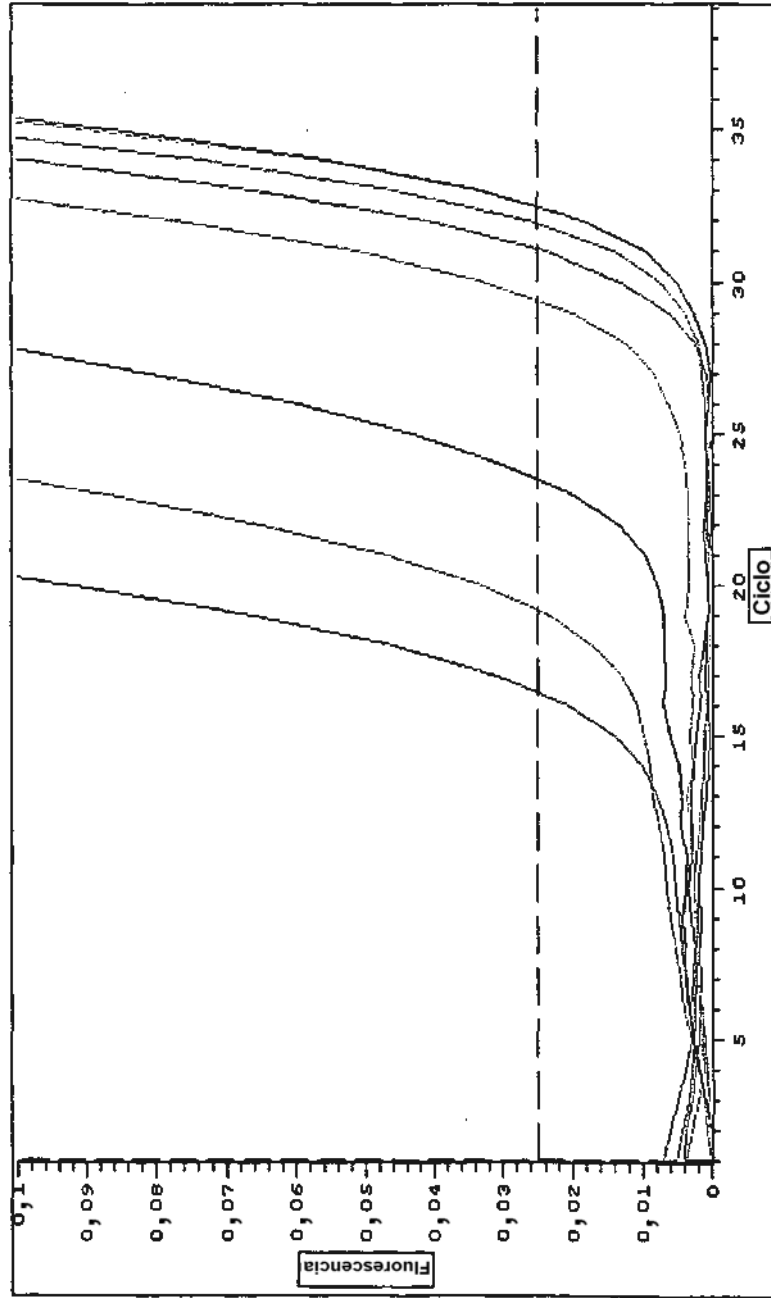


Fig. 1