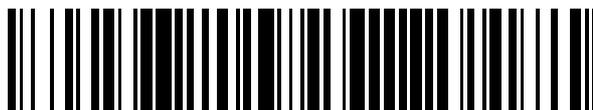


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 457**

51 Int. Cl.:

C12P 19/34 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2009** **E 09727817 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016** **EP 2271767**

54 Título: **Reacción en cadena de la polimerasa múltiple de rescate de amplicón para amplificación de dianas múltiples**

30 Prioridad:

03.04.2008 US 42259 P

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

14.10.2016

73 Titular/es:

CB BIOTECHNOLOGIES, INC. (100.0%)
601 Genome Way
Huntsville, AL 35806, US

72 Inventor/es:

HAN, JIAN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 586 457 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

Reacción en cadena de la polimerasa múltiple de rescate de amplicón para amplificación de dianas múltiples

5 Campo de la invención

La invención se refiere en general a métodos para amplificar ácidos nucleicos. Más específicamente, la invención se refiere a métodos para usar la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar múltiples secuencias de ácidos nucleicos.

10

Antecedentes de la invención

El desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permitió el uso de amplificación de ADN para una diversidad de usos, incluyendo ensayos de diagnóstico molecular. Existen dificultades asociadas con el uso de PCR para ensayos de diagnóstico diferencial molecular (MDD), no obstante. La PCR utiliza cebadores o conjuntos de cebadores, condiciones de temperatura y enzimas específicos. Las reacciones de PCR pueden contaminarse fácilmente, la unión del cebador puede requerir diferentes condiciones para diferentes cebadores, los cebadores deberían ser específicos para una secuencia diana para amplificar solamente esa secuencia diana, etc. Esto ha hecho aún más difícil amplificar múltiples secuencias a partir de una única muestra.

20

El ensayo de diagnóstico de muestras clínicas para encontrar uno o más agentes causantes de enfermedad ha requerido, en el pasado, que se aislen y cultiven microorganismos. Esto puede tardar días, sin embargo, y en muchos casos debe actuarse sobre un diagnóstico en un periodo de horas si se pretende salvar la vida del paciente. El análisis de una única muestra clínica para identificar múltiples organismos para determinar cuáles pueden ser los agentes causantes de enfermedad es el método deseado para MDD, y se han desarrollado métodos para conseguir mejor ese objetivo. Por ejemplo, se han desarrollado métodos de PCR múltiple para amplificar múltiples ácidos nucleicos dentro de una muestra para producir suficiente ADN/ARN para permitir la detección e identificación de múltiples organismos. La PCR múltiple tiene, sin embargo, desventajas. Por ejemplo, cada diana en una reacción de PCR múltiple requiere sus propias condiciones óptimas, de modo que aumentar el número de dianas requiere que las condiciones de reacción para cada diana individual sean menores que las óptimas. Además, múltiples conjuntos de cebadores de alta concentración en un sistema generan con frecuencia dímeros de cebadores o proporcionan amplificación no específica, de fondo. Esta falta de especificidad también requiere las etapas adicionales de limpieza post PCR y múltiples lavados post hibridación. Los cebadores abarrotados reducen la eficacia de amplificación requiriendo las enzimas disponibles y consumiendo sustratos. Las diferencias en la eficacia de amplificación pueden conducir a discrepancias significativas en los rendimientos de amplicón. Por ejemplo, algunos loci pueden amplificar muy eficazmente, mientras que otros amplifican muy ineficazmente o no consiguen amplificar en absoluto. Este potencial para amplificación irregular también hace de difícil a imposible realizar con precisión análisis cuantitativos de criterios de valoración.

40

Un método desvelado en el documento WO2005/038039 utiliza cebadores específicos de genes anidados usados a muy bajas concentraciones para enriquecer las dianas durante los ciclos de PCR iniciales. Posteriormente, se usan cebadores habituales para amplificar todas las dianas. La reacción completa se realiza en un tubo, sin requerirse ciclos adicionales de PCR, y no requiere instrumentos especializados, sino que puede realizarse en su lugar usando termocicladores regulares. Sin embargo, existen desventajas para este método. Por ejemplo, debido a que se usa una baja concentración de cebadores para enriquecer las dianas durante los ciclos iniciales, la sensibilidad del ensayo en última instancia se reduce, los ciclos de enriquecimiento iniciales requieren tiempo de hibridación más largo para cada ciclo, y es más probable que la enzima sea menos eficaz sobre el número de ciclos requerido para amplificar la diana.

50

Heath *et al.* (J. Med. Genet. 2000; 37: 272-280) se refiere a método de PCR múltiple fluorescente cuantitativo de cebadores universales (UPQFM). Este método se usó por Heath *et al.* para detectar reordenaciones mayores y menores del gen de receptor de lipoproteína de baja densidad.

55

Aún existe la necesidad de métodos más sensibles, más rápidos y más eficaces para amplificar ADN y/o ARN de múltiples dianas para promover la identificación rápida de esas dianas.

Sumario de la invención

60

La presente invención proporciona un método de PCR múltiple que comprende:

65

amplificar múltiples ácidos nucleicos diana usando pares de cebadores anidados específicos de diana que comprenden cebadores directo externo, directo interno, inverso interno e inverso externo para cada diana en una primera reacción de amplificación, en el que la concentración de cebador anidado es de 100-1000 nM, y en el que al menos uno de dichos cebadores internos comprende nucleótidos adicionales para proporcionar una secuencia adicional que no es específica para los ácidos nucleicos diana de modo que la amplificación del ácido nucleico diana con dicho cebador también incorporará en el amplicón resultante un sitio de unión para un cebador común que, a

diferencia de un cebador específico de diana, puede usarse para amplificar adicionalmente amplicones de ácido nucleico diana no relacionados, produciendo de este modo al menos un amplicón de ácido nucleico que contiene al menos un sitio de unión a cebador común; separar el al menos un amplicón de ácido nucleico de al menos una parte de los cebadores de la primera amplificación; y amplificar el al menos un amplicón de ácido nucleico en una segunda reacción de amplificación usando al menos un cebador común que se une con el al menos un sitio de unión a cebador común. Los ácidos nucleicos diana pueden comprender ADN y/o ARN, y pueden comprender ADN y/o ARN de origen viral, bacteriano y/o fúngico, así como ADN genómico y/o ARN de origen humano u otro animal. La amplificación puede realizarse por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o RT-PCR. La fuente de los ácidos nucleicos diana puede ser de una o más muestras clínicas, ambientales o alimentarias y el método puede usarse en una amplia diversidad de modos, incluyendo, por ejemplo, diagnóstico clínico, toma de muestras ambientales, ensayos vegetales, análisis de seguridad de alimentos, detección de trastornos genéticos y/o detección de afecciones de enfermedad. El método puede usarse para diagnósticos médicos humanos y/o veterinarios.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una ilustración del método de la invención, en la que F_o representa cebadores directos- externos; F_i representa cebadores directos- internos con un marcador de cebador directo común (secuencia de unión); C_f representa un cebador directo común; R , representa un cebador inverso interno con marcador de cebador inverso común (secuencia de unión); R_o representa un cebador inverso externo; C_r representa un cebador inverso común; F_a representa un cebador directo adicional; y R_a representa un cebador inverso adicional, situándose estos cebadores generalmente como se indica.

