

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 871**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12Q 1/70** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.01.2013 PCT/US2013/020180**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.07.2013 WO13103744**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.01.2013 E 13733757 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017 EP 2800822**

54 Título: **Ensayos mejorados de la actividad de ADN polimerasa y métodos que facilitan la detección de microbios viables**

30 Prioridad:

**05.01.2012 US 201261583568 P**

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

**17.07.2017**

73 Titular/es:

**ZEUS SCIENTIFIC, INC. (100.0%)  
P.O. Box 38  
Raritan, NJ 08869, US**

72 Inventor/es:

**O'HARA, SHAWN, MARK y  
ZWEITZIG, DANIEL R.**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 624 871 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

Ensayos mejorados de la actividad de ADN polimerasa y métodos que facilitan la detección de microbios viables

5 **Referencia cruzada con una solicitud relacionada**

La presente solicitud es una solicitud no provisional, que reivindica su prioridad sobre la Solicitud Provisional de EE. UU. N° 61/583.568, presentada el 5 de junio de 2012.

10 **Antecedentes de la invención**

Los números de referencia que se utilizan en esta sección y a lo largo de la presente divulgación se refieren a los documentos expuestos en la sección "Referencias" del presente documento.

15 La actividad de la ADN polimerasa es indispensable para la replicación del genoma y la propagación del organismo a través de todos los dominios biológicos (1-3). Desde su caracterización inicial (4), la capacidad para utilizar la actividad de la ADN polimerasa *in vitro* se ha convertido en una herramienta fundamental en el campo de la investigación en biología molecular (5). Más allá de su importancia establecida en investigación, la medición *in vitro* de la actividad de la ADN polimerasa ofrece potencialmente numerosas aplicaciones útiles en el campo farmacéutico y clínico. Por ejemplo, ya que la ADN polimerasa bacteriana ha sido dirigida activamente para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos (6,7), es deseable un ensayo rápido y sensible capaz de medir la actividad de la ADN polimerasa. También, la pérdida o ganancia de actividad de ADN polimerasa está implicada íntimamente en la enfermedad humana. Por ejemplo, hay uniones emergentes entre la actividad de ADN polimerasa y las aberraciones genéticas que han designado la enzima como una diana para terapias anti-cáncer (8,9). Las deficiencias en la actividad de la ADN polimerasa también se ha relacionado con trastornos mitocondriales (10). Además, la medición de la actividad de la ADN polimerasa tiene el potencial de utilizarse como una herramienta diagnóstica rápida y sensible, capaz de detectar cualquier organismo que albergue una ADN polimerasa activa en una determinada matriz ambiental o biológica en la que se espera la esterilidad.

30 El método más común que se utiliza para medir la actividad de la ADN polimerasa *in vitro* depende de la incorporación de nucleótidos radiomarcados (11). Sin embargo, el uso rutinario de dichos ensayos de ADN polimerasa no es deseable debido a los riesgos y restricciones inherentes asociados a los radioisótopos. En consecuencia, durante las últimas pocas décadas se han desarrollado numerosos ensayos no radioactivos de polimerasa *in vitro*. Algunos se basan en la medición de la fluorescencia generada por la liberación mediada por ADN polimerasa de la cadena sencilla unida a proteína (12) o el PicoGreen™ unido al ADN de doble cadena (13, 35 14). Otros métodos se basan en el acoplamiento en microplacas y la detección de nucleótidos marcados con fluorescencia (15). Más recientemente se han desarrollado ensayos de ADN polimerasa basados en balizas moleculares (16) y basados en electroquímica (17). A pesar de evitar satisfactoriamente el uso de radioactividad, los ensayos anteriores están limitados por factores tales como la baja sensibilidad, un rango dinámico lineal de medición pequeño, o el uso de polimerasa purificada.

Como será evidente para los expertos en la técnica relevante, la medición de la actividad de extensión de la ADN polimerasa de acuerdo con la presente invención como se describe en el presente documento representa una herramienta útil con gran alcance de aplicaciones tales como, pero sin limitarse a, exploración de candidatos de 45 inhibidores de polimerasa *in vitro*, o detección de la presencia de cualquier microbio (que albergue ADN polimerasas activas) en un diverso intervalo de tipos de muestras. Esto es una mejora sustancial sobre el estado de la técnica actual, debido a que si así se pretende para estos fines, el uso rutinario de ensayos tradicionales de polimerasa que incorporan nucleótidos radiomarcados es poco atractivo. En consecuencia, en las últimas décadas se han desarrollado ensayos de extensión por ADN polimerasa no radioactivos. A pesar de evitar satisfactoriamente el uso de radioactividad, los ensayos actuales de ADN polimerasa basados en fluorescencia también tienen distintas deficiencias. Por ejemplo, la detección de actividad de ADN polimerasa por medio de distintos ensayos no radioactivos depende de la unión de PicoGreen™ a un ADN de doble cadena recién generado (13, 14). Si se pretende analizar la actividad de la ADN polimerasa a partir de organismos recién lisados, los ensayos basados en PicoGreen™ probablemente están entorpecidos por la fluorescencia de fondo por la unión de PicoGreen™ al ADN 55 genómico. También se han desarrollado ensayos de ADN polimerasa basados en microplacas (15). Se puede esperar una disminución de la sensibilidad de los ensayos basados en microplacas por numerosas razones, incluyendo la dependencia de una unión intermedia de cada producto o sustrato a un microplaca y/o la incorporación ineficaz de dNTP modificados por la ADN polimerasa. Más recientemente, se ha descrito la medición de actividad de ADN polimerasa en tiempo real por medio de balizas moleculares (16). A pesar de una sensibilidad mejorada, la medición directa de balizas moleculares de fluorescencia también podría potencialmente estar entorpecida por la 60 exposición a lisados celulares en bruto.

El documento WO2011/130584 desvela un método para detectar microorganismos basándose en su actividad de ADN polimerasa y utilizando PCR.

65

## Sumario de la invención

La presente invención mejora la tecnología de la técnica antecedente como se ha descrito anteriormente y proporciona un ensayo rápido, altamente sensible y cuantitativo, capaz de medir la actividad de extensión de la ADN polimerasa a partir de enzimas purificadas o directamente a partir de lisados microbianos, incluyendo lisados microbianos en bruto. La invención como se describe en el presente documento proporciona un avance significativo e inesperado para la detección de cualquier microorganismo potencial que contenga ADN polimerasa activa en una determinada matriz de muestra. La presente invención implica la metodología para la generación y la amplificación de matrices enzimáticas (ETGA). En consecuencia se describe en el presente documento la primera caracterización de una nueva metodología ETGA basada en la medición de la actividad de extensión de la ADN polimerasa acoplada a una lectura cuantitativa por PCR. Para el resto de la divulgación de presente documento, se hace referencia a este tipo de ensayo diagnóstico proporcionado por la invención como DPE-PCR. En ensayo DPE-PCR de la presente invención se puede utilizar para medir bajos niveles de enzima purificada y es capaz de detectar la actividad de extensión de la ADN polimerasa endógena directamente de lisados celulares microbianos.

## Breve descripción de las figuras dibujadas

La Figura 1 es una visión esquemática de un ensayo de diagnóstico DPE-PCR de acuerdo con la presente invención, y donde: **(Etapa A)** la ADN polimerasa se incuba con un sustrato que consiste en un Oligo-1 y un Oligo-2 pre-hibridados. **(Etapa B)** Durante una incubación de 20 minutos a 37 °C, la ADN polimerasa solo extiende el extremo 3' del Oligo-1. **(Etapa C)** Se colocan posteriormente 3 µl de la mezcla de reacción en el inicio caliente de una reacción qPCR que contiene uracil ADN glucosilasa (UDG). Antes de la activación de Taq, la UDG degrada la desoxiuridina en el Oligo-2, dejando solo un producto de cadena sencilla derivado de la extensión del Oligo-1 mediada por la polimerasa. **(Etapa D)** Tras la activación de Taq, se inicia la amplificación mediante la unión del cebador al producto de extensión del Oligo-1. **(Etapa E)** Ciclado de la PCR y detección mediante una sonda Taqman.

La Figura 2 es una representación esquemática de la detección sensible de ADN polimerasa purificada utilizando DPE-PCR de acuerdo con una realización preferida de la presente invención, y donde: **(A)** Se ensayó una fuente comercial de ADN polimerasa I por duplicado con aumentos de 10 veces comenzando en  $2 \times 10^{-5}$  Unidades (U) hasta  $2 \times 10^{-11}$  U por reacción. Se muestra una curva DPE-PCR representativa para cada nivel de introducción de polimerasa y el control sin introducción (NIC). **(B)** Se construyó un gráfico a partir de  $n=4$  puntos de datos por nivel de introducción de polimerasa, tomados de dos experimentos independientes y se llevó a cabo un análisis de regresión lineal. **(C)** Se ensayaron por triplicado las reacciones que contenían  $2 \times 10^{-7}$  U de ADN polimerasa I, Klenow, Klenow (exo-) y ADN ligasa de *E. coli* en comparación con un NIC. Se presenta una curva DPE-PCR representativa para cada una de las enzimas ensayadas y el NIC. **(D)** Se comparó una señal DPE-PCR en las reacciones que contenían una mezcla dNTP con dCTP o ddCTP, se presenta un esquema que representa los sitios disponibles para la incorporación de dCTP o ddCTP en el sustrato ADN adyacente a las curvas DPE-PCR.

