

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 303**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.07.2011 PCT/EP2011/062955**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.02.2012 WO12013731**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2011 E 11738214 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2598655**

54 Título: **Detección cualitativa y cuantitativa de ácidos nucleicos microbianos**

30 Prioridad:

07.09.2010 EP 10175527
29.07.2010 US 368983 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.03.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SIZMANN, DOROTHEA;
BABIEL, REINER y
BERGMANN, FRANK

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 605 303 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 cualitativa y cuantitativa de ácidos nucleicos microbianos

5 Campo de la Invención

La presente invención se refiere a nuevos métodos y usos para la detección cualitativa y cuantitativa de ácidos nucleicos microbianos que usan al menos un primer ácido nucleico control, o un primer y un segundo ácido nucleico control en diferentes concentraciones. El método se basa en la amplificación de ácidos nucleicos, preferentemente la reacción en cadena de la polimerasa. Además, se proporcionan kits que comprenden componentes para la realización de dichos métodos y usos.

Antecedentes de la invención

15 En el campo del diagnóstico molecular, la detección y cuantificación de ácidos nucleicos microbianos usando reacciones de amplificación de ácido nucleico juega un papel significativo. El cribado (*screening*) rutinario de las donaciones de sangre para la presencia de Virus de la Hepatitis C (VHC), Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), y/o Virus de la Hepatitis B (VHB) es un ejemplo de la aplicación a gran escala de reacciones de amplificación y detección de ácido nucleico. Estas comprenden una diversidad de diferentes técnicas, siendo la más frecuentemente usada es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) introducida por Kary Mullis en 1984. Los sistemas automatizados para el análisis basado en la PCR con frecuencia hacen uso de la detección en tiempo real de la amplificación de producto durante el proceso de PCR. La clave de tales métodos es el uso de oligonucleótidos modificados que llevan grupos indicadores o marcadores.

25 La detección cualitativa de un ácido nucleico microbiano en una muestra biológica es crucial, por ejemplo, para reconocer una infección de un individuo. De ese modo, un requerimiento importante para un ensayo para la detección de una infección microbiana es que se eviten los resultados falsos-negativos o falsos-positivos, puesto que tales resultados conducirían casi inevitablemente a consecuencias graves con respecto al tratamiento del respectivo paciente. Por tanto, especialmente en los métodos basados en PCR, se añade un ácido nucleico control interno cualitativo a la mezcla de detección. Dicho control es particularmente importante para confirmar la validez de un resultado de ensayo: al menos en el caso de un resultado negativo con respecto al ácido nucleico microbiano, la reacción del control interno cualitativo tiene que funcionar como reactivo dentro de los ajustes dados, es decir, el control interno cualitativo se debe detectar, de lo contrario el propio ensayo se considera que es inoperativo. Sin embargo, en un sistema cualitativo, dicho control interno cualitativo no necesariamente tiene que ser detectado en caso de un resultado positivo. Para ensayos cualitativos, es especialmente importante que se garantice la sensibilidad de la reacción y, por lo tanto, se controle rigurosamente. Como consecuencia, la concentración del control interno cualitativo debe ser relativamente baja de manera que incluso en una situación, por ejemplo, de ligera inhibición el control interno cualitativo no se detecte y, por lo tanto, se invalide el ensayo.

40 Por otro lado, y además de la mera detección de la presencia o ausencia de un ácido nucleico microbiano en una muestra, con frecuencia es importante determinar la cantidad de dicho ácido nucleico. Como ejemplo, se puede valorar la fase y la gravedad de una enfermedad vírica en base a la carga vírica. Además, el seguimiento de cualquier terapia requiere información sobre la cantidad de un patógeno presente en un individuo para evaluar el éxito de la terapia. Para un ensayo cuantitativo, es necesario introducir un ácido nucleico patrón cuantitativo que sirva como referencia para determinar la cantidad absoluta de un ácido nucleico microbiano. La cuantificación se puede efectuar o bien refiriéndose a una calibración externa o implementando un patrón cuantitativo interno.

50 En el caso de una calibración externa, se crean curvas patrón en reacciones separadas usando cantidades conocidas de ácidos nucleicos idénticos o comparables. La cantidad absoluta de un ácido nucleico microbiano posteriormente se determina en comparación con el resultado obtenido con la muestra analizada con dicha función patrón. La calibración externa, sin embargo, tiene la desventaja de que un posible procedimiento de extracción, su eficacia variada, y la presencia posible y con frecuencia no predecible de agentes inhibidores de la amplificación y/o reacción de detección no se reflejan en el control.

55 La circunstancia se aplica a cualquier efecto relacionado con la muestra. Por lo tanto, podría ser el caso de que una muestra se juzgue como negativa debido a un procedimiento de extracción fallido u otros factores basados en la muestra, mientras que el ácido nucleico microbiano a detectar y cuantificar realmente está presente en la muestra.

60 Por estas y otras razones, es ventajoso un patrón cuantitativo interno añadido a la propia reacción de ensayo. El patrón cuantitativo interno tiene al menos las siguientes dos funciones en un ensayo cuantitativo:

- i) Hace un seguimiento de la validez de la reacción.
- ii) Sirve como referencia en el cálculo de título compensando así los efectos de inhibición y controlando los procesos de preparación y amplificación para permitir una cuantificación más exacta. Por lo tanto, a diferencia del ácido nucleico control interno cualitativo en un ensayo cualitativo que debe ser positivo solamente en una reacción diana-negativa, el ácido nucleico patrón cuantitativo en un ensayo cuantitativo tiene dos funciones:

control de reacción y calibración de reacción. Por lo tanto, debe ser positivo y válido tanto en reacciones diana-negativas como diana-positivas.

5 Además, tiene que ser adecuado para proporcionar un valor de referencia fiable para el cálculo de altas concentraciones de ácido nucleico. Por tanto, la concentración de un ácido nucleico patrón cuantitativo interno necesita ser relativamente alta.

10 El ácido nucleico control interno cualitativo y/o el ácido nucleico patrón cuantitativo interno puede ser competitivo, no competitivo o parcialmente competitivo. Un ácido nucleico control interno cualitativo competitivo y/o ácido nucleico patrón cuantitativo interno lleva básicamente los mismos sitios de unión a cebador que la diana y, por tanto, compite por los mismos cebadores que la diana. Entre las ventajas de un sistema competitivo es, por ejemplo, que se tienen que introducir en el ensayo conjuntos menores de diferentes cebadores, reduciendo así su coste y complejidad global. Además, se hace un seguimiento de la funcionalidad de los cebadores ya que son efectos de inhibición que son específicos al cebador diana. Un ácido nucleico control interno cualitativo no competitivo y/o ácido nucleico patrón cuantitativo interno tiene diferentes sitios de unión a cebador que la diana y así se une a diferentes cebadores. Las ventajas de tal sistema comprenden, entre otras, el hecho de que los sucesos de amplificación simple de los diferentes ácidos nucleicos en la mezcla de reacción pueden tener lugar independientemente uno de otro sin ningún efecto de competición. En una PCR que usa un ácido nucleico patrón cuantitativo interno parcialmente competitivo el respectivo ácido nucleico control y al menos uno de los ácidos nucleicos diana compiten para los mismos cebadores, mientras que al menos otro ácido nucleico diana se une a diferentes cebadores.

20 Puesto que los principios de un ensayo cuantitativo y uno cualitativo como se han descrito anteriormente muestran diferentes requerimientos cuando se comparan uno con otro, también en vista de los requerimientos reguladores en diversos países, el enfoque común usado en la técnica ha sido el desarrollo de ensayos cuantitativos y cualitativos separados para el mismo ácido nucleico diana, véase, por ejemplo, Yang y col., *J. Agr. Food Chem.* 2005, 53, 6.222-6.229.

25 El documento US2010/0041040 describe un método para detectar y cuantificar simultáneamente un ácido nucleico microbiano (por ejemplo, VIH) en una muestra biológica usando PCR en tiempo real, en el que la diana y uno o más ácidos nucleicos patrones cuantitativos (QS) se amplifican en la misma mezcla de reacción.

30 La presente invención proporciona una solución alternativa que muestra varias ventajas.

35 Descripción de la invención

La presente invención se refiere a nuevos métodos y usos para la detección cualitativa y cuantitativa simultánea de ácidos nucleicos microbianos como se define en las reivindicaciones adjuntas.

40 Además, se describe un método basado en la amplificación de ácidos nucleicos, preferentemente la reacción en cadena de la polimerasa. En resumen, las porciones específicas de secuencia del ácido nucleico microbiano y al menos un primer ácido nucleico control se amplifican y detectan usando uno o más pares de cebadores específicos. Por tanto, un objetivo de la presente descripción es:

45 un método para detectar y cuantificar simultáneamente un ácido nucleico microbiano en una muestra biológica, comprendiendo dicho método:

- a) aislar y purificar dicho ácido nucleico microbiano,
- 50 b) proporcionar una mezcla de reacción que comprende al menos un primer ácido nucleico control, uno o más pares de cebadores que hibridan específicamente con distintas porciones de secuencia de dicho ácido nucleico microbiano y con distintas porciones de secuencia de dicho ácido nucleico control, y sondas que hibridan específicamente con cada una de las secuencias amplificadas mediante dichos uno o más pares de cebadores, en la que dicho ácido nucleico microbiano y dicho ácido nucleico control hibridan con diferentes sondas,
- 55 c) añadir dicha muestra biológica a dicha mezcla de reacción,
- 60 d) realizar una o más etapas de ciclado, en donde la etapa de ciclado comprende una etapa de amplificación, comprendiendo dicha etapa de amplificación la producción de uno o más productos de amplificación derivados de dicho ácido nucleico microbiano si está presente en dicha muestra y la producción de un producto de amplificación derivado de dicho ácido nucleico control, y en donde una etapa de ciclado comprende una etapa de hibridación, comprendiendo dicha etapa de hibridación la hibridación de las secuencias amplificadas por dicho par cebador con dichas sondas, en donde las sondas están marcadas con un resto fluorescente donante y un correspondiente resto fluorescente aceptor y cada una de las sondas lleva un tinte fluorescente diferente,
- 65

- e) detectar y medir señales fluorescentes generadas por dichos productos de amplificación y que son proporcionales a la concentración de dicho ácido nucleico control y dicho ácido nucleico microbiano, en donde la presencia de un producto de amplificación de dicho ácido nucleico control es indicativo de una amplificación que se da en la mezcla de reacción incluso en ausencia de un producto de amplificación para dicho ácido nucleico microbiano.

La presente descripción muestra un número de ventajas sobre la técnica anterior. En particular, la presente invención permite así un diseño común de ensayos cualitativos y cuantitativos para cualquier ácido nucleico microbiano dado usando reactivos idénticos.

En algunas realizaciones, el primer ácido nucleico control anteriormente descrito sirve tanto como un ácido nucleico patrón cuantitativo interno como un ácido nucleico control interno cualitativo. Por tanto, suprime la necesidad de dos ensayos separados o kits de ensayo, respectivamente. La realización de dos ensayos separados pone una carga sobre el paciente debido a las extracciones sanguíneas adicionales y potencialmente impone costes adicionales en los sistemas sanitarios en caso de que se reembolse tanto el ensayo cualitativo como el cuantitativo. Además, el tiempo para el resultado de tanto un ensayo cualitativo como uno cuantitativo se reduce cuando se compara con los experimentos cualitativos y cuantitativos secuenciales.

Preferentemente, dicho primer ácido nucleico control se evalúa según diferentes criterios para obtener un resultado cualitativo y uno cuantitativo. En una realización preferida, se analiza el mismo conjunto de datos en bruto obtenidos durante la PCR en tiempo real frente a dos ajustes de parámetro de ensayo diferentes. Los ajustes de parámetro de ensayo cualitativo aplicados para un ácido nucleico control cualitativo válido son más estrictos en comparación con los ajustes de parámetro aplicados para el patrón cuantitativo interno necesario para una producción de resultado cuantitativo. Los ajustes para el ácido nucleico patrón cuantitativo interno en una reacción cuantitativa no puede ser tan estricto ya que la presencia de diana puede afectar a las respectivas curvas de crecimiento del ácido nucleico patrón cuantitativo interno (véase la Figura 1a).

Por tanto, una realización preferida de la presente descripción es el método anteriormente descrito, en el que el primer ácido nucleico control se analiza según diferentes criterios para servir como ácido nucleico patrón cuantitativo o como ácido nucleico control interno cualitativo.

En otras realizaciones, puede ser ventajoso emplear un primer y un segundo ácido nucleico control en diferentes concentraciones debido a las siguientes razones: normalmente, el ácido o ácidos nucleicos patrones cuantitativos internos en ensayos cuantitativos tienen una concentración bastante alta de manera que todavía se amplifican y detectan en muestras con una alta concentración de ácido nucleico diana. Por lo tanto, a veces no se da su usabilidad como control para la detección de muestras bajo positivas cerca del límite de detección (LD), especialmente si parcialmente se suprime la reacción de amplificación. En ese caso, la detección de un ácido nucleico control altamente concentrado no puede servir como una medida de suficiente sensibilidad del respectivo ensayo.