Descripción detallada

El inventor ha desarrollado un nuevo método para amplificar ácidos nucleicos que pueden usarse para detectar la presencia y las cantidades relativas presentes de ácidos nucleicos de virus, bacterias, hongos, células vegetales y/o animales para la evaluación de muestras médicas, ambientales, alimentarias y otras para identificar microorganismos y otros agentes dentro de esas muestras. El método se indicará en el presente documento como reacción en cadena de la polimerasa múltiple de rescate de amplicón ("arm-PCR"). En este método, las amplificaciones por PCR de ácidos nucleicos diana se realizan secuencialmente en dos sistemas de reacción diferentes. Estos sistemas pueden comprender columnas separadas, recipientes de reacción o secciones de una microplaca, por ejemplo, que contiene el ácido nucleico o los ácidos nucleicos diana, cebadores, enzimas, nucleótidos (por ejemplo, dNTP) y tampones necesarios para amplificar el ácido nucleico o los ácidos nucleicos diana para producir amplicones. Usando cebadores de alta concentración en la primera reacción de amplificación y rescatando los amplicones formados durante esa reacción para uso en una segunda reacción de amplificación en un sistema de reacción diferente, el inventor ha desarrollado un método que aumenta la sensibilidad y especificidad, reduce el tiempo necesario para producir un resultado detectable y se presta fácilmente a automatización.

Debe entenderse que la expresión "que comprende", como se usa en el presente documento, puede sustituirse con las expresiones "que consiste esencialmente en" y "que consiste en". Cuando se usa la expresión "sistema de reacción", se pretende describir un tubo Eppendorf, cámara de reacción u otro dispositivo de contención en el que se colocan los cebadores, las enzimas, los nucleótidos, los tampones y/u otros reactivos necesarios para realizar uno o más ciclos de al menos una reacción en cadena de la polimerasa. Un "sistema de reacción" diferente puede referirse por lo tanto al mismo recipiente de contención de reacción, pero un componente diferente de reactivos, particularmente cebadores, para realizar la etapa de amplificación deseada. Se entiende que un "recipiente de contención de reacción" significa un tubo, pocillo de placa u otro recipiente que tenga un volumen interno suficiente para contener cebadores, enzimas, nucleótidos, tampones y/u otros reactivos necesarios para proporcionar un sistema de reacción. Se entiende que el término "rescate" significa la separación de amplicones de al menos una parte de los cebadores de la primera amplificación. Se entiende que "PCR" significa la reacción en cadena de la polimerasa y puede incluir procedimientos de PCR y/o RT-PCR.

En la primera etapa del método, se usan cebadores anidados, de alta concentración, específicos de diana, para realizar un primer procedimiento de amplificación específico de diana. Los cebadores se eligen de secuencias conocidas de virus, bacterias, hongos y/u otras dianas para las que se desee identificación usando detección de ácido nucleico, y son específicos para esos ácidos nucleicos diana y/o ácidos nucleicos diana estrechamente relacionados. Pueden usarse cebadores específicos de diana para amplificar múltiples ácidos nucleicos diana de origen bacteriano, viral, fúngico y/u otro, por ejemplo. La concentración de cebadores anidados puede estar generalmente entre 5 y 50 pmol. Como se ilustra en la Figura 1, los cebadores seleccionados se "marcan" con nucleótidos adicionales para proporcionar una secuencia adicional que no es específica del ácido nucleico o los ácidos nucleicos diana de modo que la amplificación del ácido nucleico diana con dicho cebador también incorporará en el amplicón resultante un sitio de unión para un cebador común que, a diferencia de un cebador específico de diana, puede usarse para amplificar adicionalmente amplicones de ácido nucleico diana no relacionados (véase A y B en la Figura 1). Se realiza amplificación durante aproximadamente 10-15 ciclos, la reacción se termina y los amplicones resultantes se rescatan de la mezcla de reacción para uso en un segundo procedimiento de amplificación independiente de diana, que comprende una reacción en cadena de la polimerasa con cebadores comunes que, de una manera relativamente indiscriminada, proporcionará amplificación de secuencias de

nucleótidos no relacionadas representadas por la diversidad de amplicones rescatados de la reacción específica de diana.

Después se realiza rescate de amplicón para minimizar o eliminar los cebadores de la primera reacción, proporcionando al mismo tiempo amplicones para uso en la segunda amplificación usando cebadores comunes. Puede realizarse rescate de amplicón de diversas maneras. Por ejemplo, puede tomarse una pequeña muestra de la primera reacción de amplificación completada para proporcionar amplificaciones para la segunda amplificación. Cuando se toma una muestra pequeña, proporciona suficientes números de amplicones para la segunda amplificación, reduciendo al mismo tiempo de forma significativa (por ejemplo, diluyendo) los números de cebadores restantes de la primera amplificación. También puede realizarse rescate de amplicón retirando una parte significativa de los contenidos del sistema de reacción de la primera amplificación y añadiendo a los contenidos restantes el cebador o los cebadores comunes con la enzima o las enzimas necesarias, nucleótidos, tampón o tampones y/u otros reactivos para realizar una segunda amplificación utilizando el cebador o los cebadores comunes para amplificar los amplicones rescatados en un segundo sistema de reacción. También pueden utilizarse técnicas de separación para rescatar amplicones. Dichas técnicas pueden basarse en diferencias de tamaño entre los cebadores y amplicones, en marcadores que se han unido a los amplicones, los cebadores o ambos, u otros métodos conocidos por los expertos en la materia. Una vez separados, todos los amplicones rescatados o parte de los amplicones rescatados pueden usarse en la segunda amplificación.

La segunda amplificación se realiza en un sistema de reacción diferente, que puede utilizar o no el mismo recipiente de contención de reacción. La segunda amplificación amplifica los amplicones rescatados usando tampón nuevo, nucleótidos y cebador o cebadores comunes. Los cebadores comunes se eligen para proporcionar amplificación eficaz de los amplicones rescatados para proporcionar números significativos de copias de esos amplicones al final de la segunda amplificación.

Separando las reacciones en una primera amplificación específica de diana conducida por cebador y una segunda amplificación independiente de diana conducida por cebadores comunes, el inventor ha desarrollado un método que proporcionará especificidad mediante el uso de cebadores específicos de diana para amplificar solamente los tipos y números de ácidos nucleicos presentes de una diana particular, y sensibilidad obtenida mediante el uso de cebadores anidados, la alta concentración de cebadores específicos de diana, y el uso del cebador o los cebadores comunes para proporcionar amplificación no específica (independiente de diana) a números de copia mayores. Además, el uso de cebadores de alta concentración en una primera amplificación, seguido de rescate de amplicón, particularmente cuando el rescate de amplicón se realiza aislando una parte de la primera amplificación retirando esa parte y colocándola en un sistema de reacción nuevo o retirando una parte significativa de la primera amplificación y añadiéndole los reactivos necesarios para formar un segundo sistema de reacción para una segunda amplificación, independiente de diana, se presta a automatización. No solamente pueden realizarse estas etapas dentro de un sistema de reacción relativamente cerrado, que limita la posibilidad de contaminación, sino que la combinación de la primera amplificación, el rescate de amplicón y la segunda amplificación proporcionada por el método produce un método de detección específico, sensible, para múltiples dianas de múltiples muestras dentro de un periodo de menos de 2 horas.