La Figura 3 es una vista esquemática de lisis por perlas acopladas a la DPE-PCR de acuerdo con una realización preferida de la presente invención.

La Figura 4 es una representación gráfica de cómo la realización de DPE-PCR de acuerdo con la presente invención facilita la detección sensible y cuantitativa de bacterias gram negativas y gram positivas mediante la medición de la actividad de extensión de la ADN polimerasa en lisados en bruto, y donde: **(A)** Se vertieron cantidades decrecientes de *ufc* de *E. coli* en DPE-PCR acoplada a perlas de lisis. También se incluyeron controles sin introducción (NIC) para controlar los niveles de fondo del reactivo. Todos los vertidos de *ufc* y los NIC se llevaron a cabo por triplicado. Se muestra una curva DPE-PCR representativa para cada nivel de introducción bacteriana. Se llevaron a cabo el recuento de colonias en las placas y gsPCR en un esfuerzo para obtener una mejor estimación de las *ufc* colocadas en cada reacción. **(B)** Se presenta un gráfico de la actividad de ADN polimerasa de *E. coli* y el análisis de regresión lineal. Los gráficos se generaron utilizando los valores medios del Ct obtenidos de las reacciones por triplicado de los vertidos bacterianos que variaban de  $1 \times 10^5 - 1 \times 10^1$  *ufc* introducidas. **(C y D)** Se llevó a cabo la titulación de *ufc* para *S. aureus* exactamente como se ha descrito anteriormente para la *E. coli*. Se llevaron a cabo el recuento de colonias en las placas y la gsPCR en un esfuerzo para obtener una mejor estimación de la *ufc* actual colocada en cada reacción.

La Figura 5 muestra una representación gráfica de la detección de bacterias por DPE-PCR de acuerdo con otra realización preferida de la presente invención, y donde: **(A)** Se añadieron 5 µl de suspensión de *E. coli* a los ensayos de ADN polimerasa acoplados a perlas de lisis que comprendían una mezcla de dNTP que contenía 50 µM de dCTP o 50 µM de ddCTP. Se presentan las curvas DPE-PCR que representan la actividad de ADN polimerasa. La introducción aproximada de *ufc* determinada por la colocación en placas se presenta en la región superior izquierda del gráfico de qPCR. **(B)** Se añadieron 5 µl de suspensión de *E. coli* a tubos de lisis con perlas que contenían 50 µl de tampón de reacción compuesto por una mezcla de dNTP con 50 µM de dCTP o 50 µM de ddCTP. Antes de la lisis, se añadió 1 µl de dCTP [2,5 mM, 0,25 mM, 0,025 mM, 0,0025 mM] para seleccionar las reacciones que contenían ddCTP. Las reacciones que contenían dCTP solo o ddCTP solo se ejecutaron en paralelo como comparaciones "no terminadas" y "terminadas". Se presentan las curvas DPE-PCR resultantes

que representan la actividad de ADN polimerasa derivada de *E. coli*. Se presenta la introducción aproximada de *ufc* por colocación en placas en la región inferior izquierda del gráfico qPCR. **(C)** También se llevó a cabo una PCR genética específica de *E. coli* en los mismos lisados utilizados para la detección de ADN polimerasa presentada en la Figura 2B. Se muestran gráficos lineales del rescate dependiente de dCTP de la detección de ADN polimerasa bacteriana frente a la gsPCR del ADN genómico. Los gráficos se generaron utilizando los valores medios del Ct de qPCR de las reacciones por triplicado en las condiciones indicadas. **(D-F)** Se llevaron a cabo los experimentos de terminación con ddCTP y rescate con dCTP para *S. aureus* exactamente como se ha descrito anteriormente para *E. coli*.

La Figura 6 es una ilustración gráfica de otra realización de la presente invención en la que DPE-PCR es un indicador de la viabilidad de *E. coli* en respuesta a un tratamiento por calor, y donde: **(A)** se incubaron alícuotas de 200  $\mu$ l de una suspensión de *E. coli* (~2000 *ufc*/ $\mu$ l) a 25 °C, 45 °C, 65 °C, 85 °C y 105 °C durante 20 minutos. Tras el calentamiento, cada materia prima bacteriana se enfrió a temperatura ambiente y se transfirieron 5  $\mu$ l al ensayo DPE-PCR acoplado a perlas de lisis. Se presentan las curvas DPE-PCR que representan la actividad de ADN polimerasa derivada de *E. coli* después de cada uno de los tratamientos a la temperatura indicada. **(B)** Se generaron los gráficos de las reacciones de DPE-PCR por triplicado y la gsPCR del ADN genómico (de los mismos lisados) después de los tratamientos a la temperatura indicada de las suspensiones de *E. coli*. También se llevó a cabo la colocación en placas de manera paralela por triplicado para cada una de las suspensiones de *E. coli* tratadas. Las placas de control de *ufc* representativas se presentan debajo del gráfico, revelando el estado de viabilidad bacteriana tras el tratamiento a cada temperatura. **(C)** Se comparó la DPE-PCR con la gsPCR del ADN genómico en respuesta a distintos tratamientos de temperatura. Se calculó "las veces de reducción de señal de qPCR" utilizando la ecuación indicada y se utilizaron los valores obtenidos para generar los gráficos de barras comparativos.

La Figura 7 es una ilustración gráfica de otra realización de la presente invención en la que la DPE-PCR es un indicador de la viabilidad de *S. aureus* en respuesta al tratamiento por calor, y donde: **(A)** se incubaron alícuotas de 200  $\mu$ l de una suspensión de *S. aureus* (~2000 *ufc*/ $\mu$ l) a 25 °C, 45 °C, 65 °C, 85 °C y 105 °C durante 20 minutos. Tras el calentamiento, cada materia prima bacteriana se enfrió a temperatura ambiente y se transfirieron 5  $\mu$ l al ensayo DPE-PCR acoplado a perlas de lisis. Se presentan las curvas DPE-PCR que representan la actividad de ADN polimerasa derivada de *S. aureus* después de cada uno de los tratamientos a la temperatura indicada. **(B)** Se generaron los gráficos de las reacciones de DPE-PCR por triplicado y la gsPCR del ADN genómico (de los mismos lisados) después de los tratamientos a la temperatura indicada de las suspensiones de *S. aureus*. También se llevó a cabo la colocación en placas de manera paralela por triplicado para cada una de las suspensiones de *S. aureus* tratadas. Las placas de control de *ufc* representativas se presentan debajo del gráfico, revelando el estado de viabilidad bacteriana tras el tratamiento a cada temperatura. **(C)** Se comparó la DPE-PCR con la gsPCR del ADN genómico en respuesta a distintos tratamientos de temperatura. Se calculó "las veces de reducción de señal de qPCR" utilizando la ecuación indicada y se utilizaron los valores obtenidos para generar los gráficos de barras comparativos.

La Figura 8 expone la Tabla 1, como se hace referencia en el presente documento, en la que se han expuesto los resultados que muestran la sensibilidad y la detección lineal de 17 especies microbianas clínicamente relevantes de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención.

#### Descripción detallada de la invención

Durante los últimos cincuenta años, la medición de la actividad de ADN polimerasa *in vitro* se ha convertido en una herramienta esencial en biología molecular. Los métodos tradicionales utilizados para medir la actividad de ADN polimerasa *in vitro* no son deseables debido al uso de radionucleótidos. Se han desarrollado ensayos de ADN polimerasa basados en fluorescencia; sin embargo, también tienen distintas limitaciones. En el presente documento se desvela un ensayo rápido, altamente sensible y cuantitativo capaz de medir la actividad de extensión de la ADN polimerasa de enzima purificadas o directamente a partir de lisados microbianos. Cuando se ensaya con ADN polimerasa purificada, se encuentra que el ensayo detecta tan poco como  $2 \times 10^{-11}$  U de enzima ( $\approx 50$  moléculas), mientras que demuestra una linealidad excelente ( $R^2 = 0,992$ ). El ensayo también era capaz de detectar la actividad de extensión de la ADN polimerasa endógena de hasta al menos 10 unidades formadoras de colonias de bacterias gram positivas o gram negativas introducidas cuando se acoplaban a perlas de lisis para molerlas mientras que se mantiene una  $R^2 = 0,999$ . Además, las pruebas experimentales presentadas en el presente documento sugieren que la actividad de extensión de la ADN polimerasa es un indicador de la viabilidad bacteriana, como se demuestra por la concordancia fuertemente reproducible entre la señal del ensayo y la formación de colonias bacterianas. En conjunto, la nueva metodología de la invención que se describe en el presente documento representa un avance significativo hacia la detección sensible de cualquier microorganismo potencial que contenga ADN polimerasa activa en una matriz de muestra determinada.