Por tanto, un aspecto preferido de la presente descripción es lo siguiente: un método para detectar y cuantificar simultáneamente un ácido nucleico microbiano en una muestra biológica, comprendiendo dicho método:

- a) aislar y purificar dicho ácido nucleico microbiano,
- b) proporcionar una mezcla de reacción que comprende un primer y un segundo ácido nucleico control en diferentes concentraciones, uno o más pares de cebadores que hibridan específicamente con distintas porciones de secuencia de dicho ácido nucleico microbiano y con distintas porciones de secuencia de dichos ácidos nucleicos control, y sondas que hibridan específicamente con cada una de las secuencias amplificadas mediante dichos uno o más pares de cebadores, en la que dicho ácido nucleico microbiano y dicho primer ácido nucleico control y dicho segundo ácido nucleico control hibridan con diferentes sondas,
- c) añadir dicha muestra biológica a dicha mezcla de reacción,
- d) realizar una o más etapas de ciclado, en donde una etapa de ciclado comprende una etapa de amplificación, comprendiendo dicha etapa de amplificación la producción de uno o más productos de amplificación derivados de dicho ácido nucleico microbiano si está presente en dicha muestra y la producción de un producto de amplificación derivado de dicho primer ácido nucleico control y dicho segundo ácido nucleico control, y en donde una etapa de ciclado comprende una etapa de hibridación, comprendiendo dicha etapa de hibridación la hibridación de las secuencias amplificadas por dicho par cebador con dichas sondas, en donde las sondas están marcadas con un resto fluorescente donante y un correspondiente resto fluorescente aceptor y cada una de las sondas lleva un tinte fluorescente diferente,
- e) detectar y medir señales fluorescentes generadas por los productos de amplificación de dicho primer ácido nucleico control y dicho ácido nucleico microbiano y que son proporcionales a su concentración, y/o detectar simultáneamente señales fluorescentes generadas por dicho producto de amplificación de dicho segundo

ácido nucleico control, en donde la presencia de un producto de amplificación de dicho segundo ácido nucleico control es indicativo de una amplificación que se da en la mezcla de reacción incluso en ausencia de un producto de amplificación para dicho ácido nucleico microbiano.

5 La explotación de un primer y un segundo ácido nucleico control en diferentes concentraciones dentro del mismo reactivo control, según la presente invención, supera el problema anteriormente indicado. El ácido nucleico con menor o la menor concentración corresponde a un ácido nucleico control interno cualitativo para un ensayo cualitativo y asegura la capacidad de juzgar si un resultado negativo es válido o no, es decir, un resultado negativo no es válido en caso de que no se detecte el ácido nucleico control interno.

10 Según la presente descripción, el experto puede tomar ventaja de las sinergias entre el desarrollo de un sistema cuantitativo y uno cualitativo realizando ambos en un ensayo sencillo, reduciendo así los costes del desarrollo, requiriendo menos material y fuerza de trabajo, reduciendo los costes de producción y acortando también el tiempo requerido para establecer un ensayo. Además, se evita el ensayo doble de los pacientes que pone carga sobre el paciente debido a las extracciones de sangre adicionales, así como que se reducen los costes para los sistemas sanitarios, cuando se reembolsan ambos ensayos cuantitativos y cualitativos.

15 El ácido nucleico control interno cualitativo y/o el ácido nucleico patrón cuantitativo interno puede ser competitivo, no competitivo o parcialmente competitivo.

20 “Competitivo” significa que, en una reacción de amplificación que comprende cebadores, el respectivo ácido nucleico control y el ácido o ácidos nucleicos diana tienen al menos básicamente los mismos sitios de unión a cebador y compiten así por los mismos cebadores. Entre las ventajas de un sistema competitivo está, por ejemplo, que se tienen que introducir menos conjuntos de diferentes cebadores en el ensayo, reduciendo así sus costes y la complejidad global. Además, se hace un seguimiento de la funcionalidad de los cebadores ya que son efectos de inhibición que son específicos al cebador diana.

25 “No competitivo” significa que el respectivo ácido nucleico control y el ácido o ácidos nucleicos diana tienen diferentes sitios de unión a cebador y así se unen a diferentes cebadores. Las ventajas de tal sistema comprenden, entre otras, el hecho de que los sucesos de amplificación simple de los diferentes ácidos nucleicos en la mezcla de reacción pueden tener lugar independientemente uno de otro sin ningún efecto de competición.

30 “Parcialmente competitivo” significa que el respectivo ácido nucleico control y al menos uno de los ácidos nucleicos diana compiten por los mismos cebadores, mientras que al menos otro ácido nucleico diana se une a diferentes cebadores.

35 Al usar un ácido nucleico patrón cuantitativo interno como primer ácido nucleico control según el método o métodos de la invención, los efectos inhibidores específicos a muestra, pero también los no específicos a muestra, que posiblemente interfieren con las reacciones de amplificación y detección para el ácido nucleico patrón cuantitativo y el ácido nucleico microbiano simultáneamente (inhibición independiente de la región diana) se marcan dando como resultado títulos más exactos. “Interno” significa que el primer ácido nucleico control se amplifica, detecta y cuantifica dentro de la misma mezcla de reacción que el ácido nucleico microbiano en lugar de un experimento separado.

40 Otro aspecto preferido de la presente descripción es el método descrito anteriormente, en el que el primer ácido nucleico control es un ácido nucleico patrón cuantitativo y el segundo ácido nucleico control es un ácido nucleico control interno cualitativo.

45 El experto en la técnica puede extraer información cualitativa fiable, pero opcionalmente también cuantitativa igualmente fiable del mismo experimento. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a lo siguiente:

50 el método anteriormente descrito, que comprende además en la etapa e) determinar la cantidad de dicho ácido nucleico microbiano en dicha muestra biológica por comparación de las señales generadas por dicho ácido nucleico microbiano y dicho primer ácido nucleico control.

55 En una realización preferida, el primer ácido nucleico control y el segundo ácido nucleico control tienen básicamente la misma secuencia. Preferentemente, tienen los mismos sitios de unión a cebador, pero diferentes sitios de unión a sonda.

60 Esto sostiene la ventaja de que los ácidos nucleicos control para las mediciones cualitativas y cuantitativas pueden basarse en la misma secuencia de unión seleccionada y compartir las mismas propiedades ventajosas con respecto a la realización del ensayo y en vista de la secuencia o secuencias de analito.

65 Las técnicas convencionales de la biología molecular y la química de ácido nucleico, que están dentro de la capacidad de la técnica, están explicadas en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, J. y col., “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, Gait, M.J., ed., 1984; “Nucleic Acid Hybridization”, Hames, B.D., and Higgins, S.J., eds., 1984; y una serie, “Methods in

Enzymology”, Academic Press, Inc.

“Simultáneamente”, en el sentido de la presente descripción, significa que dos acciones, tales como, por ejemplo, la detección y cuantificación de un ácido nucleico, se realizan dentro de la misma reacción o mezcla de reacción.

“Una mezcla de reacción” como se usa en la presente invención comprende al menos todos los componentes para facilitar una reacción biológica o química. Es un volumen sencillo sin ningún compartimento de separación, es decir, todos los componentes presentes en dicha “mezcla de reacción” están en contacto inmediato uno con otro.

Una “muestra biológica” puede ser cualquier muestra de origen natural. Preferentemente, una “muestra biológica” está derivada de un ser humano y es un líquido corporal. En una realización preferida de la invención, la “muestra biológica” es sangre.

Tal como se conoce en la técnica, un “nucleósido” es una combinación de base-azúcar. La parte base del nucleósido es normalmente una base heterocíclica. Las dos clases más frecuentes de tales bases heterocíclicas son las purinas y las pirimidinas.

“Nucleótidos” son “nucleósidos” que incluyen además un grupo fosfato covalentemente unido a la parte azúcar del nucleósido. Para aquellos “nucleósidos” que incluyen un azúcar pentofuranosilo, el grupo fosfato puede estar unido a o bien el resto 2', 3' o 5' hidroxilo del azúcar. Un “nucleótido” es la “unidad monomérica” de un “oligonucleótido”, más generalmente indicado en el presente documento como “compuesto oligomérico”, o “polinucleótido”, más generalmente indicado como “compuesto polimérico”. Otra expresión general para lo anteriormente mencionado es ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN).

Según la presente descripción, un “compuesto oligomérico” es un compuesto que consiste en “unidades monoméricas” que pueden ser “nucleótidos” solos o “compuestos no naturales” (véase más adelante), más específicamente “nucleótidos modificados” (o “análogos de nucleótido”) o “compuestos no nucleótidos”, solos o combinaciones de los mismos. “Oligonucleótidos” y “oligonucleótidos modificados” (o “análogos de oligonucleótido”) son subgrupos de “compuestos oligoméricos” en el contexto de la invención.

En el contexto de esta descripción, el término “oligonucleótido” se refiere a “polinucleótidos” formados de una pluralidad de “nucleótidos” como la “unidad monomérica”, es decir, un “oligonucleótido” pertenece a un subgrupo específico de un “compuesto oligomérico” o “compuesto polimérico” del ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) con “unidades monoméricas”. Los grupos fosfato frecuentemente se refieren como formadores de la cadena principal de internucleósido del “oligonucleótido”. El enlace normal o cadena principal de ARN y ADN es un enlace de fosfodiéster 3' a 5'. “Oligonucleótidos” y “oligonucleótidos modificados” (véase más adelante) según la invención se pueden sintetizar como principalmente se describe en la técnica y es conocido por el experto en el campo. En la técnica se conocen métodos para preparar compuestos oligoméricos de secuencias específicas, e incluyen, por ejemplo, clonación y restricción de secuencias apropiadas y síntesis química directa. Los métodos de síntesis química pueden incluir, por ejemplo, el método de fosfotriéster descrito por Narang S.A. y col. *Methods in Enzymology* 68 (1979) 90-98, el método de fosfodiéster descrito por Brown E.L., y col., *Methods in Enzymology* 68 (1979) 109-151, el método de fosforamidita descrito en Beaucage y col., *Tetrahedron Letters* 22 (1981) 1859, el método de H-fosfonato descrito en Garegg y col., *Chem. Scr.* 25 (1985) 280-282 y el método de soporte sólido descrito en el documento US 4.458.066.

Para el método anteriormente descrito, los ácidos nucleicos pueden estar presentes en forma de doble cadena o cadena sencilla por lo cual los ácidos nucleicos de doble cadena se desnaturalizan, es decir, se hacen de cadena sencilla, antes de que se realice el método por calentamiento, es decir, desnaturalización térmica.

En otra realización, un cebador y/o la sonda se pueden modificar químicamente, es decir, el cebador y/o la sonda comprende un nucleótido modificado o un compuesto no nucleótido. Entonces, la sonda o el cebador es un oligonucleótido modificado.

Los “Nucleótidos modificados” (o “análogos de nucleótido”) difieren de un “nucleótido” natural por alguna modificación pero todavía consisten en una base, un azúcar pentofuranosilo, una parte fosfato, parte similar a base, similar a azúcar pentofuranosilo y similar a fosfato o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, un “marcador” se puede acoplar a la parte base de un “nucleótido” por lo cual se obtiene un “nucleótido modificado”. Una base natural en un “nucleótido” también se puede reemplazar por, por ejemplo, una 7-deazapurina por lo cual también se obtiene un “nucleótido modificado”. Los términos “nucleótido modificado” o “análogo de nucleótido” se usan intercambiamente en la presente solicitud. Un “nucleósido modificado” (“o análogo de nucleósido”) difiere de un nucleósido natural por alguna modificación de la manera que se resume anteriormente para un “nucleótido modificado” (o un “análogo de nucleótido”).

Un “compuesto no nucleótido” es diferente de un “nucleótido” natural pero es, en el sentido de esta invención, todavía capaz - similar a un “nucleótido” - de ser una “unidad monomérica” de un “compuesto oligomérico”. Por lo tanto, un “compuesto no nucleótido” tiene que ser capaz de formar un “compuesto oligomérico” con “nucleótidos”.

Incluso “compuestos no nucleótidos” pueden contener partes similares a base, similares a azúcar pentofuranosilo o similares a fosfato, sin embargo, no todas están presentes al mismo tiempo en un “compuesto no nucleótido”.