Los ácidos nucleicos diana pueden aislarse de sus fuentes respectivas por diversos medios conocidos por los expertos en la materia. La detección de amplicones producidos por el método también puede realizarse por diversos medios conocidos por los expertos en la materia, tales como aplicación de los amplicones de la segunda etapa de amplificación a una matriz impresa para hibridación y detección. Las secuencias de cebadores comunes pueden incluir cualquier secuencia que proporcione eficazmente inicio eficaz de una reacción de amplificación. Dichas secuencias, y métodos para diseñarlas, se conocen por los expertos en la materia. El inventor ha descubierto que cebadores elegidos de entre SEQ ID NO: 1 (5'-TTCTTAGCGTATTGGAGTCC-3'), SEQ ID NO: 2 (5'-AATGTACAGTATTGCGTTTTG-3'), o una combinación de ambos, proporcionan resultados excepcionales en la segunda reacción de amplificación.

También se desvelan en el presente documento kits de cebadores para amplificación por PCR de nucleótidos diana, comprendiendo dichos kits cebadores elegidos de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO:

87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, y combinaciones de los mismos.

5 Puede proporcionarse un ejemplo de un método para automatización del método en el que las amplificaciones, separación y detección se realizan usando un dispositivo de "laboratorio en microplaca" en un sistema cerrado. Por ejemplo, puede realizarse una primera amplificación, específica de diana, en un primer sistema de reacción (PCR1), en el que pueden precargarse cebadores anidados, no marcados, específicos de diana de alta concentración, junto con dNTP, tampón y enzimas para realizar la amplificación por PCR o RT-PCR deseada. Después de haberse permitido que la primera amplificación continúe durante el número deseado de ciclos, los cebadores no usados pueden separarse de amplicones de nucleótidos usando electroforesis capilar por medio de electrodos activados entre la PCR1 (negativo) y una cámara de residuos (positivo) para separar los cebadores de los amplicones. Tras el movimiento de los cebadores a la cámara de residuos, el electrodo en la cámara de residuos puede desconectarse y cargarse positivamente un segundo sistema de reacción (PCR2). Los amplicones de mayor peso molecular pueden por lo tanto migrar a la cámara de PCR2, en la que se mezclan con cebadores comunes precargados y enzimas nuevas, dNTP y tampón. Después de realizarse la segunda amplificación en PCR2, los productos de PCR (amplicones) pueden moverse electroforéticamente a la cámara de detección para hibridarse con sondas fijadas covalentemente en perlas, representando la posición de las perlas en una matriz dianas moleculares específicas. Puede realizarse por lo tanto detección de diana por análisis de imágenes, por ejemplo, en el que los resultados positivos pueden indicarse por perlas brillantes, ya que los productos de amplicón pueden marcarse con colorantes fluorescentes u otros marcadores químicos/bioquímicos. Los productos de PCR y cebadores no usados pueden después retirarse y depositarse en la cámara de residuos.

25 En algunas realizaciones, una microplaca de PCR puede comprender un primer sistema de reacción conectado de forma fluida tanto con un depósito de residuos como con un segundo sistema de reacción, comprendiendo adicionalmente cada uno del depósito de residuos y el segundo sistema de reacción al menos un electrodo, comprendiendo los electrodos un medio para separar amplicones producidos a partir del primer sistema de reacción. El segundo sistema de reacción puede conectarse de forma fluida con una cámara de hibridación y detección, comprendiendo la cámara de hibridación y detección microsferas, o perlas, dispuestas de modo que la posición física de las perlas sea una indicación de la presencia de un polinucleótido diana específico en la muestra analizada por medio de la microplaca.

35 La microplaca puede estar precargada con reactivos, o los reactivos pueden añadirse por el usuario. En una realización, los reactivos precargados pueden incluir cebadores anidados, específicos de diana de alta concentración, dNTP, enzimas polimerasa y tampón o tampones para un primer sistema de reacción. El segundo sistema de reacción puede precargarse con cebadores comunes, dNTP, tampón y enzimas polimerasa. Usando la microplaca, por ejemplo, puede cargarse una muestra del paciente en al menos un primer sistema de reacción inyectando la muestra a través de material de polidimetilsiloxano (PDMS) de tipo goma, blando, que cubre toda o una parte de la microplaca. En el primer sistema de reacción, la primera serie de ciclos de PCR puede realizarse para la primera amplificación, para amplificar la secuencia diana y para incorporar secuencias de unión a cebador común en al menos una parte de los amplicones resultantes. Los productos de amplicón del primer sistema de reacción pueden después separarse por electroforesis en microplaca realizada en el canal microfluídico, estando el primer sistema de reacción conectado de forma fluida a al menos un segundo sistema de reacción y al menos un depósito de residuos, comprendiendo adicionalmente cada uno de los segundos sistemas de reacción y depósitos de residuos al menos un electrodo, promoviendo los electrodos el movimiento de los amplicones y cebadores no usados de la primera reacción de amplificación a un segundo sistema de reacción y un depósito de residuos, respectivamente. Los amplicones movidos a un segundo sistema de reacción de PCR pueden después someterse a una segunda amplificación usando cebadores comunes para amplificar amplicones en los que se ha incorporado al menos un sitio de unión a cebadores común durante la primera amplificación en el primer sistema de reacción. Después de completar los ciclos de amplificación deseados en el segundo sistema de reacción, los productos de PCR (amplicones) pueden moverse por electroforesis microfluídica del segundo sistema de reacción a al menos una cámara de hibridación y detección, estando un segundo sistema de reacción conectado de forma fluida a al menos una cámara de hibridación y detección. Dentro de la cámara de hibridación y detección puede haber microsferas, o perlas, que forman una matriz, indicando la posición física de las perlas la diana específica para detección. Una matriz de perlas puede comprender de aproximadamente 1 a aproximadamente 200 dianas, estando cada diana representada por de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 perlas. Si una diana específica no está representada por los cebadores apropiados en la primera reacción de amplificación, puede usarse una máscara de software para cubrir las perlas relacionadas de modo que no interfieran con el análisis. La cámara de hibridación y detección puede estar conectada de forma fluida con al menos una cámara de lavado y al menos una cámara de detección, comprendiendo la cámara de lavado reactivos para ayudar en la retirada de cebadores y sondas no usados, marcados, para reducir el fondo, y comprendiendo la cámara de detección reactivos tales como estreptavidina-puntos cuánticos o estreptavidina-PE para marcar ADN amplificado para análisis de imágenes.

65 El método de la invención también puede realizarse usando un termociclador de PCR convencional o modificado. Por ejemplo, pueden cargarse nucleótidos, tampones y cebadores en tubos de PCR convencionales en un primer termociclador para la primera amplificación. Los contenidos del tubo pueden retirarse por medios manuales o automáticos para el rescate de los amplicones, y los amplicones recién aislados pueden colocarse en un segundo

tubo de amplificación en el que se introducen tampones, nucleótidos y enzima o enzimas para realizar la segunda amplificación en el primer o un segundo termociclador, programándose el termociclador para ciclar la reacción a través de las temperaturas apropiadas durante los tiempos deseados. Debería entenderse que los tiempos de ciclación y el número de ciclos pueden variar y pueden determinarse por los expertos en la materia.