La presente invención proporciona un método *in vitro* para llevar a cabo un ensayo de diagnóstico para la detección de la presencia o cantidad de un microorganismo en una muestra que contiene ADN polimerasa activa mediante la medición de la actividad de extensión de la ADN polimerasa, cuyo ensayo comprende las etapas de incubación de la ADN polimerasa de la muestra con un sustrato seleccionado adecuado, y llevar a cabo un ciclo de PCR y la

detección mediante el uso de una sonda de ácido nucleico seleccionada adecuada, para detectar de esta manera la actividad de extensión de la ADN polimerasa endógena en la muestra como una indicación de la presencia o cantidad de dicho microorganismo, donde dicho sustrato con el que se incubaba dicha ADN polimerasa consiste en dos oligonucleótidos pre-hibridados donde uno de dichos oligonucleótidos contiene nucleósidos de desoxiuridina, y antes de dicho ciclo de PCR dicha ADN polimerasa extiende solamente el extremo 3' del oligonucleótido que no contiene nucleósidos de desoxiuridina y posteriormente se añade uracil ADN glucosilasa para degradar el oligonucleótido que contiene nucleósidos de desoxiuridina de manera que solo el producto de cadena sencilla derivado de la extensión mediada por polimerasa pasa al ciclado por PCR.

Para ilustrar adicionalmente los conceptos anteriores y las ventajas de la invención, se proporcionan los siguientes ejemplos como ilustrativos de la presente invención, pero no se considera de ninguna manera como limitantes de la misma.

### Ejemplo

#### MATERIALES Y MÉTODOS:

##### Preparación de sustrato de ADN

La secuencia de sustrato de ADN (y los cebadores de PCR que se presentan posteriormente) se adaptaron de oligos de ADN utilizados previamente para medir el ATP derivado de bacterias por medio de T4 ADN ligasa (18). En resumen, el Oligo 1 y el Oligo-2 (véase Figura 1) se pre-hibridaron y diluyeron a la concentración de trabajo de 0,01  $\mu$ M.

##### Reacción de actividad de ADN polimerasa utilizando una polimerasa comercial

Se diluyeron ADN Pol I (NEB n° de cat. M0209L), Klenow (NEB n° de cat. M0210S) y Klenow exo (-) (NEB n° de cat. M0212S) hasta las U/ $\mu$ l de las materias primas en Tris EDTA (T.E.) pH 8,0. Para comenzar, se colocaron 2  $\mu$ l de la materia prima de ADN polimerasa a cada concentración en 50  $\mu$ l de una mezcla de ensayo de polimerasa que contenía los siguientes componentes: 50  $\mu$ M de dNTP, 20 mM de Tris pH 8,0, 10 mM de sulfato amónico, 10 mM de cloruro potásico, 2 mM de sulfato magnésico, un 1% de BSA, un 0,1% de Triton, un 0,1% de Tween, y 0,001  $\mu$ M de sustrato de ADN pre-hibridado. Las reacciones se agitaron brevemente y se colocaron a 37 °C durante 20 minutos. Tras los 20 minutos, se colocaron inmediatamente 3  $\mu$ l de cada reacción en una reacción de PCR cuantitativa (qPCR).

##### Detección por qPCR

La mezcla maestra para la reacción de qPCR se preparó utilizando los siguientes componentes: Mezcla Maestra LightCycler 480 (Roche n° de cat. 04707494001), 333 nM de cada cebador, 166 nM de sonda diana (FAM), 166 nM de sonda interna de control (TxRed), y 1,2 U de UDG (Bioline n° de cat. BIO-20744). Como herramienta para controlar la inhibición de PCR, cada reacción qPCR incluía también 40 copias de control de ADN interno competitivo. Para cada reacción de qPCR, se añadieron 3  $\mu$ l de reacción de ADN polimerasa a 27  $\mu$ l de mezcla maestra y se ejecutó una qPCR de dos etapas en un SmartCycler (Cepheid, Sunnyvale, CA) de la siguiente manera: incubación inicial de 40 °C durante 10 minutos y 50 °C durante 10 minutos y a 95 °C durante 5 minutos (para activar Taq), seguido por 45 ciclos de 5 s de desnaturalización a 95 °C y 20 s de hibridación/extensión a 65 °C. Los valores del umbral de ciclo (Ct) se generaron automáticamente por el software SmartCycler utilizando un 2° análisis derivado de las curvas de qPCR emergentes.

##### Cepas bacterianas y medios

Se utilizaron *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Escherichia coli* (ATCC 25922) en este estudio. Se cultivaron los cultivos en/sobre medios líquidos de infusión Brain-Heart/agar (Teknova). Los 17 microorganismos adicionales ensayados se enumeran en la Tabla 1.

##### Detección de actividad de ADN polimerasa bacteriana después de la lisis con perlas de moler

Los cultivos de *S. aureus* y *E. coli* se cultivaron a una  $DO_{600}$  de  $1,0 \pm 0,2$  (aproximadamente  $1 \times 10^9$  *ufc/ml*). Para cada organismo, 1 ml del cultivo se aglomeró y se lavó tres veces en T.E. Las suspensiones bacterianas se diluyeron en serie en T.E., y se añadieron 5  $\mu$ l de cada materia prima a las reacciones de lisis con perlas que contenían 50  $\mu$ l del tampón de la reacción de lisis. Se llevó a cabo una curva de titulación de  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^0$  *ufc/reacción* por triplicado de cada organismo, incluyendo las reacciones por triplicado sin suspensión bacteriana (Control sin introducción). Tras la adición de 5  $\mu$ l de materia prima bacteriana (o control sin introducción), se molieron con perlas en los tubos de la reacción de lisis durante 6 min a 2800 rpm, seguido por la incubación a 37 °C durante 20 min. Tras la incubación de 20 minutos, las muestras se calentaron a 95 °C durante 5 minutos y se retiraron para enfriarlas a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron entonces a 12k x g durante 30 segundos y se colocaron 3  $\mu$ l de cada reacción en la qPCR. Se colocaron en placas cinco microlitros de cada materia prima

bacteriana para obtener niveles de introducción de *ufc* más precisos. Se llevó a cabo también la PCR específica de organismo sobre los mismos lisados utilizados para la detección de ADN polimerasa.

#### Experimentos de terminación con didesoxi

5

Terminación de actividad de extensión de la ADN polimerasa purificada con ddCTP:

10

Las reacciones de ADN polimerasa se prepararon como se ha descrito anteriormente con una mezcla de dNTP que contenía 50  $\mu\text{M}$  de dCTP o 50  $\mu\text{M}$  de ddCTP (Affymetrix nº 77332). Se vertieron en las reacciones que contenían cualquiera de las mezclas dNTP  $2 \times 10^{-9}$  U de ADN polimerasa I (New England Biolabs nº M0209). Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 20 minutos y se colocaron posteriormente 3  $\mu\text{l}$  de cada reacción en la qPCR.

15

Eliminación de la detección microbiana mediante ddCTP:

20

Se cultivaron los cultivos de *S. aureus* y *E. coli*, se lavaron y diluyeron como se ha descrito anteriormente. Para demostrar la terminación dependiente de ddCTP de ADN polimerasa microbiana, se añadieron 5  $\mu\text{l}$  de materia prima bacteriana a los tubos de lisis por perlas que contenían 50  $\mu\text{l}$  de tampón de reacción con 50  $\mu\text{M}$  de dCTP o 50  $\mu\text{M}$  de ddCTP. Se llevaron a cabo la lisis, incubación y qPCR como se ha descrito anteriormente. Se colocaron en placas cinco microlitros de cada materia prima bacteriana para determinar los niveles de introducción de *ufc* más precisamente. La PCR genética específica de ADN genómico también se llevó a cabo en los mismos lisados utilizados para la detección de ADN polimerasa.

25

Rescate con dCTP de la detección microbiana:

30

Los cultivos de *S. aureus* y *E. coli* se cultivaron, se lavaron y diluyeron como se ha descrito anteriormente. Se añadieron cinco microlitros de materia prima bacteriana a los tubos de lisis por perlas que contenían 50  $\mu\text{l}$  del tampón de reacción con 50  $\mu\text{M}$  de ddCTP. Antes de la lisis, se añadió 1  $\mu\text{l}$  de dCTP a 2,5 mM, 0,25 mM, 0,025 mM, 0,0025 mM a las reacciones que contenían ddCTP. Las reacciones que contenían 50  $\mu\text{M}$  de dCTP solo o ddCTP solo se ejecutaron en paralelo como comparadores “no terminados” y “terminados”. Se llevó a cabo la lisis, incubación y qPCR como se ha descrito anteriormente. Se colocaron en placas cinco microlitros de cada materia prima bacteriana para determinar los niveles de *ufc* introducidos más precisamente. También se llevó a cabo la PCR genética específica en los mismos lisados utilizados para la detección de ADN polimerasa.

35

#### Experimentos de evaluación de viabilidad

40

Los cultivos de *S. aureus* y *E. coli* se cultivaron, lavaron y diluyeron como se ha descrito anteriormente. Se incubaron doscientos microlitros de materia prima bacteriana a aproximadamente 2000 *ufc*/ $\mu\text{l}$  (en T.E.) a 25 °C, 45 °C, 65 °C, 85 °C y 105 °C durante 20 minutos. Tras el calentamiento, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se añadieron 5  $\mu\text{l}$  de cada materia prima bacteriana a los tubos de lisis en perlas que contenían 50  $\mu\text{l}$  de tampón de reacción. Se llevaron a cabo la lisis, incubación y qPCR como se ha descrito anteriormente. Se añadieron también cinco microlitros de cada materia prima bacteriana (tratadas a distintas temperaturas) a 1 ml de T. E. y se colocaron 50  $\mu\text{l}$  para la determinación del recuento de colonias. La PCR genética específica se llevó a cabo también en los mismos lisados utilizados para la detección de ADN polimerasa.