Un “oligonucleótido modificado” (o “análogo de oligonucleótido”), que pertenece a otro subgrupo específico de los “compuestos oligoméricos”, posee uno o más “nucleótidos”, uno o más “compuestos no nucleótidos” o “nucleótidos modificados” como “unidades monoméricas”. Por tanto, el término “oligonucleótido modificado” (o “análogo de oligonucleótido”) se refiere a estructuras que funcionan de una manera básicamente similar a los “oligonucleótidos” y se usa intercambiamente por toda la solicitud. Desde un punto de vista sintético, un “oligonucleótido modificado” (o un “análogo de oligonucleótido”), por ejemplo, se puede producir mediante modificación química de “oligonucleótidos” por modificación apropiada de la cadena principal de fosfato, unidad de ribosa o las bases de nucleótido (Uhlmann and Peyman, *Chemical Reviews* 90 (1990) 543; Verma S., y Eckstein F., *Annu. Rev. Biochem.* 67 (1998) 99-134). Las modificaciones representativas incluyen enlaces internucleósido de fosforotioato, fosforoditioato, metil fosfonato, fosfotriéster o fosforamidoato en lugar de enlaces internucleósido de fosfodiéster; deaza- o aza-purinas y -pirimidinas en lugar de bases de purina y pirimidina natural, bases de pirimidina que tienen grupos sustituyentes en la posición 5 o 6; bases de purina que tienen grupos sustituyentes alterados en las posiciones 2, 6 u 8 o posición 7 como 7-deazapurinas; bases que llevan restos alquilo, alquenoilo, alquinoilo o arilo, por ejemplo, grupos alquilo inferiores tales como grupos metilo, etilo, propilo, butilo, terc-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo o arilo como fenilo, bencilo, naftilo; azúcares que tiene grupos sustituyentes en, por ejemplo, su posición 2'; o análogos de azúcar carbocíclico o acíclico. Otras modificaciones coherentes con el espíritu de esta invención son conocidas por los expertos en la técnica. Tales “oligonucleótidos modificados” (o “análogos de oligonucleótido”) son los mejor descritos como funcionalmente intercambiables con, aún estructuralmente diferentes de, “oligonucleótidos” naturales (o “oligonucleótidos” sintéticos a lo largo de las líneas naturales). En más detalle, modificaciones a modo de ejemplo están descritas en Verma, S., y Eckstein, F., *Annu. Rev. Biochem.* 67 (1998) 99-134 o el documento WO 02/12263. Además, la modificación se puede hacer donde las unidades de nucleósido están unidas por grupos que sustituyen los enlaces de fosfato de internucleósido o de fosfato de azúcar. Tales enlaces incluyen los descritos en Verma, S., y Eckstein F., *Annu. Rev. Biochem.* 67 (1998) 99-134. Cuando aparte de los enlaces de fosfato se utilizan para unir las unidades de nucleósido, tales estructuras también se han descrito como “oligonucleósidos”.

Un “ácido nucleico” así como el “ácido nucleico diana” o el “ácido nucleico microbiano” es un compuesto polimérico de “nucleótidos” como los conocidos por el experto en la técnica. El “ácido nucleico diana” o “ácido nucleico microbiano” se usa en el presente documento para indicar un “ácido nucleico” en una muestra que se debería analizar, es decir, se debería determinar la presencia, no presencia y/o cantidad del mismo en una muestra. Por lo tanto, en este caso el ácido nucleico es la diana y, por lo tanto, también se puede indicar como “ácido nucleico diana”. Puesto que, según la invención, el ácido nucleico diana es de origen microbiano, el ácido nucleico diana también se refiere como “ácido nucleico microbiano”. Por ejemplo, si se tiene que determinar si la sangre contiene VHC, el “ácido nucleico diana” o “ácido nucleico microbiano” es el ácido nucleico de VHC.

“Microorganismo” significa cualquier virus, bacteria, arquea, hongo o cualquier organismo eucariota unicelular.

“Microbiano” significa derivado de o perteneciente a “microorganismo”.

“Detectar” significa determinar la presencia o ausencia de un objetivo específico, tal como una diana, o señal.

“Cuantificar” significa determinar la cantidad de un objetivo específico tal como una diana, o señal.

“Medir” significa determinar al menos un valor relativo de un objeto específico, tal como una diana, o señal.

En el sentido de ciertas realizaciones de la presente descripción que usan un primer y un segundo ácido nucleico control, el primer ácido nucleico control sirve como un “ácido nucleico patrón cuantitativo interno”. Un “ácido nucleico patrón cuantitativo interno” es un “ácido nucleico” y, por tanto, un compuesto polimérico de “nucleótidos” como los conocidos por el experto en la técnica. En el caso del “ácido nucleico patrón cuantitativo interno”, el ácido nucleico es apto para ser y usarse simultáneamente como control para la validez de la reacción y como referencia para “cuantificar”, es decir, para determinar la cantidad del “ácido nucleico diana” o “ácido nucleico microbiano”. Para este fin, el “ácido nucleico patrón cuantitativo interno” se somete a todas las etapas posibles de preparación de muestra junto con el “ácido nucleico diana” o el “ácido nucleico microbiano”. Además, se procesa por todo el método dentro de la misma mezcla de reacción, El “ácido nucleico patrón cuantitativo interno” debe generar, directa o indirectamente, una señal detectable tanto en presencia como en ausencia del ácido nucleico diana. Para este fin, la concentración del “ácido nucleico patrón cuantitativo interno” se tiene que optimizar con cuidado en cada ensayo para no interferir con la sensibilidad pero para generar una señal detectable también, por ejemplo, a muy altas concentraciones de diana. Preferentemente, la concentración oscila para el “ácido nucleico patrón cuantitativo interno”, es decir, el primer ácido nucleico control, comprenderá un intervalo de 100 copias por reacción a 100.000 copias por reacción. Posibles concentraciones del “ácido nucleico patrón cuantitativo interno” puede ser, por ejemplo, para VIH: 1.000 copias/reacción, para VHC: 7.500 copias/reacción, pero estas concentraciones se pueden adaptar al ensayo específico conocido por el experto en la técnica. En términos del límite de detección (LD) del ensayo respectivo, el intervalo de concentración para el “ácido nucleico patrón cuantitativo interno” es

preferentemente 20 a 5.000x LD, más preferentemente 20 a 1.000x LD, lo más preferentemente 20 a 500x LD. La concentración final del “ácido nucleico patrón cuantitativo interno” en la mezcla de reacción es dependiente del intervalo de medición cuantitativa conseguida. El “ácido nucleico patrón cuantitativo interno” puede ser, por ejemplo, ADN, ARN o APN, ADN blindado o ARN blindado y formas modificadas de los mismos.

Además, en el sentido de la presente descripción, el segundo ácido nucleico control sirve como “ácido nucleico control interno cualitativo”. Un “ácido nucleico control interno cualitativo” es particularmente importante para confirmar la validez del resultado de ensayo de un ensayo de detección cualitativo: al menos en el caso de un resultado negativo, el ácido nucleico control interno cualitativo se debe detectar, de lo contrario el propio ensayo se considera que es inoperativo. Sin embargo, en un sistema cualitativo, el ácido nucleico control interno cualitativo no necesariamente tiene que ser detectado en caso de un resultado positivo. Para los ensayos cualitativos, es importante que se garantice la sensibilidad de la reacción y así se controle rigurosamente. Como consecuencia, la concentración del ácido nucleico control interno cualitativo debe ser relativamente baja, de modo que incluso en una situación de ligera inhibición el ensayo se considera inválido. Se tiene que adaptar con cuidado al ensayo respectivo y su sensibilidad. Preferentemente, el intervalo de concentración para el “ácido nucleico interno cualitativo”, es decir, el segundo ácido nucleico control, comprende un intervalo de 1 copia por reacción a 1.000 copias por reacción. En relación al límite de detección (LD) del ensayo respectivo, su concentración es preferentemente entre el LD de un ensayo y 25 veces el valor del LD. Más preferentemente, es entre 2x y 20x LD, o entre 2x y 15x LD, o entre 2x y 10x LD. Incluso más preferentemente, es entre 3x y 7x LD.

“Límite de detección o “LD” significa la cantidad o concentración detectable más baja de un ácido nucleico en una muestra con una tasa de éxito predefinida. Un bajo “LD” corresponde a alta sensibilidad y viceversa. El “LD” normalmente se expresa o bien por medio de la unidad “cp/ml”, particularmente si el ácido nucleico es un ácido nucleico vírico, o como UI/ml. “Cp/ml” significa “copias por mililitro” en el que “copia” es la copia del respectivo ácido nucleico. UI/ml significa “unidades internacionales/ml”, que se refieren al estándar de la OMS. Dependiendo de la diana, los valores LD en ensayos de diagnóstico molecular clínicos están generalmente por debajo de 1.000 cp/ml. Preferentemente, el LD en los ensayos realizados en el contexto de la invención está entre 1 y 500 cp/ml.

Un método ampliamente usado para el cálculo de un LD es “Análisis Probit”, que es un método de análisis de la relación entre un estímulo (dosis) y la respuesta cuantal (todo o nada). En un experimento de respuesta cuantal normal, se da a los grupos de animales diferentes dosis de un fármaco. Se registra el porcentaje que muere a cada nivel de dosis. A continuación, estos datos se pueden analizar usando Análisis Probit. El Modelo Probit asume que la respuesta en porcentaje está relacionada con dosis logarítmica como la distribución normal acumulativa. Es decir, las dosis logarítmicas se pueden usar como variables para leer el porcentaje que muere desde la normal acumulativa. Usar la distribución normal, a parte de otras distribuciones de probabilidad, influye la tasa de respuesta predicha en los extremos altos y bajos de las dosis posibles, pero tiene poca influencia cerca de la mitad.

El “Análisis Probit” se puede aplicar a distintas “tasas de éxito”. Tal como se muestra en la técnica, “tasas de éxito” se expresa frecuentemente en porcentaje [%] e indica el porcentaje de resultados positivos a una concentración específica de un analito. Por tanto, por ejemplo, un LD se puede determinar a tasa de éxito al 95 %, lo cual significa que el LD se calcula durante un ajuste en el cual el 95 % de los resultados válidos son positivos.

El término “cebador” (*primer*) se usa en el presente documento como se conoce por los expertos en la técnica y se refiere a “compuestos oligoméricos”, principalmente a “oligonucleótidos”, pero también a “oligonucleótidos modificados” que son capaces de síntesis de ADN “cebador” mediante una polimerasa de ADN dependiente de plantilla, es decir, el extremo 3' del, por ejemplo, oligonucleótido proporciona un grupo 3'-OH libre adonde “nucleótidos” adicionales se pueden acoplar mediante una polimerasa de ADN dependiente de plantilla estableciendo enlace de fosfodiéster 3' a 5' por lo cual se usan los trifosfatos de desoxinucleósido y por lo cual se libera pirofosfato.

El término “sonda”, en el contexto de la presente descripción, es también un oligonucleótido, pero con una función específica:

hibrida con otros ácidos nucleicos en una mezcla de reacción, preferentemente para posibilitar su detección. Por tanto, preferentemente las sondas específicamente se unen a ciertos ácidos nucleicos. Una sonda preferentemente lleva al menos un marcador. Las sondas, por ejemplo, se pueden marcar con diferentes tintes, de modo que las respectivas sondas se pueden detectar y medir independientemente una de otra.

“Marcadores”, con frecuencia referidos como “grupos indicadores”, son generalmente grupos que producen un ácido nucleico, en particular el “compuesto oligomérico” o el “oligonucleótido modificado”, así como algún ácido nucleico unido al mismo distinguible del resto de la muestra (ácidos nucleicos que tienen acoplado un “marcador” también se pueden calificar de compuestos de unión a ácido nucleico marcado, sondas marcadas o solamente sondas). Los marcadores preferidos según la invención son marcadores fluorescentes, los cuales son, por ejemplo, “tintes fluorescentes” como un tinte de fluoresceína, un tinte de rodamina, un tinte de cianina y un tinte de cumarina. “Tintes fluorescentes” preferidos según la invención son FAM, HEX, CY5, JA270, Cyan, CY5.5, LC-Red 640, LC-Red 705.

Para el método anteriormente descrito, los ácidos nucleicos pueden estar presentes en forma de doble cadena o

cadena sencilla por lo cual los ácidos nucleicos de doble cadena se desnaturalizan, es decir, se hacen de cadena sencilla, antes de que se realice el método por calentamiento, es decir, desnaturalización térmica.

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

10 Una "señal detectable" es una señal "generada", por un compuesto tal como el "ácido nucleico microbiano", el "ácido nucleico control interno" o el "ácido nucleico patrón cuantitativo", que vuelve dicho compuesto distinguible del resto de la muestra. Según la invención, dicha "señal detectable" se puede cuantificar o analizar de una manera cualitativa. Una "señal detectable" puede ser, por ejemplo, radioactiva u óptica tal como las señales luminiscentes. "Señales detectables" preferidas según la invención son señales fluorescentes emitidas por "tintes fluorescentes".

15 "Inhibición" o "supresión" de una reacción PCR indica una reacción PCR que es menos eficaz en comparación con la reacción estándar observada en la mayoría de las muestras. El efecto de "inhibición" o "supresión" se puede ver o bien en niveles de fluorescencia reducida de las curvas de crecimiento para el control y/o diana, en valores CT retrasados, en cambios de la pendiente de la curva de crecimiento, en cambios en el punto de inflexión u otros rasgos de las características de reacción. El efecto de "inhibición" o "supresión" puede resultar de eficacia de preparación de muestra variada, efectos relacionados con la muestra, la posible y con frecuencia no predecible presencia de agentes inhibidores de la reacción de amplificación y/o detección, y otras razones. Por lo tanto, puede ser el caso de que la muestra se juzgue como negativa debido a un procedimiento de extracción fallido u otros factores basados en la muestra, mientras que el ácido nucleico microbiano a detectar y cuantificar está realmente presente en la muestra.

25 "Para generar" significa producir, directa o indirectamente. En el contexto de una "señal detectable", por lo tanto, "para generar" puede significar "producir directamente", por ejemplo, en el caso de un tinte fluorescente emisor de una señal fluorescente, o "para producir indirectamente" en el sentido de "provocar" o "inducir", tal como un "ácido nucleico microbiano" "generador" de una "señal detectable" por un "marcador" tal como un "tinte fluorescente" o por una sonda de ácido nucleico que lleva un "marcador" tal como un "tinte fluorescente".