El uso de cebadores anidados parece mejorar la afinidad de unión de la polimerasa, produciendo significativamente más amplicones durante la primera reacción de amplificación. Estos amplicones pueden producirse a partir de una diversidad de polinucleótidos diana dentro de la muestra, usando una alta concentración de cebadores específicos de diana. Incorporando en al menos una parte de los amplicones durante la primera amplificación al menos un sitio de unión para al menos un cebador común, es posible entonces, durante la segunda amplificación, aumentar aún más significativamente el número de amplicones producidos como resultado del proceso de amplificación. Se eligen cebadores comunes por su afinidad de unión y capacidad para cebar la amplificación durante la segunda amplificación. Mediante el uso de este método de tres etapas (primera etapa de amplificación, rescate de amplicón, segunda etapa de amplificación), es posible por lo tanto aumentar tanto la especificidad como la sensibilidad del proceso de PCR para identificar uno o más organismos diana a partir de una muestra que contiene múltiples organismos. El inventor ha descubierto que este método aumenta significativamente tanto la especificidad como la sensibilidad, en comparación con métodos de PCR previamente descritos.

La automatización del proceso de amplificación-separación-amplificación permite la identificación de un número significativo de dianas en un periodo de 1-3 horas, y se ha mostrado que es eficaz para amplificar ácidos nucleicos diana de múltiples microorganismos en un periodo de 1,5 horas, permitiendo la identificación rápida de un posible agente causante de enfermedad para permitir realizar etapas inmediatas para el tratamiento, el aislamiento, la implementación de planes de salud públicos para limitar la exposición a agentes de enfermedad causantes de epidemias, agentes de bioterrorismo, etc.

Las muestras pueden prepararse para las reacciones de PCR por diversos medios conocidos por los expertos en la materia. Estos métodos pueden proporcionarse como instrucciones proporcionadas con kits de PCR que contienen tampones y enzimas, por ejemplo, o pueden obtenerse instrucciones de diversas publicaciones periódicas o de patentes. Los expertos en la materia también conocen métodos para manipular muestras antes de la preparación para las etapas de amplificación por PCR, y pueden variar dependiendo de la fuente de la muestra.

Las enzimas usadas para las amplificaciones están disponibles en el mercado y pueden incluir, por ejemplo, mezcla Qiagen Multiplex o mezcla Qiagen Hot Start. También están disponibles en el mercado tampones, así como nucleótidos (dNTP) y otros reactivos. Se fabrican termocicladores por y se distribuyen por una diversidad de compañías incluyendo, por ejemplo, Applied Biosystems y Bio-Rad. También puede obtenerse kits de reactivos de PCR de diversas fuentes, incluyendo, por ejemplo, Qiagen (Gaithersburg, Maryland).

La invención proporciona un método que es adecuado para identificar un único microorganismo o múltiples microorganismos, por ejemplo, a partir de una muestra que puede contener una diversidad de microorganismos. Dicha muestra puede obtenerse de una muestra de ensayo clínica (por ejemplo, sangre, saliva, tejido), de una muestra ambiental (por ejemplo, agua, suero), de una muestra alimentaria u otra fuente. Los microorganismos que pueden identificarse pueden incluir diversos géneros y especies de bacterias, virus y otros organismos que contienen ADN y/o ARN.

Para la identificación de microorganismos, puede utilizarse un método tal como la tecnología Luminex xMAP®, y puede incorporarse la etapa de detección en el sistema automático junto con las amplificaciones de modo que el sistema automático consiga la primera amplificación, el rescate de amplicón, la segunda amplificación y la detección. En el sistema Luminex xMAP®, por ejemplo, las microesferas en suspensión proporcionan soporte sólido para unión a sondas, también conocido como una "microplaca líquida" o "matriz de suspensión". Con tecnología xMAP®, tienen lugar reacciones moleculares en la superficie de microesferas clasificadas por color. Para cada patógeno, pueden unirse covalentemente sondas de captura específicas de diana a un conjunto específico de microesferas codificadas por color. Se capturan productos de PCR marcados por las sondas de captura unidas a perlas en una suspensión de hibridación. Un sistema microfluídico suministra la mezcla de reacción de hibridación de suspensión a un dispositivo de detección de láser doble. Un láser rojo identifica cada perla por su código de color, mientras que un láser verde detecta la señal de hibridación asociada con cada perla. Se usa software para recoger los datos y presentar los resultados en segundos. Los datos se presentan en forma de intensidad de fluorescencia media (IFM).

El método descrito en el presente documento permite a un experto en la materia acoplar la amplificación y detección de alta especificidad, alta sensibilidad, en un sistema automático. Usando dicho sistema, es posible analizar una o más muestras químicas en un periodo de tiempo más corto con mayor sensibilidad de lo que ha sido posible previamente con sistemas existentes.

La invención puede describirse adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos no limitantes:

Ejemplo 1

Se diseñó una reacción de arm-PCR para amplificar y detectar patógenos responsables de enfermedades portadas por alimentos. El gen diana usado para cada patógeno se enumera en la Tabla 1 a continuación.

5

Tabla 1

Organismo diana	Gen diana
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	rfbE
<i>E. coli</i>	eac
<i>Salmonella</i>	invA
<i>Campylobacter jejuni</i> (1) y <i>coli</i> (2)	ceuE
<i>Shigella</i>	ipaH
<i>Yersinia enterocolitica</i>	yst
<i>Vibrio cholerae</i>	OMPW
Toxina termolábil de <i>E. coli</i> (ETEC)	LT
Toxina shiga de <i>E. coli</i> (STEC)	Stx
Toxina del cólera de <i>Vibrio cholerae</i>	Ctx
Toxina termoestable de <i>E. coli</i> (ETEC)	ST
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	tlh

Se enumeran cebadores generados para cada diana en la Tabla 2. SupF y SupR indican secuencias de cebadores comunes. Las secuencias de cebadores comunes que forman el marcador para cebadores específicos de diana se muestran en negrita. F_o, F_i, R_i y R_o indican los cebadores anidados para cada diana de amplificación, mientras que el oligo D indica la sonda de detección que hibrida con una secuencia específica dentro del amplicón. La sonda se une covalentemente con una perla codificada por colores para la detección con el instrumento Luminex xMAP®.

10

Tabla 2

Nombre del cebador	Secuencia del cebador	SEQ ID NO:
Sup F	TTCTTAGCGTATTGGAGTCC	1
Sup R	/5Biosg/AATGTACAGTATTGCGTTTTG	2
ceuE Fo	CAACAAGTTGATTTTGAAGC	3
ceuE Fi	TTCTTAGCGTATTGGAGTCC ATTAATGCTTTAAAACCTGATC	4
ceuE Ri	AATGTACAGTATTGCGTTTTG TTAAAAAATTTGCATTATCAAG	5
ceue Ro	ACCATAAAGTTTTGCAACGC	6
ceuE D1	/5AmMC12/CTC CAA CTT TAT TTG TAG	7
ceuE2 Fo	CAACAAGTTGATTTTGAAGC	8
ceuE2 Fi	TTCTTAGCGTATTGGAGTCC ATTAATGCTTTAAAACCTGATC	9
ceuE2 Ri	AATGTACAGTATTGCGTTTTG TTAAAAAATTTGCATTATCAAG	10
ceuE2 Ro	ACCATAAAGTTTTGCAACGC	11
ceuE D2	/5AmMC12/CTC CAA CTA TGT TTG TAG	12
rfbE2 Fo	AGGATTAGCTGTACATAGGC	13
rfbE2 Fi	TTCTTAGCGTATTGGAGTCC GGCATGACGTTATAGGCTAC	14
rfbE2 Ri	AATGTACAGTATTGCGTTTTG TGTTCTAACTGGGCTAATCC	15
rfbE2 Ro	CGTGATATAAAATCATCAGC	16
rfbE2 D	/5AmMC12/GACAAATATCTGCGCTGCTAT	17
eac1 Fo	CGATTACGCGAAAGATACCG	18
eac1 Fi	TTCTTAGCGTATTGGAGTCC CCAGGCTTCGTCACAGTTGC	19