45

#### RESULTADOS Y CONCLUSIÓN

50

En el desarrollo de la presente invención, se realizó el desarrollo de un ensayo rápido, simple, altamente sensible y cuantitativo capaz de medir la actividad de extensión de la ADN polimerasa purificada derivada de fuentes comerciales o células recién lisadas, que mejoraría y superaría las desventajas de las metodologías descritas anteriormente en la técnica conocida. La Figura 1 muestra una vista esquemática de los mecanismos implicados en el acoplamiento de la actividad de extensión de la ADN polimerasa con una qPCR. Excepcionalmente, el Oligo 2 (véase la Figura 1, etapa C) se retira mediante la ADN glucosidasa (UDG) antes de la activación Taq, evitando así la extensión no específica del sustrato justo antes de los ciclos de PCR. Se había expuesto previamente (18) un método de detección microbiana que unía la actividad de la ADN ligasa con la amplificación por PCR, que contiene similitudes con el ensayo DPE-PCR de los inventores y es otro ejemplo de una metodología ETGA. (Los documentos WO 2009/007719 y WO 2007/003938 también desvelan la detección de microorganismos basándose en la actividad de la ligasa). Sin embargo, durante el desarrollo de la presente invención una versión de este método, dirigida a la detección de actividad ADN ligasa dependiente de NAD, tenía varias limitaciones (datos no publicados), que dieron lugar al desarrollo de la nueva estrategia basada en ADN polimerasa de la invención como se describe en el presente documento.

60

### Detección sensible y lineal de la actividad de extensión de la ADN polimerasa

Se llevó a cabo un experimento para determinar la sensibilidad analítica aproximada del ensayo DPE-PCR utilizando ADN polimerasa I disponible en el mercado. Como se muestra en la Figura 2A, se consiguió la detección de ADN polimerasa I por encima de un amplio intervalo de introducción enzimática. De hecho, la medición de la actividad de extensión de la ADN polimerasa I se conseguía con tan poco como  $2 \times 10^{-11}$  unidades (U) de enzima (equivalente aproximadamente a 50 moléculas de polimerasa). Según el conocimiento de los inventores la detección de la actividad de extensión de la ADN polimerasa a este nivel no tiene rival en los ensayos de ADN polimerasa existentes. En teoría, este nivel de sensibilidad podría ser capaz de la detección de un único microbio como *E. coli* que tiene, como se ha informado (11), aproximadamente 400 moléculas de ADN polimerasa por célula. El análisis de regresión también mostraba una correlación lineal fuertemente positiva ( $R^2 = 0,992$ ) entre los valores de umbral de ciclo (Ct) de DPR-PCR y las unidades de introducción de ADN polimerasa I comercial tras los datos representados en gráfico de dos límites independientes de experimentos de detección (Figura 2B). Tras los experimentos de sensibilidad y linealidad, era importante determinar si la señal del ensayo DPE-PCR era independiente de la actividad exonucleasa intrínseca. En este punto, los inventores compararon posteriormente las señales generadas por  $2 \times 10^{-7}$  U de ADN polimerasa I con las generadas por la ADN polimerasa que carece de actividad exonucleasa  $5' \rightarrow 3'$  (Klenow) y otra versión de la enzima que carece de toda actividad exonucleasa (Klenow exo-). Para la determinación de la señal de especificidad adicional y de fondo, se ensayaron la ADN ligasa de *E. coli* a  $2 \times 10^{-7}$  U y el control sin introducción (NIC) en paralelo. Como se muestra en la Figura 2C tanto Klenow y Klenow exo- se detectaron a niveles similares cuando se comparaban con la ADN polimerasa I de tipo silvestre, proporcionando las pruebas de que la señal del ensayo DPE-PCR se derivaba de la extensión dependiente de ADN polimerasa y no de la actividad exonucleasa intrínseca. Además de utilizar polimerasas libres de exonucleasa, los inventores pretendían demostrar adicionalmente que la señal del ensayo DPE-PCR se deriva de la extensión dependiente de ADN polimerasa del sustrato de ADN antes de la qPCR. Como la incorporación de nucleótidos didesoxi es un método bien establecido utilizado para la terminación de las actividades de extensión de cadena por ADN polimerasa (19, 20) los inventores escogieron sustituir el dCTP por didesoxi-CTP (ddCTP) en la mezcla de reacción de los inventores. El esquema que se muestra en la Figura 2D revela la primera posición posible en el sustrato en que el ddCTP puede incorporarse a la ADN polimerasa. Si se incorpora el ddCTP en esta posición, el producto de extensión del Oligo-1 sería insuficiente en longitud para la detección posterior por el cebador 1 de la qPCR (Figura 1). Como se muestra en la Figura 2D, la sustitución de dCTP con ddCTP elimina la señal generada por la ADN polimerasa I, demostrando así que la señal del ensayo DPR-PCR es dependiente de la extensión de la ADN polimerasa del sustrato antes de la qPCR. La presencia de una baja amplificación de la copia interna de control confirma que la qPCR no se inhibía en presencia de pocas cantidades de ddCTP que se aportaba a partir de los reactivos del ensayo de ADN polimerasa. Además, los inventores consideran que es importante señalar que observaron esporádicamente una señal débil, pero detectable en ausencia de introducción de ADN polimerasa (Control sin introducción). Debido a la exquisita sensibilidad del ensayo DPE-PCR, los inventores han demostrado que las señales de ruido de fondo débiles pueden derivarse de varias fuentes potenciales tales como, pero sin limitarse a, la contaminación con ADN polimerasa presente en los reactivos antes del ensamblaje de la reacción, la ADN polimerasa introducida por el operador durante el procedimiento experimental y/o la degradación incompleta de la polimerasa de Oligo 2 (Figura 1) antes de la activación de Taq (datos no publicados). Excepcionalmente, estas fuentes irregulares de ruido de fondo son controlables instituyendo procedimientos de preparación de reactivos más estrictos y una buena técnica de asepsia.

### Detección sensible universal de microbios mediante medición de actividad de extensión de la ADN polimerasa endógena directamente de lisados celulares

Además de la detección de la actividad de polimerasa purificada, sería altamente deseable un método simple, universal, que mida la actividad de ADN polimerasa derivada de microbios. Si se consigue, dicho método podría facilitar la exploración de agentes antimicrobianos candidatos en cultivos en crecimiento activo, permitiendo de esta manera la comparación de la actividad de extensión de la ADN polimerasa con la proliferación del organismo. De manera adicional, la medición de la actividad de extensión de la ADN polimerasa se podría utilizar para explorar muestras ambientales o biológicas en cuanto a la presencia de microorganismos que albergan ADN polimerasa activa. En este punto, los inventores desarrollaron un método simple que acopla lisis microbiana con el ensayo DPE-PCR proporcionado por la invención. Como se muestra en la Figura 3, una muestra líquida que se sabe o se sospecha que contiene microbios se añade a un tubo de lisis por molido con perlas, se destruyen y se pasa inmediatamente al ensayo DPE-PCR. Los inventores escogieron una bacteria gram negativa (*E. coli*) y una bacteria gram positiva (*S. aureus*) para demostrar la capacidad de su ensayo para medir la actividad de extensión de la ADN polimerasa en lisados celulares en bruto. Como se muestra en la Figura 4A, cuando se une con la lisis del molido con perlas, el ensayo DPE-PCR es capaz de detectar un amplio rango dinámico de *E. coli* introducida, hasta de 10 unidades formadoras de colonias (*ufc*) o menos por tubo de lisis. Los análisis de regresión lineal de detección de *E. coli* también se llevaron a cabo hasta en 10 *ufc* de bacterias introducidas y mostraba una correlación lineal fuertemente positiva entre las *ufc* introducidas y la señal de actividad de extensión de la ADN polimerasa como se indica por un valor  $R^2$  de 0,999 (Figura 4B). El recuento de colonias en las placas y la qPCR genética específica de *E. coli* (gsPCR) se ejecutaron en paralelo, confirmando tanto el nivel de entrada de *ufc* por reacción y la capacidad para controlar el ADN genómico intacto, de exactamente los propios lisados. La actividad de extensión de la ADN polimerasa de los lisados de *S. aureus* se detectó hasta un nivel de introducción similar (Figura 4C). La detección de

*S. aureus* se representó hasta 10 *ufc* de bacterias introducidas y también mostraba una correlación lineal fuerte entre las *ufc* introducidas y la señal de actividad de extensión de la ADN polimerasa ( $R^2 = 0,999$ , Figura 4D). El recuento de colonias en las placas y la *gsPCR* se llevaron a cabo en paralelo para confirmar la cantidad de *S. aureus* presente en cada tubo de lisis por perlas, así como la presencia de ADN genómico analizable directamente.