30 Tal como se conocen por el experto en la técnica, los términos "específicos" o "hibridar específicamente" en el contexto de los cebadores y sondas implica que un cebador o sonda "específica" para un ácido nucleico distinto se une a dicho ácido nucleico bajo condiciones estrictas. Preferentemente, los cebadores y las sondas usados en el método según la invención son al menos 80 % idénticas a porciones de la secuencia del ácido nucleico microbiano y/o el primer y segundo ácido nucleico control.

35 La "Reacción en Cadena de la Polimerasa" (PCR) se describe, entre otras referencias, en la patente U.S. Nº 4.683.202, 4.683.195, 4.800.159 y 4.965.188 y es la técnica de amplificación de ácido nucleico más preferida usada para el método según la invención. La PCR generalmente emplea dos o más cebadores de oligonucleótido que se unen a una plantilla de ácido nucleico seleccionada (por ejemplo, ADN o ARN). Los cebadores útiles en la presente invención incluyen oligonucleótidos capaces de actuar como un punto de iniciación de la síntesis de ácido nucleico dentro de las secuencias de ácido nucleico del ácido nucleico microbiano o ácido nucleico patrón cuantitativo. Se puede purificar un cebador a partir de un producto de digestión por restricción por métodos convencionales, o se puede producir sintéticamente. El cebador preferentemente es de cadena sencilla para la eficacia máxima en la amplificación, pero el cebador puede ser de doble cadena. Los cebadores de doble cadena primero se desnaturalizan, es decir, se tratan para separar las cadenas. Un método de desnaturalización de ácidos nucleicos de doble cadena es por calentamiento. Una "polimerasa termoestable" es una enzima polimerasa que es estable al calor, es decir, es una enzima que cataliza la formación de productos de extensión de cebador complementarios a una plantilla y no desnaturaliza irreversiblemente cuando se somete a las temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para efectuar desnaturalización de ácidos nucleicos plantilla de doble cadena. Generalmente, la síntesis se inicia en el extremo 3' de cada cebador y procede en la dirección 5' a 3' a lo largo de la cadena plantilla. Polimerasas termoestables se han aislado de *Thermus flavus*, *T. ruber*, *T. thermophilus*, *T. aquaticus*, *T. lacteus*, *T. Rubens*, *Bacillus stearothermophilus* y *Methanothermus fervidus*. Sin embargo, las polimerasas que no son termoestables también se pueden emplear en ensayos de PCR con tal de que se reponga la enzima. Si el ácido nucleico plantilla es de doble cadena, es necesario separar las dos cadenas antes de que se puedan usar como plantilla en PCR. La separación de cadena se puede conseguir por cualquier método de desnaturalización adecuado que incluya medios físicos, químicos o enzimáticos. Un método de separación de las cadenas de ácido nucleico implica el calentamiento del ácido nucleico hasta que esté desnaturalizado en su mayoría (por ejemplo, desnaturalizado más del 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 %). Las condiciones de calentamiento necesarias para desnaturalizar el ácido nucleico plantilla dependerán, por ejemplo, de la concentración de sal tampón y la longitud y composición de nucleótido de los ácidos nucleicos que se desnaturalizan, pero generalmente oscilan entre aproximadamente 90 °C a aproximadamente 105 °C durante un tiempo que depende de los rasgos de la reacción tal como temperatura y la longitud del ácido nucleico. La desnaturalización generalmente se realiza durante aproximadamente 3 s a 4 min (por ejemplo, 5 s a 2 min 30 s, o 10 s a 1,5 min). Si el ácido nucleico plantilla de doble cadena se desnaturaliza por calor, se deja enfriar la mezcla de reacción a una temperatura que promueve el anillamiento de cada cebador con su secuencia diana sobre el ácido nucleico microbiano y/o ácido nucleico patrón

interno. La temperatura para el anillamiento es normalmente desde aproximadamente 35 °C a aproximadamente 75 °C (por ejemplo, aproximadamente 40 °C a aproximadamente 70 °C; aproximadamente 45 °C a aproximadamente 66 °C). Los tiempos de anillamiento pueden ser desde aproximadamente 5 s a aproximadamente 1 min (por ejemplo, aproximadamente 10 s a aproximadamente 50 s; aproximadamente 15 s a aproximadamente 40 s). Entonces, la mezcla de reacción se ajusta a una temperatura a la cual la actividad de la polimerasa se promueve u optimiza, es decir, una temperatura suficiente para que se dé la prolongación desde el cebador anillado para generar productos complementarios al ácido nucleico microbiano y/o ácido nucleico patrón interno. La temperatura debería ser suficiente para sintetizar un producto de extensión desde cada cebador que se anilla a una plantilla de ácido nucleico, pero no debería ser tan alta como para desnaturar un producto de prolongación a partir de su plantilla complementaria (por ejemplo, la temperatura para la prolongación generalmente oscila entre aproximadamente 35 °C y 80 °C (por ejemplo, aproximadamente 40 °C a aproximadamente 75 °C; aproximadamente 45 °C a 72 °C). Los tiempos de prolongación pueden ser desde aproximadamente 5 s a aproximadamente 5 min (por ejemplo, aproximadamente 10 s a aproximadamente 3 min; aproximadamente 15 s a aproximadamente 2 min; aproximadamente 20 s a aproximadamente 1 min). Las cadenas nuevamente sintetizadas forman una molécula de doble cadena que se puede usar en las sucesivas etapas de la reacción. Las etapas de separación de cadena, anillamiento y elongación se pueden repetir con frecuencia como se sea necesario para producir la cantidad deseada de productos de amplificación correspondientes al ácido nucleico microbiano y/o ácido nucleico patrón cuantitativo. Los factores limitantes en la reacción son las cantidades de cebadores, enzima termoestable y trifosfatos nucleósido presentes en la reacción. Las etapas de ciclado (es decir, desnaturación, anillamiento y extensión) preferentemente se repiten al menos una vez. Para su uso en la detección, el número de etapas de ciclado dependerá, por ejemplo, de la naturaleza de la muestra. Si la muestra es una mezcla compleja de ácidos nucleicos, se requerirán más etapas de ciclado para amplificar la secuencia diana suficiente para la detección. Generalmente, se repiten las etapas de ciclado al menos 20 veces, pero se pueden repetir tanto como 40, 60 o incluso 100 veces.

Las reacciones de amplificación de ácido nucleico aparte de la PCR comprenden la Reacción en Cadena de la Ligasa (LCR; Wu D.Y. y Wallace R.B., *Genomics* 4 (1989) 560-69; y Barany F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991) 189-193); Reacción en Cadena de la Polimerasa Ligasa (Barany F., *PCR Methods and Applic.* 1 (1991) 5-16); Gap-LCR (documento WO 90/01069); Reacción en Cadena de Reparación (documento EP 0439182 A2), 3SR (Kwoh, D.Y. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 1.173-1.177; Guatelli, J.C., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 1.874-1.878; documento WO 92/08808) y NASBA (documento US 5.130.238). Además, hay amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), amplificación mediada por transcripción (TMA) y amplificación Q-beta (para una revisión véase, por ejemplo, Whelen A.C. y Persing D.H., *Annu. Rev. Microbiol.* 50 (1996) 349-373; Abramson R.D. y Myers T.W., *Curr. Opin. Biotechnol.* 4 (1993) 41-47).

Los métodos de detección de ácido nucleico adecuados son conocidos por los expertos en la técnica y están descritos en libros de texto estándar como Sambrook, J. y col., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989 y Ausubel, F. y col.: "Current Protocols in Molecular Biology" 1987, J. Wiley and Sons, NY. También puede haber más etapas de purificación antes de que se lleve a cabo la etapa de detección de ácido nucleico como, por ejemplo, una etapa de precipitación. Los métodos de detección pueden incluir, pero no se limitan, a la unión o intercalado de tintes específicos como bromuro de etidio que se intercala dentro del ADN de doble cadena y, después de eso, cambia su fluorescencia. El ácido nucleico purificado también se puede separar por métodos electroforéticos opcionalmente después de una digestión por restricción y, después de eso, se visualiza. También hay ensayos basados en sonda que aprovechan la hibridación de oligonucleótido con secuencias específicas y posterior detección del híbrido. También es posible secuenciar el ácido nucleico después de etapas adicionales conocidas por los expertos en el campo. La polimerasa preferida de ácido nucleico dependiente de plantilla es la polimerasa de ADN Z05 y mutaciones de la misma. Otras polimerasas de ácido nucleico dependiente de plantilla útiles en la invención son la polimerasa Taq y la polimerasa Tth. Otras polimerasas más de ácido nucleico útiles para los métodos según la invención son conocidas por los expertos en la técnica.

En el contexto de la presente descripción, el ácido nucleico microbiano y cada uno de los ácidos nucleicos controles se unen a diferentes sondas que llevan diferentes marcadores para volverlos distinguibles unos de otros durante la detección. De ahí, dichas diferentes sondas preferentemente llevan diferentes tintes fluorescentes, que emiten luz fluorescente a diferentes longitudes de onda. Estas diferentes señales de fluorescencia se pueden detectar de manera ventajosa independientemente una de otra en diferentes canales de un detector de fluorescencia como se usa en la mayoría de los dispositivos para la realización de la PCR en tiempo real.

También preferentemente, los resultados para el ácido nucleico microbiano, el primer ácido nucleico control y el segundo ácido nucleico control se visualizan sobre una visualización en diferentes máscaras, o en diferentes visualizaciones.

En el sentido de la presente descripción, "purificación", "aislamiento" o "extracción" de ácidos nucleicos se refiere a lo siguiente: antes de que se puedan analizar los ácidos nucleicos en uno de los ensayos anteriormente mencionados, se tienen que purificar, aislar o extraer de las muestras biológicas que contienen mezclas complejas de diferentes componentes. Con frecuencia, para las primeras etapas, los procesos que se usan permiten el

enriquecimiento de los ácidos nucleicos. Para liberar los contenidos de células o partículas víricas, se pueden tratar con enzimas o con productos químicos para disolver, degradar o desnaturalizar las paredes celulares o partículas víricas. Este proceso comúnmente es referido como lisis. La solución resultante que contiene tal material sometido a lisis se refiere como lisado. Un problema con frecuencia hallado durante la lisis es que otras enzimas que degradan el componente de interés, por ejemplo, desoxirribonucleasas o ribonucleasas que degradan los ácidos nucleicos, se ponen en contacto con el componente de interés durante el proceso de lisis. Estas enzimas degradadoras también pueden estar presentes fuera de las células o se pueden haber separado espacialmente en diferentes compartimentos celulares antes de la lisis. Ya que tiene lugar la lisis, el componente de interés llega a estar expuesto a dichas enzimas degradadoras. Otros componentes liberados durante este proceso pueden, por ejemplo, ser endotoxinas que pertenecen a la familia de los lipopolisacáridos que son tóxicas a las células y pueden causar problemas para los productos destinados al uso en terapia humana o animal.

Hay una diversidad de medios para abordar el problema anteriormente mencionado. Es frecuente usar agentes caotrópicos tales como tiocianato de guanidinio o detergentes aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos cuando se pretende que los ácidos nucleicos se liberen. También es una ventaja usar proteasas que rápidamente degradan las enzimas previamente descritas o proteínas indeseadas. Sin embargo, esto puede producir otro problema ya que dichas sustancias o enzimas pueden interferir con reactivos o componentes en etapas posteriores.

Enzimas que se pueden usar ventajosamente en dichos procesos de lisis o preparación de muestra anteriormente mencionados son enzimas que escinden los enlaces de amida en sustratos proteicos y que se clasifican como proteasas, o (intercambiamente) peptidasas (véase Walsh, 1979, "Enzymatic Reaction Mechanisms" W.H. Freeman and Company, San Francisco, Capítulo 3). Las proteasas usadas en la técnica anterior comprenden proteasas alcalinas (documento WO 98/04730) o proteasas ácidas (documento US 5.386.024). Una proteasa que se ha usado ampliamente para la preparación de muestra en el aislamiento de los ácidos nucleicos en la técnica anterior es la proteinasa K de *Tritirachium album* (véase, por ejemplo, Sambrook, J. y col., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989) que es activa alrededor de pH neutro y pertenece a una familia de proteasas conocidas por los expertos en la técnica como subtilisin. Especialmente ventajosa para el uso en procesos de lisis o de preparación de muestra anteriormente mencionados es la enzima esperasa, una proteasa fuerte que conserva su actividad tanto a alta alcalinidad como a altas temperaturas (documento EP 1 201 753).

En las etapas de preparación de muestra siguientes a la etapa de lisis, el componente de interés se enriquece más. Si los componentes no proteicos de interés son, por ejemplo, ácidos nucleicos, normalmente se extraen de las mezclas de lisis complejas antes de que se usen en un ensayo basado en sonda.

Hay varios métodos para la purificación de ácidos nucleicos:

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

- cromatografía de afinidad
- hibridación con oligonucleótidos de captura inmovilizados.

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

- extracción líquido-líquido con, por ejemplo, fenol-cloroformo
- precipitación con, por ejemplo, etanol puro
- extracción con papel de filtro
- extracción con agentes de formación de micelio como cetil-trimetil-amonio-bromuro
- unión a tintes inmovilizados, intercalados, por ejemplo, derivados de acridina
- adsorción a gel de sílice o tierra de diatomeas
- adsorción a partículas de vidrio magnéticas (MGP) o partículas de organosilano bajo condiciones caotrópicas.