ES 2 586 457 T3

<i>Nombre del cebador</i>	<i>Secuencia del cebador</i>	<i>SEQ ID NO:</i>
eac1 Ri	AATGTACAGTATTGCGTTTTGCCAGTGA ACTACCGTCAAAG	20
eac1 Ro	TTTCGGAATCATAGAACGG	21
eac1 D	/5AmMC12/TTATGGAACGGCAGAGGTTA	22
invA1 Fo	AACAGTGCTCGTTTACGACC	23
invA1 Fi	TTCTTAGCGTATTGGAGTCC CTGGTACTAATGGTGATGATC	24
invA1 Ri	AATGTACAGTATTGCGTTTTG GCGATCAGGAAATCAACCAG	25
invA1 Ro	TGTAGAACGACCCCATAAAC	26
invA1 D	/5AmMC12/TCGTCATTCCATTACCTACC	27
ipaH2 Fo	GGATTCCGTGAACAGGTCCG	28
ipaH2 Fi	TTCTTAGCGTATTGGAGTCC GCATGGCTGGAAAACTCAG	29
ipaH2 Ri	AATGTACAGTATTGCGTTTTG TCAGTGGCATCAGCAGCAAC	30
ipaH2 Ro	CGCGACACGGTCCTCACAGC	31
ipaH2 D	/5AmMC12/AGCTTCGACAGCAGTCTTTC	32
yst Fo	GAAAAAGATAGTTTTTGTTTC	33
yst Fi	TTCTTAGCGTATTGGAGTCC ATGCTGTCTTCATTTGGAGC	34
yst Ri	AATGTACAGTATTGCGTTTTG GTGCGATAATGCATCACTG	35
yst Ro	CTTGTATACCTCAGCGGTTA	36
yst D	/5AmMC12/CGGCCAAGAAACAGTTTCAG	37
ompW Fo	CAAGTTTGTGTGATTTTTGTG	38
ompW Fi	TTCTTAGCGTATTGGAGTCC CACAAAGATAACAACAT AGCCC	39
ompW Ri	AATGTACAGTATTGCGTTTTG TACGGCTAGGCAAATGGTTT	40
ompW Ro	GTGAGCAAATACAGGAGCGG	41
ompW D1	/5AmMC12/AGGAAAACGTCATGAAAC	42
ompW2 Fo	GTGAGTTGGCAGTTAATAGC	43
ompW2 Fi	TTCTTAGCGTATTGGAGTCC GGTTAACGCTTGGCTATATG	44
ompW2 Ri	AATGTACAGTATTGCGTTTTG GTAGAAATCTTATGTGAAAA	45
ompW2 Ro	CTACCTAACTCACCACCAGA	46
ompW D2	/5AmMC12/CTGACAACATCAGTTTTG	47
LT1 Fo	TCGATAGAGGAACTCAAATG	48
LT1 Fi	TTCTTAGCGTATTGGAGTCC TCTTTATGATCACGCGAGAG	49
LT1 Ri	AATGTACAGTATTGCGTTTTG GAAACATATCCGTCATCATA	50
LT1 Ro	CTTCTCAAACCTAAGAGAAGT	51
LT1 D	/5AmMC12/GAACACAAACCGGCTTT	52
LT2 Fo	TATGTTTAATGTTAATGATG	53
LT2 Fi	TTCTTAGCGTATTGGAGTCC ATACAGCCCTCACCCATATG	54
LT2 Ri	AATGTACAGTATTGCGTTTTG CTGAGAATATGGTATTCCAC	55
LT2 Ro	CCTAAATTAACACGATACCA	56
LT2 D	/5AmMC12/AGGAGGTTTCTGCGTTA	57
stx Fo	CATATATCTCAGGGGACCAC	58
stx Fi	TTCTTAGCGTATTGGAGTCC GTGTCTGTTATTAACCACAC	59
stx Ri	AATGTACAGTATTGCGTTTTG GTCAAACGCGCCTGATAGA	60
stx Ro	TTATTTTGCTCAATAATCAG	61
stx D	/5AmMC12/GGGCAGTTATTTTGCTG	62

ES 2 586 457 T3

Nombre del cebador	Secuencia del cebador	SEQ ID NO:
stx2 Fo	ACAACGGTTTCCATGACAAC	63
stx2 Fi	TTCTTAGCGTATTGGAGTCCGGACAGCAGTTATACCACTC	64
stx2 Ri	AATGTACAGTATTGCGTTTTGGAAACCAGTGAGTGACGACT	65
stx2 Ro	CCATTAACGCCAGATATGAT	66
stx2 D	/5AmMC12/ACGTTCCGGAATGCAAT	67
ctx1 Fo	CAGATTCTAGACCTCCTGATG	68
ctx1 Fi	TTCTTAGCGTATTGGAGTCCAGCAGTCAGGTGGTCTTATG	69
ctx1 Ri	AATGTACAGTATTGCGTTTTGCATTTGAGTACCTCGGTCAA	70
ctx1 Ro	CTTGCATGATCATAAAGGTTG	71
ctx1 D	/5AmMC12/AGAGGACAGAGTGAGTAC	72
ctx2 Fo	GGGCTACAGAGATAGATATTAC	73
ctx2 Fi	TTCTTAGCGTATTGGAGTCCAGATATTGCTCCAGCAGCAG	74
ctx2 Ri	AATGTACAGTATTGCGTTTTGCATGATGAATCCACGGCTCT	75
ctx2 Ro	CGATGATCTTGGAGCATTCC	76
ctx2 D	/5AmMC12/TATGGATTGGCAGGTTTC	77
ST Fo	CTTTTTACCTTTTCGCTCAG	78
ST Fi	TTCTTAGCGTATTGGAGTCCGATGCTAAACCAGCAGGGTC	79
ST Ri	AATGTACAGTATTGCGTTTTGCAATTCACAGCAGTAATTGC	80
ST Ro	CCGGTACAAGCAGGATTACA	81
ST D	/5AmMC12/AGTAGTCTGAAAGCATG	82
tlh1 Fo	GATTCGTTTGACGGACGCAG	83
tlh1 Fi	TTCTTAGCGTATTGGAGTCCCATGTTGATGACACTGCCAG	84
tlh1 Ri	AATGTACAGTATTGCGTTTTGCGATCTCTTCTTGTGTTGAG	85
tlh1 Ro	CAAGCACTTTTCGCACGAATT	86
tlh1 D	/5AmMC12/AAAGCGCCTCAGTTTAAG	87
tlh2 Fo	AAGAGCACGGTTTCGTGAAC	88
tlh2 Fi	TTCTTAGCGTATTGGAGTCCGACATCAACCGCTCATCGTC	89
tlh2 Ri	AATGTACAGTATTGCGTTTTGCAGAACACAACTTCTCAGC	90
tlh2 Ro	CGGTGAGTTGCTGTTGTTGG	91
tlh2 D	/5AmMC12/ATGTACACCCACGCATTG	92

Una mezcla de cebadores que contiene 10 pmol de cada uno de los cebadores F_o, F_i, R_i y R_o en la Tabla 2. Para esta amplificación, solamente se incluyó un molde diana, *Campylobacter jejuni*. El molde se diluyó a 10 pg/μl, 1 pg/μl, 0,1 pg/μl, 0,01 pg/μl y 0,001 pg/μl. Se usó un kit de PCR Qiagen Multiplex para preparar una muestra que contenía 44 μl de mezcla Multiplex, 5 μl de mezcla de cebadores y 1 μl de molde. Las condiciones de ciclación fueron las siguientes:

- 5
- 95 °C durante 15 minutos
- 94 °C durante 15 segundos
- 10 55 °C durante 15 segundos
- 72 °C durante 15 segundos
- Estos tres ciclos se repitieron, 2-20 veces (15 veces en total para este ejemplo)
- 94 °C durante 15 segundos
- 70 °C durante 15 segundos
- 15 Estos dos ciclos se repitieron, 6 veces en total para este ejemplo.
- 72 °C durante 3 minutos
- Mantenimiento a 4 °C

- 20 Tras completar la primera amplificación como se ha descrito anteriormente, se añadieron muestras a columnas de Millipore con un punto de corte de peso molecular de 50 kd y se centrifugaron durante 11 minutos a 13 k RPM para retirar una parte sustancial de los cebadores (peso molecular generalmente por debajo de 30 kd), rescatando

amplicones con un peso molecular generalmente por encima de 70 kd sobre el filtro. La columna se invirtió y se centrifugó en un nuevo tubo de recogida durante aproximadamente 30 segundos para recuperar el amplicón para el siguiente ciclo de amplificación.

5 Se añadieron 10 µl de muestra del tubo de recogida a 15 µl de mezcla Multiplex, 1 µl de cebadores comunes, 10 pmol para el cebador común directo y 40 pmol para el cebador inverso común y 14 µl de H₂O. Después las muestras se colocaron en un termociclador (Applied Biosystems, Foster City, California) y se procesaron a través de los siguientes ciclos:

10 95 °C durante 15 minutos (para activar por calor la enzima)
 94 °C durante 15 segundos
 55 °C durante 15 segundos x 30 ciclos
 72 °C durante 15 segundos
 72 °C durante 3 minutos
 15 Mantenimiento a 4 °C

Se realizó hibridación usando 5 µl de producto de PCR añadido a 35 µl de mezcla de perlas (microesferas) y se permitió que hibridara a 52 °C durante 10 minutos. Después de 10 minutos, se añadieron 10 µl de SA-PE (2x SA-PE, Genaco Biomedical Sciences, Inc, se diluyó 1:2 con TMAC 1X) a cada muestra y se permitió que hibridara a 52 °C durante 5 minutos. Después de 5 minutos, se añadieron 120 µl de tampón de terminación a 52 °C a cada muestra y las muestras se analizaron usando una máquina Luminex200.

Se muestran en la Tabla 3 números de intensidad de fluorescencia media (IFM) para reacciones de arm-PCR y tem-PCR.

25

Tabla 3

Concentración de molde	Cebadores anidados de alta concentración - IFM	Cebadores anidados de baja concentración - IFM
10 pg/µl	693	999
1 pg/µl	575	633
0,1 pg/µl	573	281
0,01 pg/µl	430	126
0,001 pg/µl	298	68
Blanco	64	59

Estos resultados indican que, aunque la señal es mayor a altas concentraciones de molde cuando se usan cebadores anidados de baja concentración, la sensibilidad del método de cebadores anidados de alta concentración es aproximadamente dos log mayor. Si el punto de corte de señal positivo es 250 IFM, por ejemplo, este método puede detectar tan poco como 0,001 pg/µl, mientras que los resultados del método previamente descrito en la técnica para cebadores anidados de baja concentración son negativos entre 0,1 pg/µl y 0,01 pg/µl. El tiempo requerido para el proceso completo es de aproximadamente 210 minutos cuando se usan cebadores anidados de baja concentración y de aproximadamente 150 minutos cuando se usan cebadores anidados de alta concentración.

35

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> HudsonAlpha Institute for Biotechnology Han, Jian
- 40 <120> Método para Amplificar Ácidos Nucleicos
- <130> HAI-001
- <160> 92
- 45 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 20
- 50 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Cebador

<400> 6
 accataaagt ttgcaacgc 20

5 <210> 7
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> *Campylobacter jejuni*

10 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1)..(18)

15 <400> 7
 ctccaacttt attgtag 18

20 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Campylobacter coli*

25 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (20)

<400> 8
 caacaagttg atttgaagc 20

30 <210> 9
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> *Campylobacter coli*

35 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1)..(42)

40 <400> 9
 ttcttagcgt attggagtcc attaagctt taaacctga tc 42

45 <210> 10
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> *Campylobacter coli*

<220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (43)

50 <400> 10
 aatgtacagt attgcgtttt gttaaaaaat tgcattatc aag 43

55 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Campylobacter coli*

<220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (20)

60 <400> 11
 accataaagt ttgcaacgc 20

65 <210> 12
 <211> 18

<212> ADN
 <213> *Campylobacter coli*

 <220>
 5 <221> unión_cebador
 <222> (1)..(18)

 <400> 12
 10 ctccaactat gttttag 18

 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 15
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (20)
 20
 <400> 13
 20 aggattagct gtacataggc 20

 <210> 14
 <211> 40
 25 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (40)
 30
 <400> 14
 35 ttcttagcgt attggagtcc ggcattgacgt tataggctac 40

 <210> 15
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 40
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (41)
 45
 <400> 15
 45 aatgtacagt attgcgtttt gtgttctaac tgggctaac c 41

 <210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 50
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (20)
 55
 <400> 16
 55 cgtgatataa aatcatcagc 20

 <210> 17
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 60
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1)..(21)
 65

ES 2 586 457 T3

<400> 17
 gacaaatattc tgcgctgcta t 21

 5 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

 10 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1)..(20)

 15 <400> 18
 cgattacgcg aaagataccg 20

 20 <210> 19
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

 25 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (40)

 30 <400> 19
 ttcttagcgt attggagtcc ccaggcttcg tcacagttgc 40

 35 <210> 20
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

 40 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (41)

 45 <400> 20
 aatgtacagt attgcgtttt gccagtgaac taccgtaaaa g 41

 50 <210>21
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

 55 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (20)

 60 <400> 21
 ttttcggaat catagaacgg 20

 65 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (20)

 <400> 22
 ttatggaacg gcagaggtta 20

 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN

<213> *Salmonella typhimurium*
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1)..(20)
 5
 <400> 23
 aacagtgctc gtttacgacc 20
 10
 <210> 24
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> *Salmonella typhimurium*
 15
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (41)
 20
 <400> 24
 ttcttagcgt attggagtcc ctggtactaa tggatgat c 41
 25
 <210> 25
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> *Salmonella typhimurium*
 30
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (41)
 <400> 25
 aatgtacagt attgcgtttt ggcatcagg aatcaacca g 41
 35
 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Salmonella typhimurium*
 40
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1)..(20)
 <400> 26
 tgtagaacga ccccataaac 20
 45
 <210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Salmonella typhimurium*
 50
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1)..(20)
 <400> 27
 tcgtcattcc attacctacc 20
 55
 <210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Shigella flexneri*
 60
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (20)
 65

<400> 28
 ggattccgtg aacaggtcgc 20

5
 <210> 29
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> *Shigella flexneri*

10
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (40)

15
 <400> 29
 ttcttagcgt attggagtcc gcatggctgg aaaaactcag 40

20
 <210> 30
 <211>41
 <212> ADN
 <213> *Shigella flexneri*

25
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (41)