5 Posteriormente, los inventores ensayaron la capacidad del ensayo DPE-PCR para medir la actividad de ADN polimerasa a partir de diecisiete microorganismos adicionales clínicamente relevantes. Como se muestra en la Tabla 1, los inventores fueron capaces de detectar la actividad de ADN polimerasa de los diecisiete organismos adicionales que incluyen seis bacterias gram negativas, seis bacterias gram positivas y cinco especies de *Candida*. La detección de los diecisiete microbios adicionales presentaba una correlación lineal fuertemente positiva con las *ufc* introducidas con límites inferiores de detección impresionantes. Hasta ahora, y sin fallos, los inventores han ensayado similarmente y detectado un total de 31 especies microbianas diferentes (datos no mostrados). Los rangos dinámicos lineales superiores ya se habían caracterizado completamente. Más resultados que contienen los resultados paralelos de los datos de colocación en placas y DPE-PCR de cada uno de los 17 microbios adicionales se presentan en la Figura 8. En conjunto, estos datos apoyan el concepto de que la realización de DPE-PCR de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención tiene el potencial de ser útil como un "pan"-ensayo universal para la detección sensible de cualquier microbio en un ambiente normalmente estéril.

Como se muestra en la Figura 2D, la sustitución de dCTP por ddCTP en la mezcla de reacción representa una potente herramienta para bloquear la detección de actividad de extensión de la ADN polimerasa en el ensayo de los inventores. Para demostrar que la señal derivada de los vertidos bacterianos era dependiente de su actividad de extensión de la ADN polimerasa, y no de otras actividades enzimáticas endógenas bacterianas presentes en los lisados, los inventores llevaron a cabo un experimento para comparar las señales DPE-PCR obtenidas de *E. coli* y *S. aureus* utilizando una mezcla de reacción de ADN polimerasa convencional que contenía (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) frente a una mezcla de reacción que contenía (dATP, dTTP, dGTP, ddCTP). Como se muestra en la Figura 5A, cuando se compara con la mezcla de reacción convencional, la sustitución de ddCTP bloqueaba la generación de señal derivada del vertido de *ufc* de *E. coli* (Figura 5A). Se llevó a cabo posteriormente un experimento de rescate con dCTP comparando la actividad de extensión de la ADN polimerasa de las bacterias lisadas en una mezcla de reacción que contenía un 100% de ddCTP (50  $\mu\text{M}$ ), con las que contenían 50  $\mu\text{M}$  de ddCTP con cantidades añadidas crecientes de dCTP (véase materiales y métodos para la descripción detallada de experimentos de rescate). La Figura 5B demuestra el efecto de rescate que tienen cantidades crecientes de dCTP en la actividad de extensión de la ADN polimerasa cuantificable derivada de lisados de *E. coli*. Además, para medir la actividad de extensión de la ADN polimerasa microbiana, se ejecutó una *gsPCR* en paralelo para verificar que estaban presentes cantidades de *E. coli* equivalentes en cada uno de los lisados ensayados. Se presenta una comparación gráfica de la actividad de ADN polimerasa frente a la presencia de ADN genómico en la Figura 5C. Los experimentos de terminación (mediante ddCTP) y rescate con dCTP se repitieron posteriormente con *S. aureus* y se obtuvieron resultados similares (Figura 5 D-F). Las Figuras que contienen los datos de DPE-PCR y *gsPCR* de *E. coli* y *S. aureus* se encuentran en las Figuras 6 y 7. Se proporcionan los valores de la *qPCR* del control interno para demostrar que con niveles bajos de ddCTP al llevarlos cabo en la *qPCR* no son inhibidores, y por lo tanto no son responsables de la señal de actividad de ADN polimerasa (Figuras 6A y 7A). En conjunto, los datos presentados en la Figura 5 apoyan fuertemente la reivindicación de que el ensayo DPE-PCR detecta específicamente la actividad de extensión de la ADN polimerasa y la señal no se deriva de la modificación del sustrato mediante actividades enzimáticas distintas de la ADN polimerasa.

#### Medición de la actividad de extensión de la ADN polimerasa como indicador de la viabilidad bacteriana

45 Los métodos tradicionales para determinar la viabilidad bacteriana dependen del crecimiento y visualización de un microbio en particular en un medio sólido (21). Aunque el crecimiento bacteriano y la visualización es la referencia de oro en la industria actualmente, los métodos de determinación de viabilidad de *ufc* tradicionales no son deseables debido a la cantidad de tiempo necesario para la formación de *ufc*. Además, la capacidad para crecer en medios sólidos o en un cultivo líquido puede variar drásticamente de un microbio a otro, limitando así potencialmente la detección de ciertos organismos fastidiosos (22). Debido a las limitaciones de los métodos tradicionales mencionados anteriormente, existe una necesidad creciente en una amplia variedad de campos farmacéuticos (23), ambientales, de procesamiento de alimentos y ensayos clínicos para la evaluación rápida de la viabilidad microbiana. En consecuencia, se han desarrollado numerosos métodos moleculares en un esfuerzo para evaluar rápidamente el estado de viabilidad microbiana en una determinada matriz (24). A pesar de ser rápidos y sensibles, los métodos moleculares que detectan la presencia de un ácido nucleico a menudo no consiguen la representación de una medición precisa de la viabilidad celular. Por ejemplo, la amplificación de ADN o ARN endógenos es un indicador insuficiente de la viabilidad bacteriana, debido a la persistencia de ácido nucleico tras la muerte celular (25, 26). Los inventores pretendían determinar la fiabilidad del uso de la actividad de extensión de la ADN polimerasa como indicador de la viabilidad bacteriana. En este punto, se diseñó un experimento para comparar la detección de actividad de extensión de la ADN polimerasa y detección de ADN genómico mediado por PCR como indicadores de la viabilidad bacteriana después de distintas cantidades de tratamiento por temperatura. Para empezar, se trataron suspensiones de *E. coli* a temperaturas crecientes durante un periodo de tiempo fijo. Tras el tratamiento con calor, las bacterias se ensayaron posteriormente en cuanto a la presencia de actividad de extensión de la ADN polimerasa y ADN genómico. Las materias primas bacterianas tratadas por calor y no tratadas por calor se colocaron en placas también en paralelo para controlar la viabilidad bacteriana por medio de la presencia de *ufc* visibles. La Figura 6A

representa los niveles de actividad de extensión de la ADN polimerasa de *E. coli* que se midió después de las cantidades indicadas de tratamiento por calor. Excepcionalmente, se observó una caída significativa en la actividad de extensión de la ADN polimerasa de *E. coli* tras la incubación de las suspensiones bacterianas entre 45 °C y 65 °C (Figura 6A). Por el contrario, la señal de gsPCR obtenida de los mismos lisados permanecía relativamente constante a todas las temperaturas y se compara gráficamente con la actividad de ADN polimerasa en la Figura 6B. Los resultados de la colocación en placas que se presentan debajo del gráfico demuestran adicionalmente que los niveles crecientes de tratamiento por calor son suficientes para evitar la formación de *ufc* y son paralelos a una pérdida drástica de actividad de ADN polimerasa; sin embargo, las células muestras siguen contribuyendo a niveles de ADN genómico muy cercanos a sus niveles originales de introducción confirmando que la gsPCR es un mal indicador de la presencia de células viables (Figura 6B). En la Figura 6C, los gráficos de barras resaltan adicionalmente las capacidades relativas de DPE-PCR y gsPCR para controlar la desaparición de *ufc* en respuesta a cantidades letales de tratamiento por calor. Posteriormente, los inventores quisieron ensayar si la medición de la actividad de extensión de la ADN polimerasa se podía utilizar para indicar el estado de viabilidad de un organismo gram positivo también. Los experimentos en *E. coli* anteriores se repitieron con *S. aureus* en las mismas condiciones.

La Figura 7A-C muestra resultados similares obtenidos de los experimentos del tratamiento por calor repetido con *S. aureus*. Colectivamente, la fuerte concordancia entre la presencia de *ufc* y la actividad de extensión de la ADN polimerasa que se muestra en las Figuras 4, 6, 7 y la Tabla 1 o la Figura 8, demuestran que el DPE-PCR llevado a cabo de acuerdo con la presente invención tiene el potencial de ser utilizado como un indicador general de la viabilidad celular, y puede adicionalmente presentar la posibilidad de medir la actividad de extensión de la ADN polimerasa de microbios expuestos a distintos agentes clínica o farmacéuticamente relevantes (bacteriostáticos o bactericidas) con el fin de reducir la proliferación o viabilidad celular.

En resumen, de acuerdo con la presente invención se ha desarrollado un nuevo ensayo DPE-PCR altamente sensible, cuantitativo y rápido. Además de la detección cuantitativa de niveles extremadamente bajos de enzima purificada, los inventores han demostrado la capacidad de DPE-PCR para medir de manera reproducible la actividad de extensión de la ADN polimerasa de menos de 10 *ufc* de bacterias por medio de acoplamiento con lisis por perlas. Los inventores han demostrado también el potencial de DPE-PCR para detectar universalmente microbios ensayando un panel de microorganismos compuesto por siete bacterias gram negativas, siete bacterias gram positivas y cinco especies de *Candida*. Además, la prueba preliminar de que el ensayo DPE-PCR se puede utilizar para evaluar la viabilidad bacteriana se proporcionó por medio de la correlación fuertemente reproducible entre la actividad de extensión de la ADN polimerasa y la proliferación como indica la presencia de *ufc*. Considerando los datos desvelados en el presente documento, se cree actualmente que los nuevos métodos y técnicas de la invención tal como el ensayo DPE-PCR preferido como se ha desvelado en el presente documento, tiene el potencial de convertirse en una herramienta útil para un amplio intervalo de aplicaciones de ensayo en el campo farmacéutico, ambiental, alimentario y clínico.