Particularmente interesante para los fines de purificación es la adsorción de ácidos nucleicos a una superficie de vidrio, aunque otras superficies son posibles. En los últimos años se han propuesto muchos procedimientos para aislar los ácidos nucleicos de su ambiente natural mediante el uso de su comportamiento de unión a superficies de vidrio. Si los ácidos nucleicos no modificados son la diana, se prefiere una unión directa de los ácidos nucleicos a un material con una superficie de sílice debido a que, entre otras razones, los ácidos nucleicos no tienen que ser

modificados, e incluso se pueden unir a ácidos nucleicos nativos. Estos procesos están descritos en detalle por diversos documentos. En Vogelstein, B. y col. *Proc. Natl. Aca. USA* 76 (1979) 615-9, por ejemplo, se propone un procedimiento para la unión de ácidos nucleicos a partir de geles de agarosa en presencia de yoduro de sodio a vidrio flint esmerilado. La purificación de ADN plásmido a partir de bacterias sobre polvo de vidrio en presencia de perclorato de sodio está descrito en Marko, M.A. y col., *Anal. Biochem.* 121 (1982) 382-387. En el documento DE-A 37 34 442, se describe el aislamiento de ADN del fago M13 de cadena sencilla sobre filtros de fibra de vidrio mediante la precipitación de partículas de fago usando ácido acético y lisis de las partículas de fago con perclorato. Los ácidos nucleicos unidos a los filtros de fibra de vidrio se lavan y, a continuación, se eluyen con un tampón Tris/EDTA que contiene metanol. Un procedimiento similar para la purificación de ADN a partir de fagos lambda está descrito en Jakobi, R. y col., *Anal. Biochem.* 175 (1988) 196-201. El procedimiento conlleva la unión selectiva de ácidos nucleicos a superficies de vidrio en soluciones de sal caotrópicas y la separación de los ácidos nucleicos de contaminantes tales como agarosa, proteínas o residuo celular. Para separar las partículas de vidrio de los contaminantes, se puede o bien centrifugar las partículas o sacar los fluidos a través de filtros de fibra de vidrio. Esto es una etapa limitante, sin embargo, esto impide que el procedimiento se use para procesar grandes cantidades de muestras. El uso de partículas magnéticas para inmovilizar los ácidos nucleicos después de la precipitación añadiendo sal y etanol es más ventajoso y está descrito, por ejemplo, en Alderton R.P. y col., S., *Anal. Biochem.* 201 (1992) 166-169 y PCT GB 91/00212. En este procedimiento, los ácidos nucleicos se aglutinan junto con las partículas magnéticas. El aglutinado se separa del disolvente original aplicando un campo magnético y realizando una etapa de lavado. Después de una etapa de lavado, los ácidos nucleicos se disuelven en un tampón Tris. Sin embargo, este procedimiento tiene una desventaja ya que la precipitación no es selectiva para los ácidos nucleicos. Además, también se aglutina una diversidad de sustancias sólidas y disueltas. Como resultado, este procedimiento no se puede usar para separar cantidades significativas de ningún inhibidor de reacciones enzimáticas específicas que puedan estar presentes. El vidrio poroso, magnético también está disponible en el mercado, que contiene partículas magnéticas en una matriz de vidrio particular porosa y está revestido con una capa que contiene estreptavidina. Este producto se puede usar para aislar materiales biológicos, por ejemplo, proteínas o ácidos nucleicos, si se modifican en una etapa de preparación compleja de manera que se unen covalentemente a biotina. Los adsorbentes particulares magnetizables demuestran ser muy eficaces y adecuados para la preparación de muestra automática. Pigmentos ferrimagnéticos y ferromagnéticos, así como superparamagnéticos se usan para este fin. Las MGP y métodos más preferidos que usan partículas de vidrio magnéticas son los descritos en el documento WO 01/37291. Particularmente útiles para el aislamiento de ácido nucleico en el contexto de la invención es el método según R. Boom y col. (*J. Clin. Microbiol.* 28 (1990), 495-503). Después de la purificación o aislamiento de los ácidos nucleicos que incluyen el ácido nucleico diana a partir de su entorno natural, se puede detectar el ácido nucleico diana.

En una realización, el método de la descripción incluye las etapas para evitar la contaminación. Por ejemplo, un método enzimático que utiliza uracilo-ADN glicosasa está descrito en las Patentes U.S. Nº 5.035.996, 5.683.896 y 5.945.313 para reducir o eliminar la contaminación entre una corrida del ciclador térmico y lo siguiente. Además, las prácticas y procedimientos de contención de laboratorio estándar son deseables cuando realizan el método de la invención. Las prácticas y procedimientos de contención incluyen, pero no se limitan a, separar áreas de trabajo para diferentes etapas de un método, campanas de contención, puntas de pipeta de filtro de barrera y pipetas de desplazamiento de aire especializadas. Las consecuentes prácticas y procedimientos de contención por el personal son necesarias para la exactitud en un laboratorio de diagnóstico que manipula muestras clínicas.

Los métodos presentados anteriormente están preferentemente basados en la Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia (FRET) entre un resto fluorescente donante y un resto fluorescente aceptor. Un resto fluorescente donante representativo es la fluoresceína, y restos fluorescentes aceptores correspondientes representativos incluyen LC-Red 640, LC-Red 705, Cry5 y Cy5.5. Generalmente, la etapa de detección incluye la excitación de la muestra a una longitud de onda absorbida por el resto fluorescente donante y la visualización y/o medición de la longitud de onda emitida por el correspondiente resto fluorescente aceptor. Según la invención, la detección es seguida por la cuantificación de FRET. Preferentemente, la etapa de detección se realiza en tiempo real. Al usar instrumentación de PCR en tiempo real comercialmente disponible (por ejemplo, LightCycle™ o TaqMan®), la amplificación y detección por PCR del producto de amplificación se puede combinar en un compartimento de reacción cerrado simple tal como, por ejemplo, una cubeta con tiempo de ciclado radicalmente reducido. Puesto que la detección se da al mismo tiempo que la amplificación, los métodos de PCR en tiempo real obvian la necesidad de manipulación del producto de amplificación, y disminuyen el riesgo de contaminación cruzada entre los productos de amplificación. La PCR en tiempo real reduce enormemente el tiempo de rotación y es una alternativa atractiva a técnicas de PCR convencionales en el laboratorio clínico.

Las siguientes solicitudes de patente describen PCR en tiempo real como se usa en la tecnología LightCycler™: documentos 97/46707, WO 97/46714 y WO 97/46712. El instrumento de LightCycler™ es un ciclador térmico rápido combinado con un fluorómetro de microvolumen que utiliza ópticas de alta calidad. Esta técnica de ciclado térmico rápido usa cubetas de vidrio finas como recipientes de reacción. El calentamiento y el enfriamiento de la cámara de reacción están controlados por aire calentado y ambiente alternante. Debido a la baja masa de aire y a la alta relación de área superficial y volumen de las cubetas, se puede alcanzar tasas de intercambio de temperatura rápidas dentro de la cámara térmica.

La tecnología TaqMan® utiliza una sonda de hibridación de cadena sencilla marcada con dos restos fluorescentes. Cuando se excita un primer resto fluorescente con luz de una longitud de onda adecuada, la energía absorbida se transfiere a un segundo resto fluorescente según los principios de FRET. El segundo resto fluorescente generalmente es una molécula desactivadora (*quencher*). Los tintes fluorescentes normales usados en este formato son, por ejemplo, entre otros, FAM, HEX, CY5, JA270, Cyan y CY5.5. Durante la etapa de anillamiento de la reacción PCR, la sonda de hibridación marcada se une al ácido nucleico diana (es decir, el producto de amplificación) y se degrada por la actividad exonucleasa 5' a 3' de la polimerasa Taq u otra adecuada conocida por el experto en la técnica, tal como la polimerasa Z05 preferida, durante la posterior fase de elongación. Como resultado, el resto fluorescente excitado y el resto desactivador llegan a estar espacialmente separados uno de otro. Como consecuencia, tras la excitación del primer resto fluorescente en ausencia del desactivador, se puede detectar la emisión de fluorescencia a partir del primer resto fluorescente.

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

Como alternativa a FRET, se puede detectar un producto de amplificación usando el tinte de unión a ADN de doble cadena tal como un tinte de unión a ADN fluorescente (por ejemplo, SYBRGREEN I® o SYBRGOLD® (Molecular Probes)). Tras la interacción con el ácido nucleico de doble cadena, tales tintes de unión a ADN fluorescentes emiten una señal de fluorescencia después de la excitación con luz a una longitud de onda adecuada. También se pueden usar un tinte de unión a ADN de doble cadena tal como un tinte intercalado de ácido nucleico. Cuando se usan tintes de unión a ADN de doble cadena, normalmente se realiza un análisis de curva de fusión para la conformación de la presencia del producto de amplificación.

Las balizas moleculares junto con FRET también se pueden usar para detectar la presencia de un producto de amplificación usando los métodos PCR en tiempo real de la invención. La tecnología de baliza molecular usa una sonda de hibridación marcada con un primer resto fluorescente y un segundo resto fluorescente. El segundo resto fluorescente generalmente es un desactivador, y los marcadores fluorescentes están generalmente localizados en cada extremo de la sonda. La tecnología de baliza molecular usa un oligonucleótido de sonda que tiene secuencias que permiten la formación de estructura secundaria (por ejemplo, una horquilla). Como resultado de la formación de estructura secundaria dentro de la sonda, ambos restos fluorescentes están en proximidad espacial cuando la sonda está en solución. Después de la hibridación con los productos de amplificación, la estructura secundaria de la sonda está interrumpida y los restos fluorescentes llegan a separarse uno de otros de modo que después de la excitación con luz de una longitud de onda adecuada, se puede detectar la emisión del primer resto fluorescente.

Por tanto, un método preferido según la invención es el método anteriormente descrito que usa FRET, en el que dichas sondas comprenden una secuencia de ácido nucleico que permite la proximidad espacial entre dichos primer y segundo resto fluorescente.

FRET eficaz solamente puede tener lugar cuando los restos fluorescentes están en proximidad local directa y cuando el espectro de emisión del resto fluorescente donante se superpone con el espectro de absorción del resto fluorescente aceptor.

Por tanto, en una realización preferida de la invención, dichos restos fluorescentes donantes y aceptores están dentro no más de 5 nucleótidos uno de otro en dicha sonda.

En una realización adicional preferida, dicho resto fluorescente aceptor es un desactivador.

Tal como se describió anteriormente, en el formato TaqMan, durante la etapa de anillamiento de la reacción PCR, la sonda de hibridación marcada se une al ácido nucleico diana (es decir, el producto de amplificación) y se degrada por la actividad exonucleasa 5' a 3' del Taq u otra polimerasa adecuada conocida por el experto en la técnica, tal como la polimerasa Z05 preferida, durante la posterior fase de elongación.

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

El método según la invención se puede aplicar ventajosamente sobre ácidos nucleicos víricos. Por tanto, en una realización preferida de la invención, el ácido nucleico microbiano es un ácido nucleico vírico.

Entre los ácidos nucleicos víricos, se puede aplicar ventajosamente el método según la invención sobre VHC. Por tanto, en una realización preferida de la invención, el ácido nucleico microbiano es un ácido nucleico de VHC. Sin embargo, se debe entender que la invención también se puede aplicar sobre cualquier otro ácido nucleico microbiano.

Un ejemplo de cómo realizar el cálculo de los resultados cuantitativos en el formato TaqMan basado en un patrón interno se describe a continuación. Se calcula un título a partir de los datos de entrada de los valores de fluorescencia corregidos del instrumento a partir de una corrida de PCR completa. Un conjunto de muestras que

contienen un ácido nucleico diana tal como un ácido nucleico microbiano y un primer ácido nucleico control que sirven como un ácido nucleico patrón cuantitativo interno se somete a PCR sobre un ciclador térmico usando un perfil de temperatura como el especificado. En las temperaturas y tiempos seleccionados durante la PCR las muestras del perfil se iluminan por luz filtrada y los datos de fluorescencia filtrada se recogen para cada muestra para el ácido nucleico diana y el ácido nucleico patrón cuantitativo interno. Después de que se complete una corrida de PCR, las lecturas de fluorescencia se procesan para producir un conjunto de datos de concentración de tinte para el ácido nucleico patrón cuantitativo interno y un conjunto de datos de concentración de tinte para el ácido nucleico diana. Cada conjunto de datos de concentración de tinte se procesa de la misma manera. Después de varias revisiones de verosimilitud, se calculan los valores de codo (CT) para el ácido nucleico patrón cuantitativo interno y el ácido nucleico diana. El valor de codo se define como el punto donde la fluorescencia del ácido nucleico diana o el ácido nucleico patrón cuantitativo interno cruza un umbral predefinido (concentración de fluorescencia). La determinación de título se basa en las suposiciones de que el ácido nucleico diana y el ácido nucleico patrón cuantitativo interno se amplifican con la misma eficacia y que en el valor de codo calculado se amplifican y se detectan cantidades iguales de copias de amplicón de ácido nucleico diana y ácido nucleico patrón cuantitativo. Por lo tanto, el (CTQS - CTdiana) es lineal al log (conc. diana/conc. QS), en el que "QS" es para el ácido nucleico patrón cuantitativo interno. Entonces, el título T se puede calcular, por ejemplo, usando una fórmula de calibración polinomial como en la siguiente ecuación:

$$T' = 10(a(CTQS - CTdiana)^2 + b(CTQS - CTdiana) + c)$$

Las constantes polimoniales y la concentración del ácido patrón cuantitativo interno son conocidas, por lo tanto, la única variable en la ecuación es la diferencia (CTQS - CTdiana).