30
 <400> 30
 aatgtacagt attgcgtttt gtcagtggca tcagcagcaa c 41

35
 <210>31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Shigella flexneri*

40
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (20)

45
 <400> 31
 cgcgacacgg tctcacagc 20

50
 <210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Shigella flexneri*

55
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (20)

60
 <400> 32
 agcttcgaca gcagtctttc 20

65
 <210> 33
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Yersinia enterocolitica*

<220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1)..(20)

<400> 33
 gaaaaagata gttttgttc 20

<210> 34
 <211> 40
 <212> ADN

<213> *Yersinia enterocolitica*
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (40)
 5
 <400> 34
 ttcttagcgt attggagtcc atgctgtctt catttggagc 40
 10
 <210> 35
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> *Yersinia enterocolitica*
 15
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (41)
 20
 <400> 35
 aatgtacagt attgcgtttt ggtgtcgata atgcatcact g 41
 25
 <210> 36
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Yersinia enterocolitica*
 30
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1)..(20)
 35
 <400> 36
 cttgtatacc tcagcggtta 20
 40
 <210> 37
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Yersinia enterocolitica*
 45
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (20)
 50
 <400> 37
 cggccaagaa acagtttcag 20
 55
 <210> 38
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Vibrio cholerae*
 60
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (21)
 65
 <400> 38
 caagtttgtg tgattttgt g 21
 <210> 39
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> *Vibrio cholerae*
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1)..(42)

<400> 39
 ttcttagcgt attggagtcc cacaaagata acaacatagc cc 42

5
 <210> 40
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> *Vibrio cholerae*

10
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (41)

15
 <400> 40
 aatgtacagt attgcgtttt gtacggctag gcaaatggtt t 41

20
 <210>41
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Vibrio cholerae*

25
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1)..(20)

30
 <400> 41
 gtgagcaaat acaggagcgg 20

35
 <210> 42
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> *Vibrio cholerae*

40
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1)..(18)

45
 <400> 42
 aggaaaacgt catgaaac 18

50
 <210> 43
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Vibrio cholerae*

55
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (20)

60
 <400> 43
 gtgagttggc agttaatagc 20

65
 <210> 44
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> *Vibrio cholerae*

70
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (40)

75
 <400> 44
 ttcttagcgt attggagtcc ggftaacgct tggctatatg 40

80
 <210> 45
 <211> 41
 <212> ADN

<213> *Vibrio cholerae*
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1)..(41)
 5
 <400> 45
 aatgtacagt attgcgtttt ggtagaaatc ttatgtgaaa a 41
 10
 <210> 46
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Vibrio cholerae*
 15
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1)..(20)
 20
 <400> 46
 ctacctaact caccaccaga 20
 25
 <210> 47
 <211> 18
 <212> AND
 <213> *Vibrio cholerae*
 30
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (18)
 35
 <400> 47
 ctgacaacat cagttttg 18
 40
 <210> 48
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 45
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (20)
 50
 <400> 48
 tcgatagagg aactcaaag 20
 55
 <210> 49
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 60
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (40)
 65
 <400> 49
 ttcttagcgt attggagtcc tctttatgat cacgcgagag 40
 <210> 50
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (41)

ES 2 586 457 T3

<400> 50
 aatgtacagt attgcgtttt ggaaacatat ccgatcatcat a 41

5
 <210> 51
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

10
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (20)

15
 <400>51
 cttctcaaac taagagaagt 20

20
 <210> 52
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

25
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (17)

30
 <400> 52
 gaacacaaac cggcttt 17

35
 <210> 53
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

40
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (20)

45
 <400> 53
 tatgtttaat gtaaatgatg 20

50
 <210> 54
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

55
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (40)

60
 <400> 54
 ttcttagcgt attggagtcc atacagccct cacccatgatg 40

65
 <210> 55
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

70
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1)..(41)

75
 <400> 55
 aatgtacagt attgcgtttt gctgagaata tggattcca c 41

80
 <210> 56
 <211> 20
 <212> ADN

<213> *Escherichia coli*
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1)..(20)
 5
 <400> 56
 ccaaaattaa cacgatacca 20
 10
 <210> 57
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 15
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1)..(17)
 20
 <400> 57
 aggaggtttc tgcgta 17
 25
 <210> 58
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 30
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (20)
 35
 <400> 58
 catatatctc aggggaccac 20
 40
 <210> 59
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 45
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (40)
 50
 <400> 59
 ttcttagcgt attggagtcc gtgtctgta ttaaccacac 40
 55
 <210> 60
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 60
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (41)
 65
 <400> 60
 aatgtacagt attgcgtttt ggtcaaaacg cgcctgatag a 41
 70
 <210> 61
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 75
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (20)

	<400> 61 ttatttgct caataatcag	20
5	<210> 62 <211> 17 <212> ADN <213> <i>Escherichia coli</i>	
10	<220> <221> unión_cebador <222> (1)..(17)	
15	<400> 62 gggcagtat tttgctg	17
20	<210> 63 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Escherichia coli</i>	
25	<220> <221> unión_cebador <222> (1)..(20)	
30	<400> 63 acaacggttt ccatgacaac	20
35	<210> 64 <211> 40 <212> ADN <213> <i>Escherichia coli</i>	
40	<220> <221> unión_cebador <222> (1)..(40)	
45	<400> 64 ttcttagcgt attggagtcc ggacagcagt tataaccactc	40
50	<210> 65 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Escherichia coli</i>	
55	<220> <221> unión_cebador <222> (1) .. (41)	
60	<400> 65 aatgtacagt attgcgtttt ggaaaccagt gagtgacgac t	41
65	<210> 66 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Escherichia coli</i>	
	<220> <221> unión_cebador <222> (1) .. (20)	
	<400> 66 ccattaacgc cagatatgat	20
	<210> 67 <211> 18 <212> ADN	

<213> *Escherichia coli*
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (18)
 5
 <400> 67
 acgttccgga atgcaaat 18
 10
 <210> 68
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Vibrio cholerae*
 15
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (21)
 20
 <400> 68
 cagattctag acctcctgat g 21
 25
 <210> 69
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> *Vibrio cholerae*
 30
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1)..(40)
 35
 <400> 69
 ttcttagcgt attggagtcc agcagtcagg tggcttatg 40
 40
 <210> 70
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> *Vibrio cholerae*
 45
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1)..(41)
 50
 <400> 70
 aatgtacagt attgcgttt gcatttgagt acctcggta a 41
 55
 <210> 71
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Vibrio cholerae*
 60
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (21)
 65
 <400> 71
 cttgcatgat cataaaggtt g 21
 <210> 72
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> *Vibrio cholerae*
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1)..(18)

	<400> 72 agaggacaga gtgagtac	18
5	<210> 73 <211> 22 <212> ADN <213> <i>Vibrio cholerae</i>	
10	<220> <221> unión_cebador <222> (1) .. (22)	
15	<400> 73 gggctacaga gatagatatt ac	22
20	<210> 74 <211> 40 <212> ADN <213> <i>Vibrio cholerae</i>	
25	<220> <221> unión_cebador <222> (1) .. (40)	
30	<400> 74 ttcttagcgt attggagtcc agatattgct ccagcagcag	40
35	<210> 75 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Vibrio cholerae</i>	
40	<220> <221> unión_cebador <222> (1) .. (41)	
45	<400> 75 aatgtacagt attgcgtttt gcatgatgaa tccacggctc t	41
50	<210> 76 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Vibrio cholerae</i>	
55	<220> <221> unión_cebador <222> (1)..(20)	
60	<400> 76 cgatgatctt ggagcattcc	20
65	<210> 77 <211> 18 <212> ADN <213> <i>Vibrio cholerae</i>	
70	<220> <221> unión_cebador <222> (1) .. (18)	
75	<400> 77 tatggattgg caggtttc	18
80	<210> 78 <211> 20 <212> ADN	