La descripción detallada anterior se ha dado solo para aclarar la comprensión y no se deberían deducir limitaciones innecesarias de la misma las modificaciones que serán obvias para los expertos en la técnica. No es una admisión de que cualquiera de la información proporcionada en el presente documento es técnica anterior o relevante para las invenciones reivindicadas presentes, o que cualquier publicación referida específica o implícitamente sea técnica antecedente.

A menos de que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en el presente documento tienen el mismo significado que es entendido comúnmente por un experto habituado en la técnica a la que pertenece la presente invención.

Como la invención se ha descrito en conexión con realizaciones específicas de la misma, se entenderá que son posibles modificaciones adicionales y que la presente solicitud tiene la intención de cubrir cualquiera de las variaciones, usos, o adaptaciones de la invención que sigan, en general, los principios de la invención y que incluyen dichos alejamientos de la presente divulgación que se produzcan en la práctica conocida o a medida en la técnica a la que pertenece la invención y se pueden aplicar a las características esenciales expuestas anteriormente en el presente documento, siempre que dichas variaciones, usos o adaptaciones se encuentren en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

## REFERENCIAS

1. Rothwell, P.J y Waksman, G. (2005) Structure and mechanism of DNA polymerases. *Advan. Prot. Chem.* 71 401-440.
2. Joyce, CM. y Steitz, T.A. (1994) Function and structure relationships in DNA polymerases. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 777-822.
3. Mar Albà, M. (2001) Replicative DNA polymerases. *Genome Biol.* 2, 3002.1-3002.4.
4. Lehman, I., Bessman, M., Simms, E. y Kornberg, A. (1958) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. I. preparation of substrates and partial purification of an enzyme from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 233, 163-170.
5. Hamilton, S.C., Farchaus, J.W., y Davis, M.C. (2001) DNA polymerases as engines for biotechnology.

BioTechniques 31, 370-383.

6. Tarantino, P.M., Zhi, C., Wright, G.E., y Brown, N.C. (1999) Inhibitors of DNA polymerase III as novel antimicrobial agents and gram-positive bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1982-1987.
7. Kuhl, A., Svenstrup, N., Ladel, C., Otteneder, M., Binas, A., Schiffer, G., Brands, M., Lampe, T., Ziegelbauer, K., RübSamen-Waigmann, H., Haebich, D. y Ehlert, K. (2005) Biological characterization of novel inhibitors of the gram-positive DNA polymerase III enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 987-995.
8. Lange, S.S., Takata, K. y Wood, R.D. (2011) DNA polymerases and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 11, 96-110.
9. Martin, S.A., McCabe, N., Mullarkey, M., Cummins, R., Burgess, D.J., Nakabeppu, Y., Oka, S., Kay, E., Lord, C.J. y Ashworth, A. (2010) DNA polymerases as potential therapeutic targets for cancers deficient in the DNA mismatch repair proteins MSH2 or MLH1. *Cancer Cell* 17, 235-248.
10. Naviaux, R.K., Markusic, D., Barshop, B.A., Nyhan, W.L. y Haas, R.H. (1999) Sensitive assay for mitochondrial DNA polymerase  $\gamma$ . *Clin. Chem.* 45, 1725-1733.
11. Richardson, C.C., Schildkraut, C.L., Vasken Aposhian, H. y Kornberg, A. (1964) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* 239, 222-232.
12. Griep, M.A. (1995) Fluorescence recovery assay: A continuous assay for processive DNA polymerase applied specifically to DNA polymerase III holoenzyme. *Anal. Biochem.* 232, 180-189.
13. Seville, M., West A.B., Cull, M.G. y McHenry, C.S. (1996) Fluorometric assay for DNA polymerases and reverse transcriptase. *Biotechniques* 21, 664, 668, 670, 672.
14. Tveit, H. y Kristensen, T. (2001) Fluorescence-based DNA polymerase assay. *Anal. Biochem.* 289, 96-98.
15. Yu, Liming, Hu, G. y Howells, L. (2002) Fluorescence-based, high-throughput DNA polymerase assay. *Biotechniques* 33, 938-941.
16. Ma, C., Tang, Z., Wang, K., Tan, W., Li, J., Li, W., Li, Z., Yang, X., Li, H. y Liu, L. (2006) Realtime monitoring of DNA polymerase activity using molecular beacon. *Anal. Biochem.* 353, 141-143.
17. Luo, X. y Hsing I. (2011) Immobilization-free electrochemical DNA polymerase assay. *Electroanalysis* 23, 923-926.
18. Banin, S., Wilson, S. y Stanley C. (2007) The LiMA technology: measurement of ATP on a nucleic acid testing platform. *Clin Chem* 53, 2034-2036.
19. Toji, L. y Cohen, S.S. (1969) The enzymatic termination of polydeoxynucleotides by 2'3'-dideoxyadonsine triphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63, 871-877.
20. Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
21. Davey, H.M. (2011) Life, death, and in-between: Meanings and methods in microbiology. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5571-5576.
22. Rappe, M.S. y Giovannoni, S.J. (2003) The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 369-394.
23. Riley, B. (2004) Rapid microbiology methods in the pharmaceutical industry. *Amer. Pharm. Rev.* 1-4.
24. Keer, J.T. y Birch, L. (2003) Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *J. Microbio. Meth.* 53, 175-183.
25. Masters, C., Shallcross, J. y Mackey, B. (1994) Effect of stress treatments on the detection of *Listeria monocytogenes* and enterotoxigenic *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 73-79.
26. Sheridan, G.E.C., Masters, C.I., Shallcross, J.A. y Mackey, B.M. (1998) Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1313-1318.

## REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para llevar a cabo un ensayo diagnóstico para la detección de la presencia o cantidad de un microorganismo en una muestra que contiene ADN polimerasa activa mediante la medición de la actividad de extensión de la ADN polimerasa, cuyo ensayo comprende las etapas de incubar la ADN polimerasa de la muestra con un sustrato seleccionado adecuado, y llevar a cabo el ciclado y la detección por PCR mediante el uso de una sonda de ácido nucleico seleccionada adecuada, para detectar de esta manera la actividad de extensión de la ADN polimerasa endógena de la muestra como una indicación de la presencia o cantidad de dicho microorganismo, donde dicho sustrato con el que dicha ADN polimerasa se incuba consiste en dos oligonucleótidos pre-hibridados donde uno de dichos nucleótidos contiene nucleósidos de desoxiuridina, y antes de dicho ciclado de PCR dicha ADN polimerasa extiende solo el extremo 3' del oligonucleótido que no contiene nucleósidos de desoxiuridina y posteriormente se añade uracil ADN glucosilasa para degradar el oligonucleótido que contiene nucleósidos de desoxiuridina de manera que solamente el producto de cadena sencilla derivado de la extensión mediada por polimerasa pasa al ciclado de PCR.
2. El método de la reivindicación 1, donde la medición de la actividad de extensión de la ADN polimerasa es un indicador de viabilidad bacteriana en dicha muestra.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, donde la muestra es suero.
4. El método de la reivindicación 1 o 2, donde la muestra es plasma.
5. El método de la reivindicación 1 o 2, donde la muestra se selecciona de entre el grupo que consiste en enzimas purificadas, lisados microbianos y lisados microbianos en bruto.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el ensayo detecta específicamente la actividad de extensión de la ADN polimerasa y la señal no se deriva de la modificación de dicho sustrato mediante actividades enzimáticas distintas de la ADN polimerasa.
7. El método de la reivindicación 5, donde antes de la realización del ensayo, el método comprende la etapa adicional de añadir un lisado microbiano o un lisado microbiano en bruto que se sabe que contiene, o es sospechoso de contener, un microorganismo a un tubo de lisis de molido por perlas, destruir las células de microorganismo y transferir las células destruidas a una etapa de incubación del ensayo.
8. El método de la reivindicación 6, que comprende además la etapa de añadir un agente bloqueante a la mezcla de muestra en un punto adecuado de la realización del método para asegurar que el ensayo detecta específicamente la activación de extensión de la ADN polimerasa y la señal no se deriva de la modificación de dicho sustrato mediante actividades enzimáticas distintas de la ADN polimerasa.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 6 a 8, donde la muestra es una muestra biológica.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 6 a 8, donde la muestra es una muestra ambiental.