Un ejemplo de cómo realizar el cálculo de resultados cualitativos en el TaqMan está descrito a continuación: se analizaron los datos de entrada de los valores de fluorescencia corregidos del instrumento a partir de una corrida de PCR completa. Un conjunto de muestras que posiblemente contienen un ácido nucleico diana tal como un ácido nucleico microbiano y un ácido nucleico control que sirven como un ácido nucleico control interno cualitativo se somete a PCR sobre un ciclador térmico usando un perfil de temperatura como el especificado. A temperaturas y tiempos seleccionados durante la PCR las muestras del perfil se iluminaron por luz filtrada y se recogieron los datos de fluorescencia filtrada para cada muestra para el ácido nucleico diana y el ácido nucleico control interno cualitativo. Después de que se complete una corrida de PCR, las lecturas de fluorescencia se procesan para producir un conjunto de datos de concentración de tinte para el ácido nucleico control interno cualitativo y un conjunto de datos de concentración de tinte para el ácido nucleico diana. Cada conjunto de datos de concentración de tinte se procesa de la misma manera. Los valores de codo (CT) se calculan para el ácido nucleico control interno cualitativo y, si presenta, el ácido nucleico diana. El valor de codo se define como el punto donde la fluorescencia del ácido nucleico diana o el ácido nucleico patrón cuantitativo interno cruza un umbral predefinido (concentración de fluorescencia). El control interno cualitativo es válido si se obtiene un CT dentro de los intervalos especificados y si la fluorescencia surge por encima de una intensidad de fluorescencia mínima predefinida. Si no se obtiene CT de diana, el control interno cualitativo debe ser válido. Si se obtiene un CT de diana que indica la presencia de ácido nucleico diana en la muestra, el control interno cualitativo puede ser válido o inválido.

Preferidos en el sentido de la descripción son cualquiera de los métodos anteriormente descritos, en los que se proporcionan dicho primer y dicho segundo ácido nucleico control dentro de un reactivo control.

El concepto de un reactivo control con un primer y un segundo ácido nucleico control en diferentes concentraciones para detección cualitativa fiable y al mismo tiempo para cuantificación fiable se puede usar ventajosamente para cualquier respectivo ensayo que se dirige a un ácido nucleico microbiano.

Por tanto, otro aspecto de la invención es el uso de un primer y un segundo ácido nucleico control en diferentes concentraciones para detectar y cuantificar simultáneamente un ácido nucleico microbiano por PCR en tiempo real. Más preferible es el uso anteriormente descrito, en el que dicho primer y segundo ácido nucleico control se amplifican por el mismo par cebador o diferentes pares de cebadores pero hibridan con diferentes sondas.

Particularmente favorable es un uso de este concepto en el método según la invención. Por tanto, en otro aspecto, la invención hace referencia al uso de un primer y un segundo ácido nucleico control en diferentes concentraciones para detectar y cuantificar simultáneamente un ácido nucleico microbiano según el método o métodos anteriormente descritos.

La descripción también se refiere a un kit para la detección y cuantificación simultánea de un ácido nucleico microbiano en una muestra biológica por PCR en tiempo real, comprendiendo dicho kit un primer y un segundo ácido nucleico control en diferentes concentraciones, uno o más pares de cebadores que hibridan específicamente con porciones de secuencia distintas de dicho ácido nucleico microbiano y con porciones de secuencia distintas de dicho primer y segundo ácido nucleico control, y sondas que hibridan específicamente con cada una de las secuencias amplificadas por dichos uno o más pares de cebadores, en las que se proporcionan dichos primeros y segundos ácidos nucleicos controles dentro de un reactivo control.

En una realización preferida, la descripción se refiere a un kit para detectar y cuantificar simultáneamente un ácido nucleico microbiano en una muestra biológica según cualquiera de los métodos descritos anteriormente, comprendiendo dicho kit un primer y un segundo ácido nucleico control en diferentes concentraciones, uno o más pares de cebadores que hibridan específicamente con porciones de secuencia distintas de dicho ácido nucleico microbiano y con porciones de secuencia distintas de dicho primer y segundo ácido nucleico control, y sondas que hibridan específicamente con cada una de las secuencias amplificadas por dichos uno o más pares de cebadores.

Un aspecto adicional preferido de la descripción es un kit como se describió anteriormente, en el que dicho primer y segundo ácido nucleico control se amplifican por el mismo par cebador pero hibridan con diferentes sondas, proporcionando así un sistema competitivo. Sin embargo, se ha de entender que ensayos y kits no o parcialmente competitivos para llevar a cabo los respectivos métodos también están comprendidos por la descripción.

Tales kits pueden comprender además, como se conoce en la técnica, objetos de plásticos que se pueden usar durante el procedimiento de preparación de muestra como, por ejemplo, placas de microtítulo en el formato de 96 o 384 pocillos o tubos de reacción normales fabricados por, por ejemplo, Eppendorf, Hamburg, Alemania y todos los otros reactivos para llevar a cabo el método según la invención. Por lo tanto, el kit además puede contener un material con una afinidad a ácidos nucleicos, preferentemente el material con una afinidad a ácidos nucleicos comprende un material con una superficie de sílice. Preferentemente, el material con una superficie de sílice es un vidrio. Lo más preferentemente, el material con una afinidad a ácidos nucleicos es una composición que comprende partículas de vidrio magnéticas. El kit puede comprender más o además un reactivo de proteasa y un tampón de lisis que contiene, por ejemplo, agentes caotrópicos, detergentes o alcoholes o mezclas de los mismos que permiten la lisis de las células. Estos componentes del kit según la invención se pueden proporcionar por separado en tubos o recipientes de almacenamiento. Dependiendo de la naturaleza de los componentes, estos incluso se pueden proporcionar en un tubo sencillo o recipiente de almacenamiento. El kit además puede comprender más o además una solución de lavado que es adecuada para la etapa de lavado de las partículas de vidrio magnéticas cuando un ácido nucleico se une a las mismas. Esta solución de lavado puede contener etanol y/o agentes caotrópicos en una solución o soluciones tamponadas con un pH ácido sin etanol y/o agentes caotrópicos como se describieron anteriormente. Con frecuencia la solución de lavado u otras soluciones se proporcionan como soluciones madres que tienen que diluirse antes del uso. El kit puede comprender más o además un eluyente o tampón de elución, es decir, una solución o un tampón (por ejemplo, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) o agua pura para eluir el ácido nucleico unido a las partículas de vidrio magnéticas. Además, los reactivos adicionales o soluciones tamponadas pueden estar presentes, las cuales se pueden usar para el proceso de purificación de un ácido nucleico.

Preferentemente, el kit contiene una enzima polimerasa que tiene actividad exonucleasa 5' a 3'. También preferido es que el kit contiene una enzima con actividad de transcriptasa inversa.

En otra realización preferida, el kit contiene una enzima polimerasa que tiene actividad exonucleasa 5' a 3' y actividad de transcriptasa inversa.

En una realización preferida de la descripción, el método según la invención está embebido en una secuencia de métodos llevados a cabo dentro de un sistema analítico, formando de ese modo preferentemente un proceso automatizable.

Por lo tanto, un aspecto preferido de la descripción, es lo siguiente:

un sistema analítico para detectar y cuantificar simultáneamente un ácido nucleico microbiano en una muestra biológica por PCR en tiempo real, comprendiendo dicho sistema:

- un módulo de preparación de muestra que comprende un tampón de lisis y un recipiente para aislar y purificar dicho ácido nucleico microbiano,
- un módulo de amplificación y detección que comprende un recipiente de reacción en el cual se realiza el método anteriormente descrito,
- un kit como se describió anteriormente.

El módulo de preparación de muestra puede comprender ventajosamente componentes para los procedimientos de preparación de muestra descritos anteriormente, es decir, por ejemplo, partículas de vidrio magnéticas y un magneto para separarlas de la solución, un reactivo de proteasa, soluciones de sal caotrópica y uno o más recipientes que contienen la muestra cruda y los reactivos requeridos para la preparación de muestra.

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

En una realización preferida de la descripción, el sistema analítico contiene un módulo de almacenamiento que

contiene los reactivos para realizar el método de la invención.

Además, dicho módulo de almacenamiento puede contener más otros componentes útiles para el método de la invención, por ejemplo, desechables tales como puntas de pipetas o incluso recipientes para usar como recipientes de reacción dentro del módulo de amplificación y detección.

En una realización preferida de la descripción, el sistema analítico incluye un módulo de sistema preanalítico para transferir la muestra biológica desde tubos principales a recipientes utilizables sobre el sistema analítico.

In otra realización preferida más de la descripción, el sistema analítico contiene un módulo de transferencia para transferir la muestra biológica desde el módulo de preparación de muestra al módulo de amplificación y detección.

Aunque es posible llevar a cabo dicha transferencia manualmente, es preferible usar un sistema automatizado en el que la transferencia se realiza, por ejemplo, mediante un dispositivo robótico tal como, por ejemplo, como una rejilla móvil conducida por motor o brazo articulado robótico.

Proceso automatizable significa que las etapas del proceso son adecuadas para llevarse a cabo con un aparato o máquina capaz de funcionar con poco o sin control externo o influencia por un ser humano. Método automatizado significa que las etapas del método automatizable se llevan a cabo con un aparato o máquina capaz de funcionar con poco o sin control externo o influencia por un ser humano. Solamente las etapas de preparación para el método pueden tener que ser hechas a mano, por ejemplo, los recipientes de almacenamiento se tienen que llenar y poner en su lugar, la elección de muestras tiene que realizarse por un ser humano y las etapas adicionales conocidas por el experto en el campo, por ejemplo, el funcionamiento de un ordenador controlador. El aparato o máquina puede, por ejemplo, añadir automáticamente líquidos, mezclar las muestras o llevar a cabo las etapas de incubación a temperaturas específicas. Generalmente, tal máquina o aparato es un robot controlado por un ordenador que lleva a cabo un programa en el que se especifican las etapas simples y los comandos.

Por tanto, preferentemente, el sistema analítico según la descripción comprende además una unidad control para controlar los componentes del sistema.

Tal unidad control puede comprender un programa informático para asegurar que los diferentes componentes de dicho sistema analítico funcionan e interactúan de manera correcta y con el ritmo correcto, por ejemplo, moviendo componentes tal como la muestra al módulo de reacción de una manera coordinada. La unidad control también puede comprender un procesador que corre un sistema que funciona en tiempo real (RTOS), que es un sistema operador multitarea destinado a las aplicaciones en tiempo real. En otras palabras, el procesador del sistema es capaz de manejar las restricciones en tiempo real, es decir, vencimientos operacionales desde el suceso a la respuesta del sistema sin tener en cuenta la carga del sistema. Controla en tiempo real que las diferentes unidades dentro del sistema funcionen y respondan de manera correcta según las instrucciones dadas.

Todas otras realizaciones preferidas y descripciones específicas de las realizaciones de los usos, kits y sistemas analíticos descritos son las mencionadas para el método según la descripción.

Descripción de las Figuras

Figura 1a:

En la gráfica se muestran las curvas de crecimiento control interno para las reacciones PCR en tiempo real cuantitativas de la prueba COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan VIH-1 comercial. Las reacciones PCR contenían concentraciones de diana de VIH-1 que abarcaban un intervalo de 5 log₁₀ y una muestra diana negativa. Si están presentes altas concentraciones de diana en la reacción (véase "Diana alto positiva") el nivel de fluorescencia que se alcanza por el ácido nucleico patrón cuantitativo interno (QS) es significativamente inferior que en el caso de reacciones PCR sin diana de VIH-1 presente (véase "Diana negativo"). Ya que el QS debe ser válido en todas las concentraciones de diana para ser capaces de calcular un título para una producción de resultado cuantitativo, el ajuste de nivel de intensidad de fluorescencia mínima ("RFI_{min}") para el QS es bajo. Los ajustes de RFI_{min} para una producción de resultado cuantitativo en las tres pruebas comerciales COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan VHB, VHC y VIH-1 se dan en la Tabla 1.

Figura 1b:

En la gráfica se muestran las curvas de crecimiento control interno para las reacciones PCR en tiempo real de la prueba COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan VIH-1 comercial. Todas las reacciones PCR contenían muestras diana negativas de VIH-1. El nivel de fluorescencia de las curvas de crecimiento control interno se encuentra dentro de un intervalo estrecho y el ajuste del nivel de la intensidad de fluorescencia mínima ("RFI_{min}") para el ácido nucleico control interno cualitativo (IC) es alto. En reacciones diana positivas el IC puede caer por debajo del RFI_{min} y puede llegar a ser inválido; en presencia de diana el resultado para la reacción PCR es todavía válido. Los ajustes de RFI_{min} como los optimizados para una producción de

resultado cuantitativo para las tres pruebas comerciales COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan VHB, VHC y VIH-1 se dan en la Tabla 1.