<213> *Escherichia coli*
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1)..(20)
 5
 <400> 78
 cttttcacc ttcgctcag 20
 10
 <210> 79
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 15
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (40)
 20
 <400> 79
 ttctagcgt attggagtcc gatgctaac cagcagggtc 40
 25
 <210> 80
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 30
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1)..(41)
 35
 <400> 80
 aatgtacagt attgcgttt gcaattcaca gcagtaattg c 41
 40
 <210> 81
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 45
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1)..(20)
 50
 <400> 81
 ccggtacaag caggattaca 20
 55
 <210> 82
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 60
 <220>
 <221> prim-bind
 <222> (1)..(18)
 65
 <400> 82
 agtagtcctg aaagcatg 18
 70
 <210> 83
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Vibrio parahaemolyticus*
 75
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (20)

	<400> 83 gattcgttg acggacgcag	20
5	<210> 84 <211> 40 <212> ADN <213> <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	
10	<220> <221> unión_cebador <222> (1) .. (40)	
15	<400> 84 ttcttagcgt attggagtcc catgttgatg acaactgccag	40
20	<210> 85 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	
25	<220> <221> unión_cebador <222> (1)..(41)	
30	<400> 85 aatgtacagt attgcgttt gcgatctctt ctgtgttga g	41
35	<210> 86 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	
40	<220> <221> unión_cebador <222> (1) .. (20)	
45	<400> 86 caagcacttt cgcacgaatt	20
50	<210> 87 <211> 18 <212> ADN <213> <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	
55	<220> <221> unión_cebador <222> (1)..(18)	
60	<400> 87 aaagcgctc agttaaag	18
65	<210> 88 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	
70	<220> <221> unión_cebador <222> (1)..(20)	
75	<400> 88 aagagcacgg ttcgtgaac	20
80	<210> 89 <211> 40 <212> ADN	

<213> *Vibrio parahaemolyticus*
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1)..(40)
 5
 <400> 89
 ttcttagcgt attggagtcc gacatcaacc gctcatcgtc 40
 10
 <210> 90
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> *Vibrio parahaemolyticus*
 15
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1) .. (41)
 20
 <400> 90
 aatgtacagt attgcgtttt gcagaacaca aacttctcag c 41
 25
 <210> 91
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Vibrio parahaemolyticus*
 30
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1)..(20)
 35
 <400> 91
 cgggtgagttg ctggtgttg 20
 40
 <210> 92
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> *Vibrio parahaemolyticus*
 45
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1)..(18)
 <400> 92
 atgtacaccc acgcattg 18

REIVINDICACIONES

1. Un método de PCR múltiple que comprende:

5 amplificar múltiples ácidos nucleicos diana usando pares de cebadores anidados específicos de diana que comprenden cebadores directo externo, directo interno, inverso interno e inverso externo para cada diana en una primera reacción de amplificación, en el que la concentración de cebadores anidados es de 100-1000 nM, y en el que al menos uno de dichos cebadores internos comprende nucleótidos adicionales para proporcionar una secuencia adicional que no es específica para los ácidos nucleicos diana, de modo que la amplificación del ácido nucleico diana con dicho cebador también incorporará en el amplicón resultante un sitio de unión para un cebador común que, a diferencia de un cebador específico de diana, puede usarse para amplificar adicionalmente amplicones de ácido nucleico diana no relacionados, produciendo de este modo al menos un amplicón de ácido nucleico que contiene al menos un sitio de unión a cebador común;

10 separar el al menos un amplicón de ácido nucleico de al menos una parte de los cebadores de la primera amplificación; y amplificar el al menos un amplicón de ácido nucleico en una segunda reacción de amplificación usando al menos un cebador común que se une con el al menos un sitio de unión a cebador común.

20 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el o los ácidos nucleicos diana se eligen de entre el grupo que consiste en ácidos nucleicos virales, bacterianos y fúngicos.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el o los ácidos nucleicos diana se obtienen de una muestra clínica humana.

25 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el o los ácidos nucleicos diana se obtienen de una muestra clínica de un animal.

5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el al menos un cebador común se elige de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, y combinaciones de los mismos.

30 6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la etapa de separar el al menos un amplicón de ácido nucleico de al menos una parte de los cebadores de la primera amplificación comprende además tomar una pequeña muestra de una amplificación completada en un primer sistema de reacción para proporcionar amplicones para una segunda amplificación en un segundo sistema de reacción.

35 7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que los cebadores anidados específicos de diana se eligen del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, y combinaciones de los mismos.

40

45

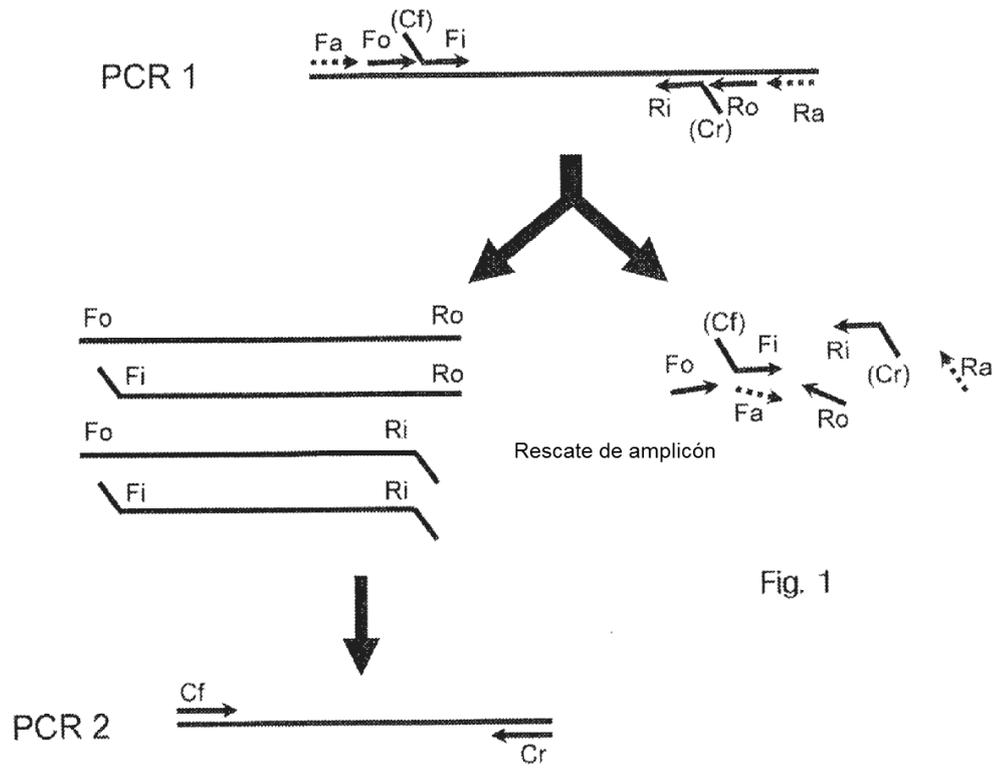


Fig. 1