Figura 1

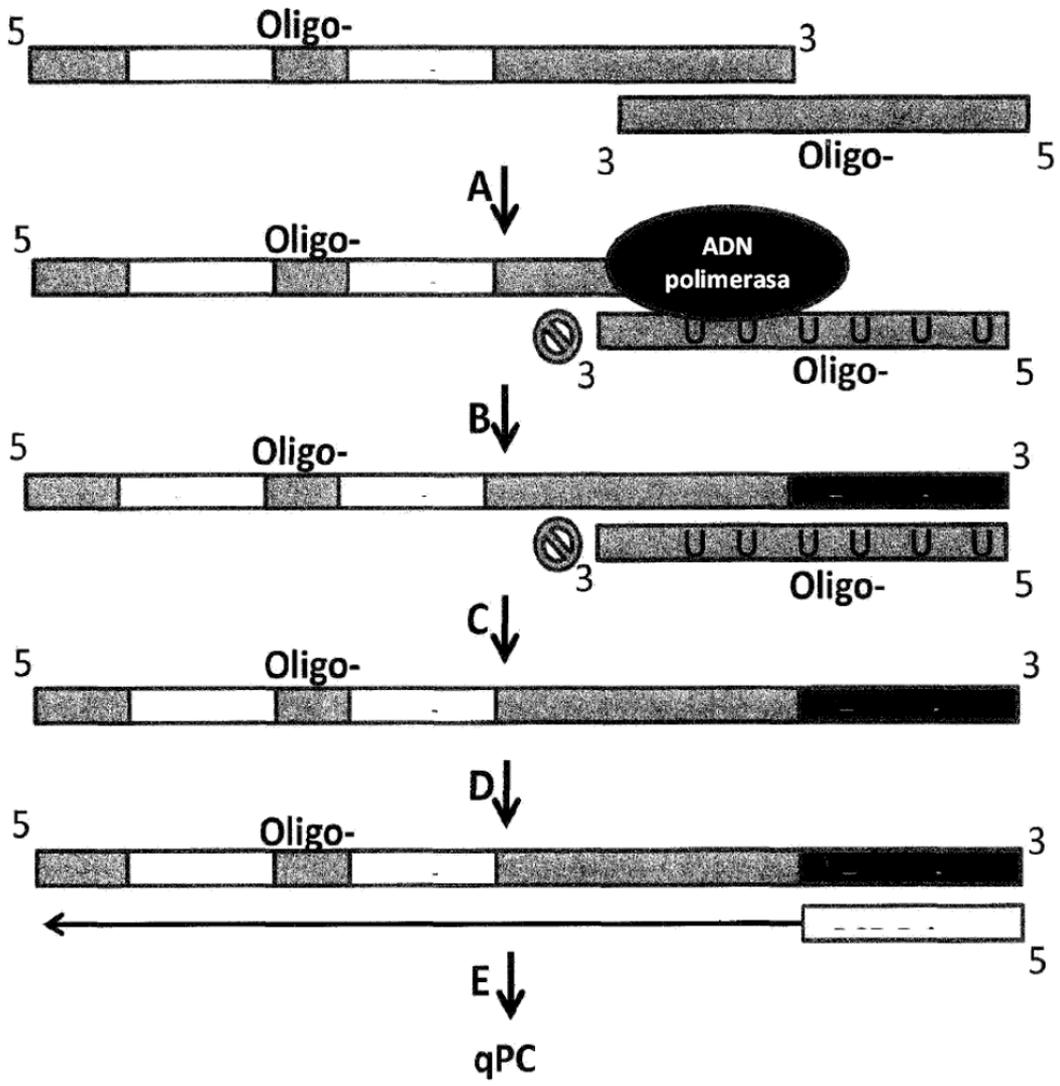
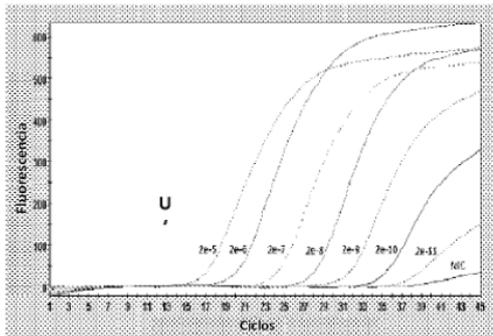
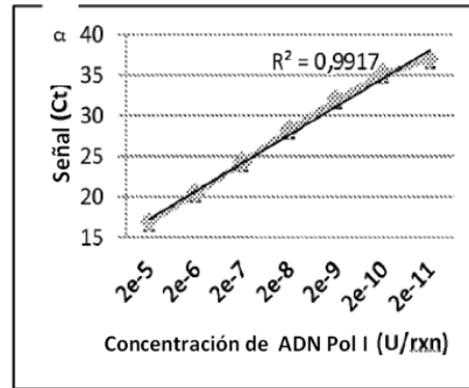


Figura 2

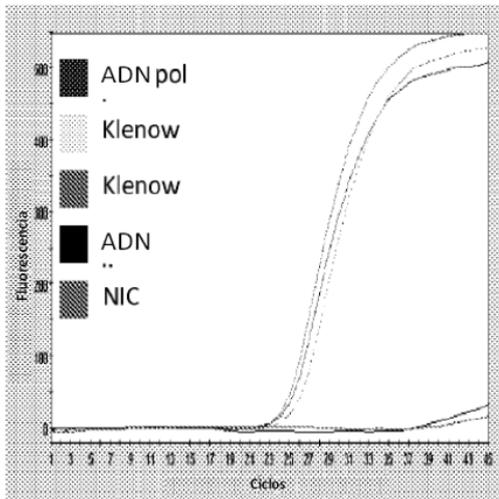
A



B



C



D

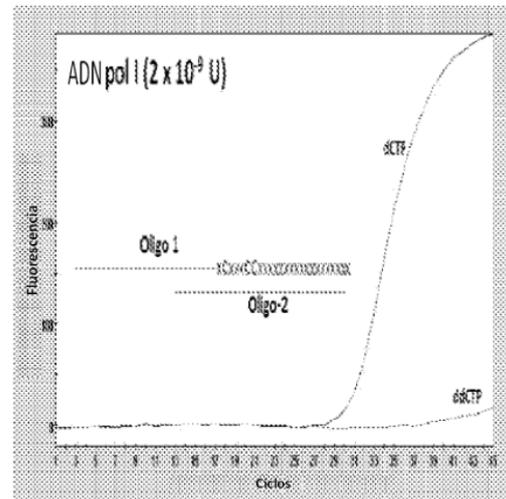


Figura 3

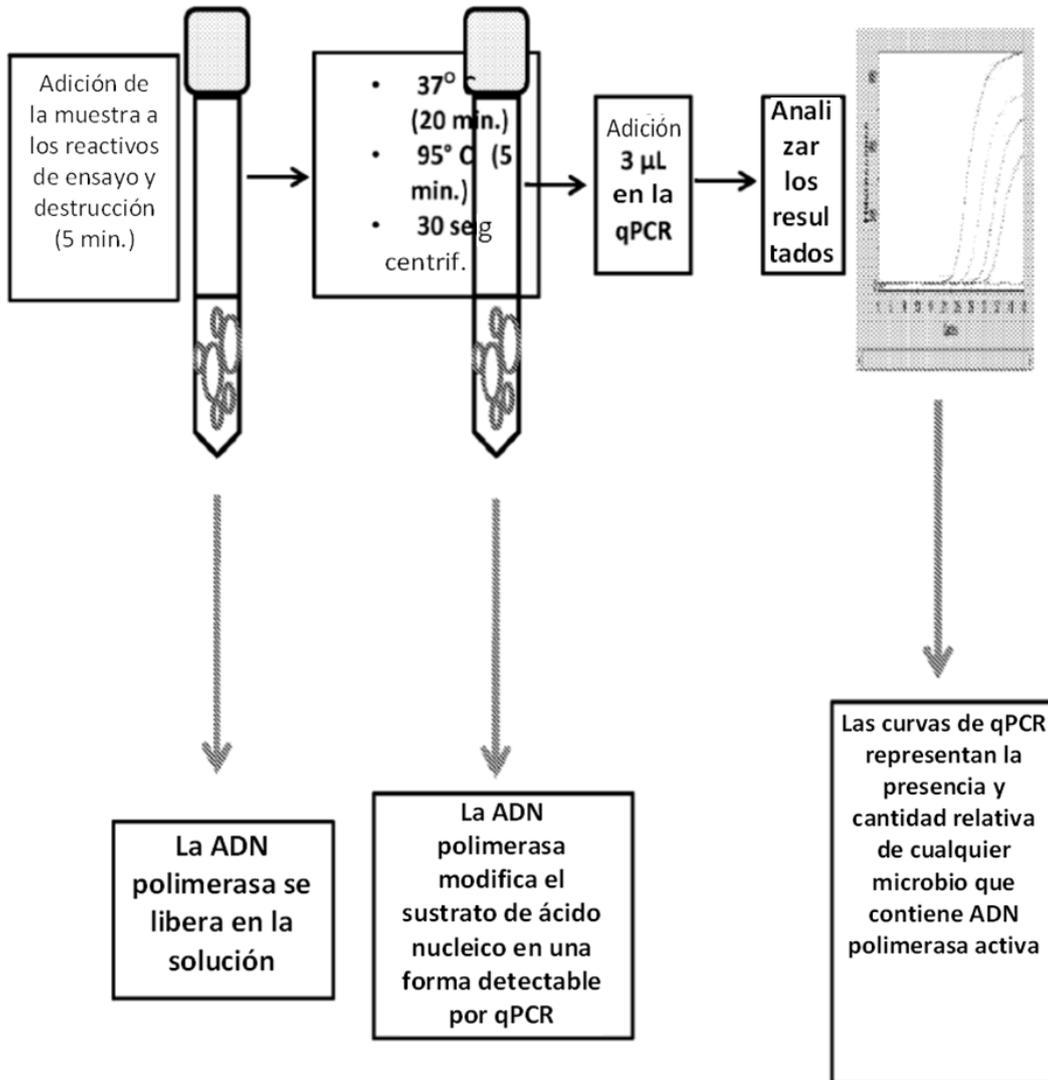
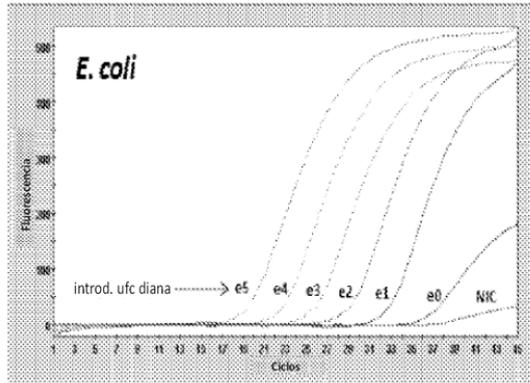
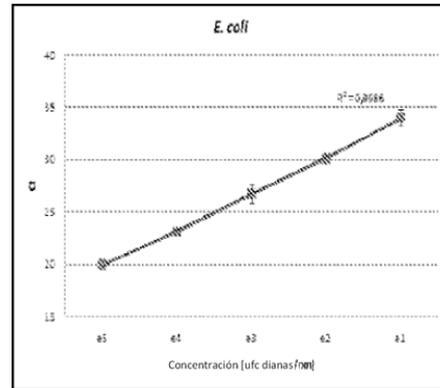