Figura 2:

Producción de partículas de ARN blindado: vector de expresión para la producción de partículas de ARN blindado y microscopía por electrones de partículas de ARN blindado. Las partículas de ARN blindado se componen en *E. coli*. Después de la inducción del Operón lac se transcribe el ARNm que incluye el gen del bacteriófago MS-2 de la proteína de la cubierta de MS-2, la secuencia control, una señal de empaquetamiento y una secuencia del plásmido corriente arriba (*upstream*) del terminador TrnB. Después de que se traduzca la proteína de cubierta, la composición de la partícula se da espontáneamente empaquetando una copia de ARNm.

Figura 3:

Curvas de crecimiento normalizadas obtenidas para una reacción PCR en tiempo real que contiene diana de VHC, un primer ácido nucleico control y un segundo ácido nucleico control.

Figura 4a:

Amplificación simultánea de ARN de VHC y QS. La intensidad de fluorescencia de tanto QS como ARN de VHC es menor que en una reacción que conduce a señales estándar (véase la Fig. 4b).

Figura 4b:

Amplificación simultánea de ARN de VHC y QS. Ambas reacciones dan como resultado intensidades de fluorescencia estándar. Para comparar véase la Fig. 4a con curvas de fluorescencia suprimidas, también indican la diferente magnitud en las dos figuras.

Ejemplos

Ejemplo 1: Un primer ácido nucleico control se evalúa según diferentes criterios para obtener una producción de resultado cualitativo y cuantitativo.

Las pruebas COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan VHB, VHC y VIH-1 son ensayos de PCR en tiempo real comercialmente disponibles que se han optimizado para la cuantificación exacta de las dianas víricas VHB, VHC y VIH-1. Los ensayos se usan o bien sobre el sistema COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan completamente automatizado que incluye una estación de acoplamiento para la transferencia automatizada de la mezcla de reacción PCR desde la unidad de preparación de muestra a la unidad de amplificación/detección o sobre el sistema COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan con transferencia manual o sobre el sistema COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan 48.

Se usó la prueba COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan VHC como ejemplo para investigar el enfoque de proporcionar resultados del ensayo cuantitativo y cualitativo simultáneos con un conjunto de reactivos idénticos. La prueba tiene un Límite de Detección de 15 UI/ml y muestra el estado de la sensibilidad de la técnica, comparable o mejor a los ensayos de VHC cuantitativos pero también cualitativos en el mercado. Debido a esta alta sensibilidad ha habido intentos de usar también el ensayo como ensayo de VHC cualitativo. El foco de atención principal de un ensayo cuantitativo es proporcionar títulos de VHC exactos mientras que el foco de atención principal de un ensayo cualitativo es asegurar la alta sensibilidad del ensayo. Ya que originalmente la prueba COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan VHC se desarrolló para hacer un seguimiento cuantitativo del éxito del tratamiento se condujo un análisis de si el ensayo también se puede usar sin ningún cambio para proporcionar resultados cualitativos fiables. Una revisión de los datos reveló que en el suceso poco común de una PCR menos eficaz la sensibilidad de 15 UI/ml no se garantiza por el ensayo cuantitativo con sus ajustes de análisis de datos actuales. Más adelante se da un ejemplo de una reacción PCR que está inhibida pero muestra un resultado de QS válido y una detección fallida de diana (2.183 UI/ml):

En la Fig. 4a se muestra una reacción PCR inhibida que produce un resultado válido debido a un QS válido y un resultado de "Diana no detectada". El QS era válido debido a que superaba los ajustes de umbral de fluorescencia que correspondían a 0,8 unidades de fluorescencia relativas.

El ensayo de repetición de la misma muestra mostró una reacción PCR estándar y un resultado de título de VHC de 2.183 UI/ml (Fig. 4b).

Por tanto, la prueba de COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan VHC sin ningún cambio no se puede usar como ensayo cualitativo.

Al usar el ensayo anteriormente mencionado los ajustes de los parámetros de análisis de datos del ácido nucleico

control IC/QS se optimizaron de modo que se alcanzaba una producción de resultado cualitativo fiable. Para demostrar la aplicabilidad general, además se emprendió la optimización para todos los tres ensayos de VHB, VHC y VIH-1 comerciales sobre el sistema COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan. Al subir significativamente el umbral de la intensidad de fluorescencia relativa mínima (RFI_{min}) en los ajustes de parámetro se asegura la sensibilidad de todos los tres ensayos cuantitativos de modo que se pueden usar para proporcionar una producción de resultado cualitativo fiable. Los ajustes de parámetro relevantes se muestran en la Tabla 1 de a continuación:

Tabla 1. Ajustes de RFI_{min} para el control interno de tres pruebas COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan en la aplicación cuantitativa comercialmente disponible y en una aplicación cualitativa.

	RFI _{min} IQS Cuantitativo	RFI _{min} IQS Cualitativo
Prueba de VHB sobre COBAS AmpliPrep/COBAS Taqman	1,5	10,4
Prueba de VHC sobre COBAS AmpliPrep/COBAS Taqman	1,8	9,0
Prueba de VIH-1 sobre COBAS AmpliPrep/COBAS Taqman	1,2	20,4

Los ajustes de RFI_{min} cualitativos de 9,0 invalidarían la reacción PCR inhibida en el ejemplo anteriormente dado para VHC.

Los anteriores ajustes de RFI_{min} para la producción de resultado cualitativo no se pueden usar simultáneamente para la producción de resultado cuantitativo debido a que la presencia de diana puede afectar a la intensidad de fluorescencia de las curvas de crecimiento IC/QS como se muestra en la Figura 1a. Como resultado los ajustes de RFI_{min} cualitativos conducen a un alto porcentaje de reacciones inválidas de IC/QS en presencia de altas concentraciones de diana. Por el contrario, esto no afecta a la validez de la producción de resultado cualitativo ya que el IC no debe ser válido en presencia de diana. Aunque la validez de la reacción cuantitativa está afectada significativamente.

Por tanto, si se usan los mismos reactivos de ensayo con un IC/QS para proporcionar tanto una producción de resultado cualitativo fiable con sensibilidad garantizada del ensayo como un resultado de ensayo cuantitativo fiable con niveles aceptablemente bajos de resultados inválidos de QS esto solamente se puede alcanzar analizando los datos en bruto con dos conjuntos diferentes de ajustes de parámetro como se sugiere en la presente.

Ejemplo 2: Se usaron un primer y un segundo ácido nucleico control en diferentes concentraciones para obtener una producción de resultado cualitativo y cuantitativo con los mismos reactivos de ensayo.

El objetivo es proporcionar tanto una producción de resultado cualitativo fiable como un resultado de ensayo cuantitativo fiable con el mismo conjunto de reactivos de ensayo. En este enfoque de dirigirse a este objetivo el ácido nucleico control interno que contiene reactivo comprende una formulación con dos partículas de ARN blindado diferentes. Los siguientes reactivos se pueden usar para este experimento:

- a) reactivos de preparación de muestra de la prueba COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan VHC (suspensión de partícula magnética; solución de proteasa, tampón de lisis; tampón de elución),
- b) partícula blindada de QS a un nivel de concentración de aproximadamente 1.000 copias/reacción y una partícula blindada de IC a un nivel de concentración de aproximadamente 100 copias/reacción. La producción de partículas de ARN blindadas se muestra en la Figura 2 de más adelante. Los transcritos encerrados por las partículas blindadas tienen diferentes sitios de unión a cebador y diferentes sitios de unión a sonda. Las sondas están marcadas con los marcadores fluorescentes HEX y CY5 junto con el *Black Hole Quencher* BHQ,
- c) reactivo de magnesio,
- d) reactivo Mastermix que comprende:
 - ADN polimerasa Z05 y UNG,
 - tres pares de cebadores diferentes para el VHC diana, para el primer y el segundo ácido nucleico control,
 - tres sondas diferentes para la diana marcada con FAM y BHQ, para el primer ácido nucleico control marcado con HEX y BHQ y para el segundo ácido nucleico control marcado con CY5 y BHQ,
 - aptámero
 - dNTPs (dUTP, dATP, dCTP, dGTP, dTTP),

- ingredientes tampón mastermix (acetato de potasio, glicerol, Tricina, DMSO, Betaina, IGEPAL, agua).

La preparación de la muestra y las etapas de amplificación/detección se realizan usando los parámetros de extracción de espécimen y el archivo de PCR establecido por la prueba COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan VHC. Se obtienen las curvas de crecimiento para los tres diferentes tintes fluorescentes y se presentan en la Figura 3.

Para las muestras de VHC los títulos se determinan como sigue para obtener la producción de resultado cuantitativo: después de que se complete una corrida de PCR, las lecturas de fluorescencia se procesan para producir un conjunto de datos de concentración de tinte para el ácido nucleico QS (marcador fluorescente HEX), un conjunto de datos de concentración de tinte para el ácido nucleico patrón cualitativo (marcador fluorescente CY5), y un conjunto de datos de concentración de tinte para el ácido nucleico diana (marcador fluorescente FAM). Todos los tres conjuntos de datos de concentración de tinte se procesan de la misma manera. Los valores de codo (CT) se calculan para el ácido nucleico patrón cuantitativo y el cualitativo, así como el ácido nucleico diana. El valor de codo se define como el punto donde la fluorescencia del ácido nucleico diana o los dos ácidos nucleicos control internos cruza un umbral predefinido (concentración de fluorescencia).

Para la producción de resultado cuantitativo la determinación de título se hace analizando solamente los datos de concentración de tinte para HEX y FAM. La determinación de título se basa en la suposición de que el ácido nucleico diana y el ácido nucleico QS se amplifican con la misma eficacia y que en el valor de codo calculado se amplifican y detectan cantidades iguales de copias de amplicón de ácido nucleico diana y ácido nucleico QS. Por lo tanto, el $(CT_{QS} - CT_{diana})$ es lineal a log (conc. diana/conc. QS). Entonces, el título T se puede calcular, por ejemplo, usando una fórmula de calibración polinomial como en la siguiente ecuación en la que la única variable en la ecuación es la diferencia $(CT_{QS} - CT_{diana})$:

$$T = 10(a(CT_{QS} - CT_{diana})^2 + b(CT_{QS} - CT_{diana}) + c)$$

Para la producción de resultado cualitativo se analizaron solamente los datos de concentración de tinte para CY5 y FAM. Al comparar los datos de concentración de tinte para CY5 y FAM el programa informático determina si la reacción PCR es diana negativa o positiva. Si la reacción PCR es diana positiva se omite el resultado de IC y, por tanto, puede ser válido o inválido. Si la reacción PCR es diana negativa, el resultado es solamente válido si el IC muestra un resultado válido. En el ejemplo anteriormente mostrado, todas las reacciones contienen niveles bajos de diana de VHC y – aunque no relevante para la validez de los respectivos resultados de ensayo – todas las reacciones muestran un IC válido.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar y cuantificar simultáneamente un ácido nucleico microbiano en una muestra biológica, comprendiendo dicho método:

- 5
- a) aislar y purificar dicho ácido nucleico microbiano,
 - b) proporcionar una mezcla de reacción que comprende un primer y un segundo ácido nucleico control en diferentes concentraciones en la que el primer ácido nucleico control es un ácido nucleico patrón cuantitativo presente en una concentración de 20 a 5.000 veces el límite de detección de dicho ácido nucleico microbiano, y el segundo ácido nucleico control es un ácido nucleico control interno cualitativo presente en una concentración de 1 a 10 veces el límite de detección de dicho ácido nucleico microbiano, uno o más pares de cebadores que hibridan específicamente con distintas porciones de secuencia de dicho ácido nucleico microbiano y con distintas porciones de secuencia de dichos ácidos nucleicos control, y sondas que hibridan específicamente con cada una de las secuencias amplificadas por dichos uno o más pares de cebadores, en los que dicho ácido nucleico microbiano y dicho primer ácido nucleico control y dicho segundo ácido nucleico control hibridan con diferentes sondas que llevan diferentes marcadores,
 - c) añadir el ácido nucleico microbiano aislado y purificado a dicha mezcla de reacción,
 - d) realizar una o más etapas de ciclado, en donde una etapa de ciclado comprende una etapa de amplificación, comprendiendo dicha etapa de amplificación la producción de uno o más productos de amplificación derivados de dicho ácido nucleico microbiano si está presente en dicha muestra y la producción de un producto de amplificación derivado de dicho primer ácido nucleico control y dicho segundo ácido nucleico control, y en donde una etapa de ciclado comprende una etapa de hibridación, comprendiendo dicha etapa de hibridación la hibridación de las secuencias amplificadas por dicho par cebador con dichas sondas, en donde las sondas están marcadas con un resto fluorescente donante y un correspondiente resto fluorescente aceptor y cada una de las sondas lleva un diferente tinte fluorescente,
 - e) detectar y medir señales fluorescentes generadas por los productos de amplificación de dicho primer ácido nucleico control y dicho ácido nucleico microbiano y que son proporcionales a su concentración, y detectar simultáneamente señales fluorescentes generadas por dicho producto de amplificación de dicho segundo ácido nucleico control, en donde la presencia de un producto de amplificación de dicho segundo ácido nucleico control es indicativo de una amplificación que se da en la mezcla de reacción incluso en ausencia de un producto de amplificación para dicho ácido nucleico microbiano, y determinar la cantidad de dicho ácido nucleico microbiano en dicha muestra biológica en comparación con las señales generadas por dicho ácido nucleico microbiano y dicho primer ácido nucleico control.

35 2. El método de la reivindicación 1, en el que la amplificación emplea una enzima polimerasa que tiene actividad exonucleasa 5' a 3'.

40 3. El método de la reivindicación 1, en el que dicho primer y dicho segundo ácido nucleico control se proporciona dentro de un reactivo control.

4. El método de cualquiera de las precedentes reivindicaciones, en el que el primer ácido nucleico control y el segundo ácido nucleico control tienen los mismos sitios de unión a cebador, pero diferentes sitios de unión a sonda.

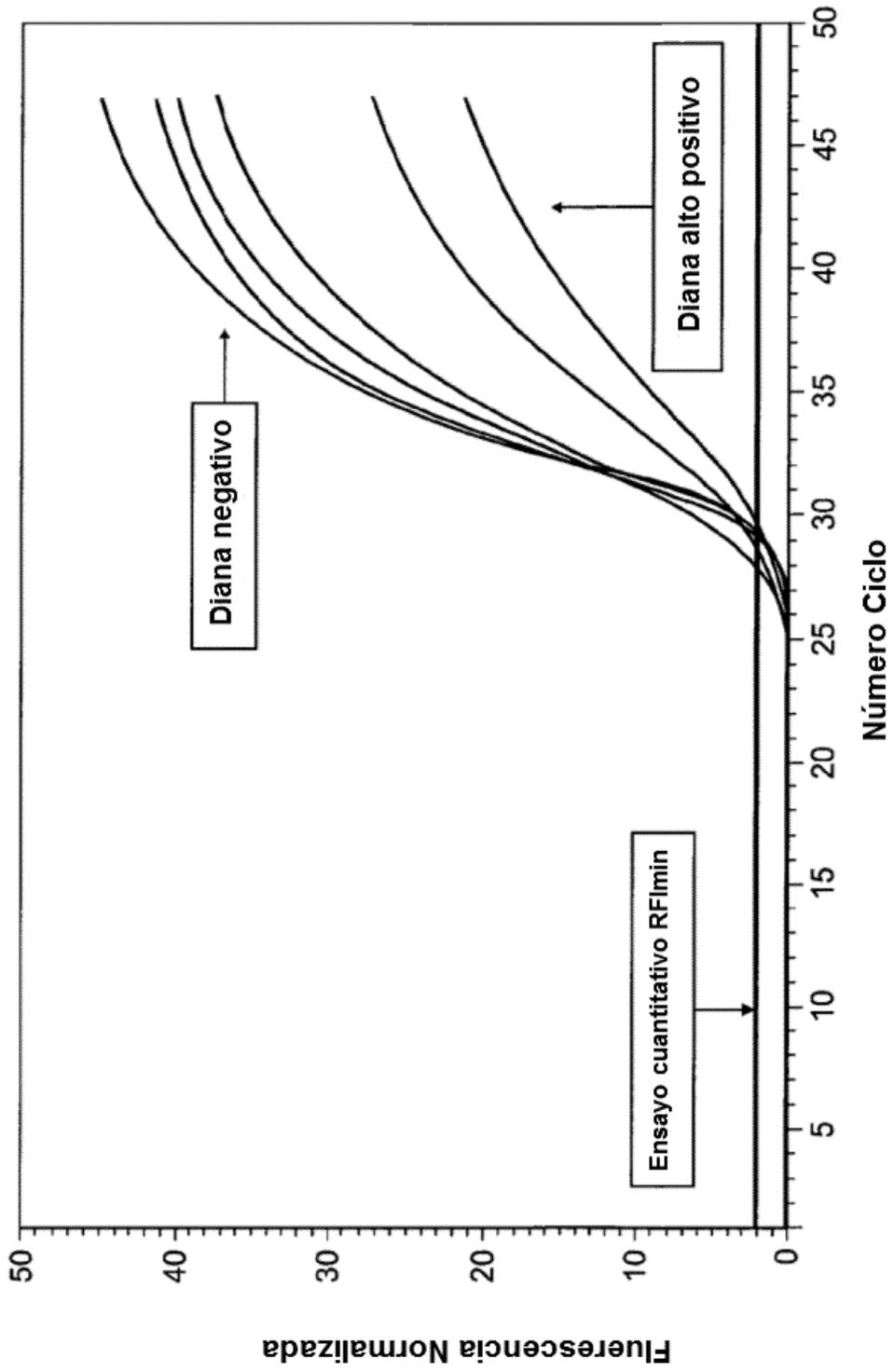


Fig. 1a

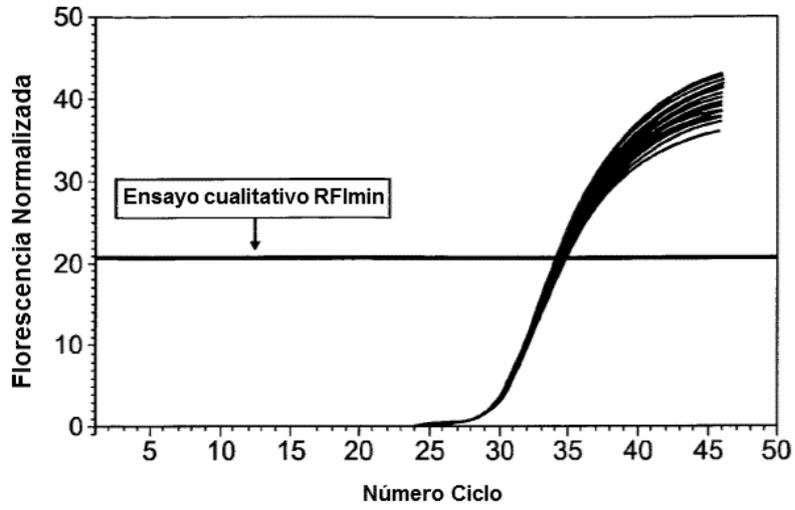
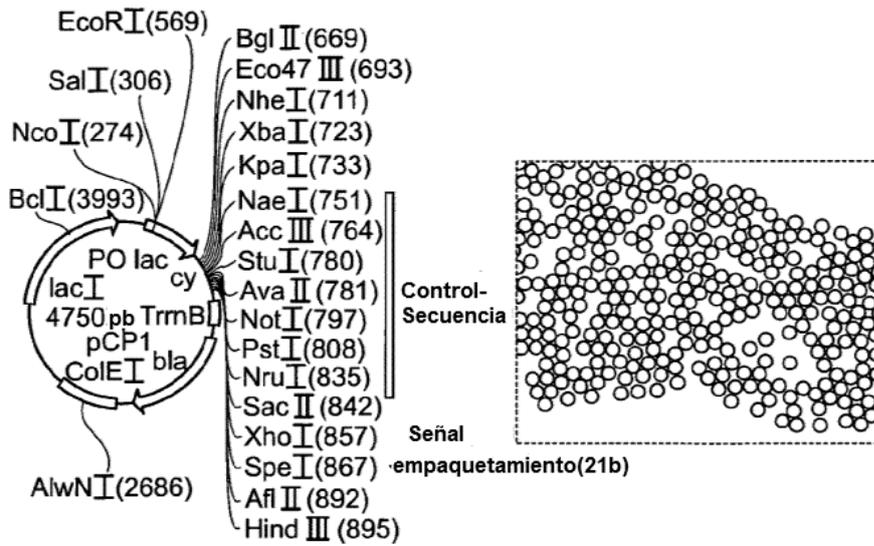


Fig. 1b



Vector de expresión de partículas ARNa y partículas ARNa

Fig. 2

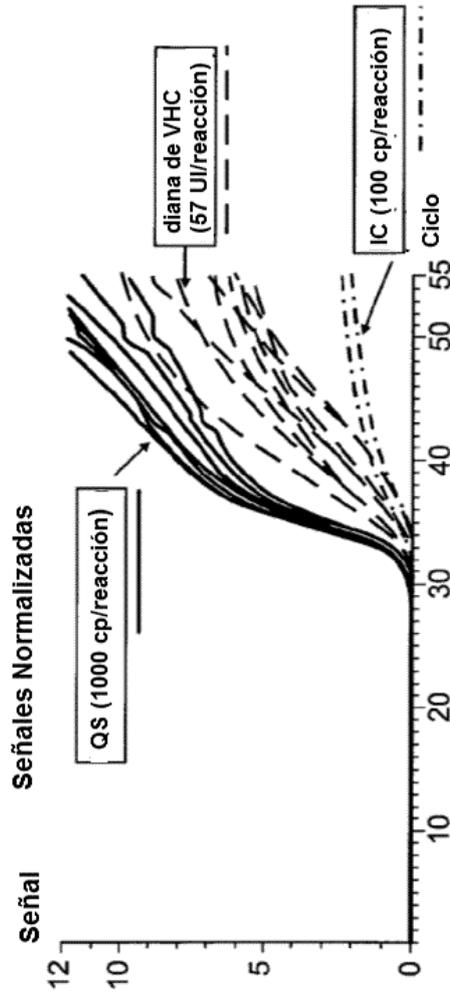


Fig. 3

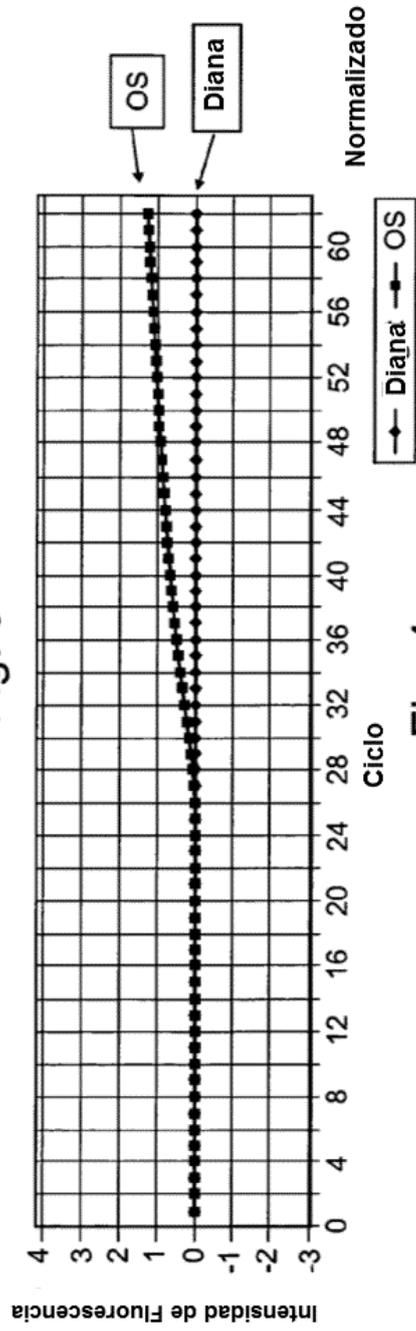


Fig. 4a

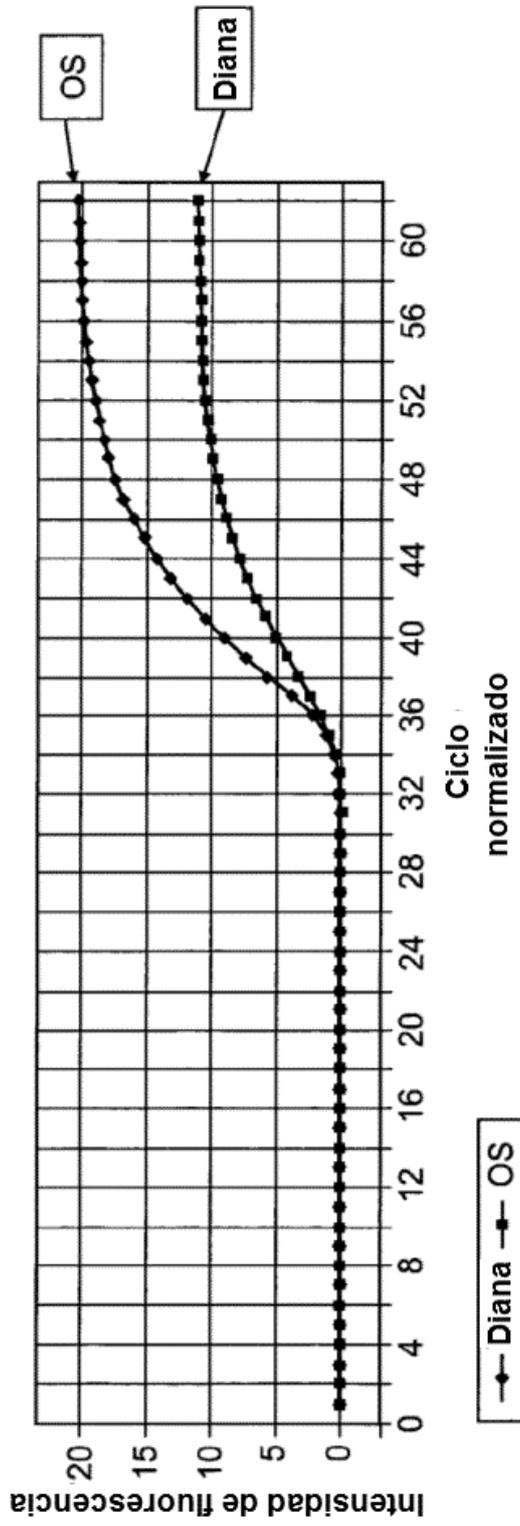


Fig. 4b