Figura 4

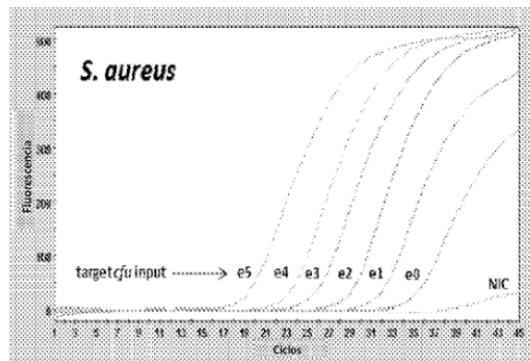
**A**



**B**



**C**



**D**

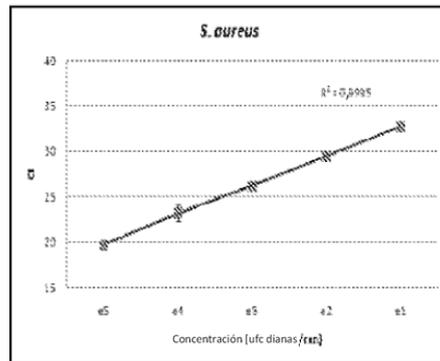


Figura 5

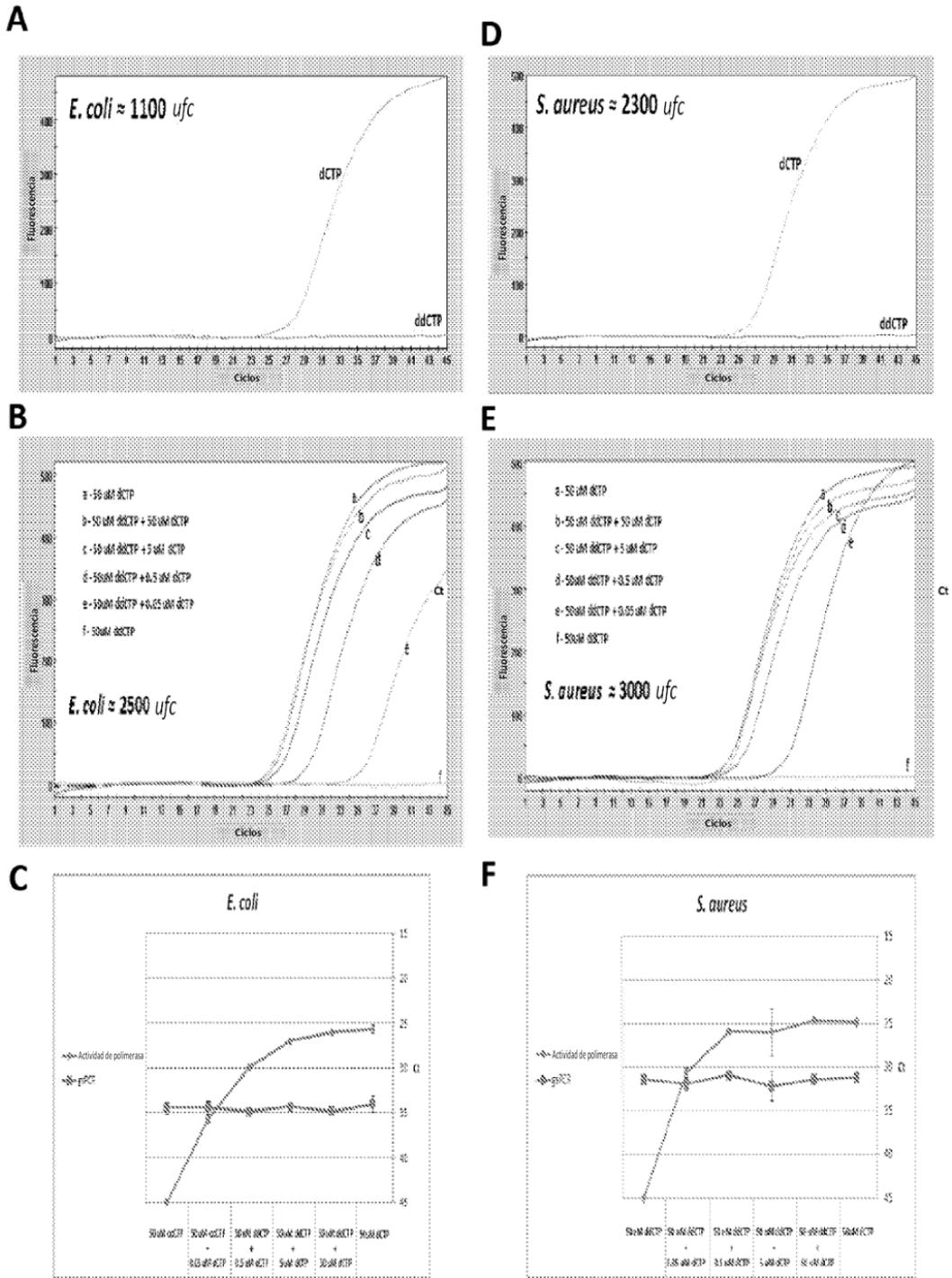


Figura 6

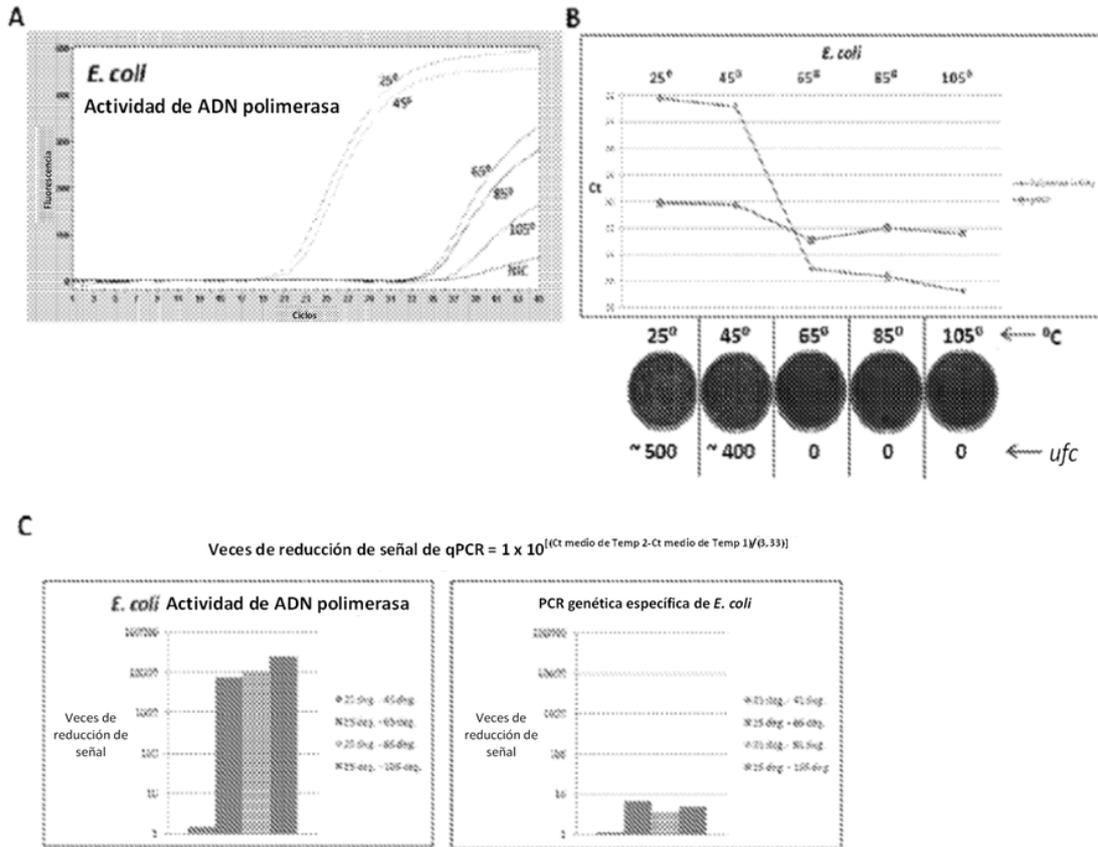


Figura 7

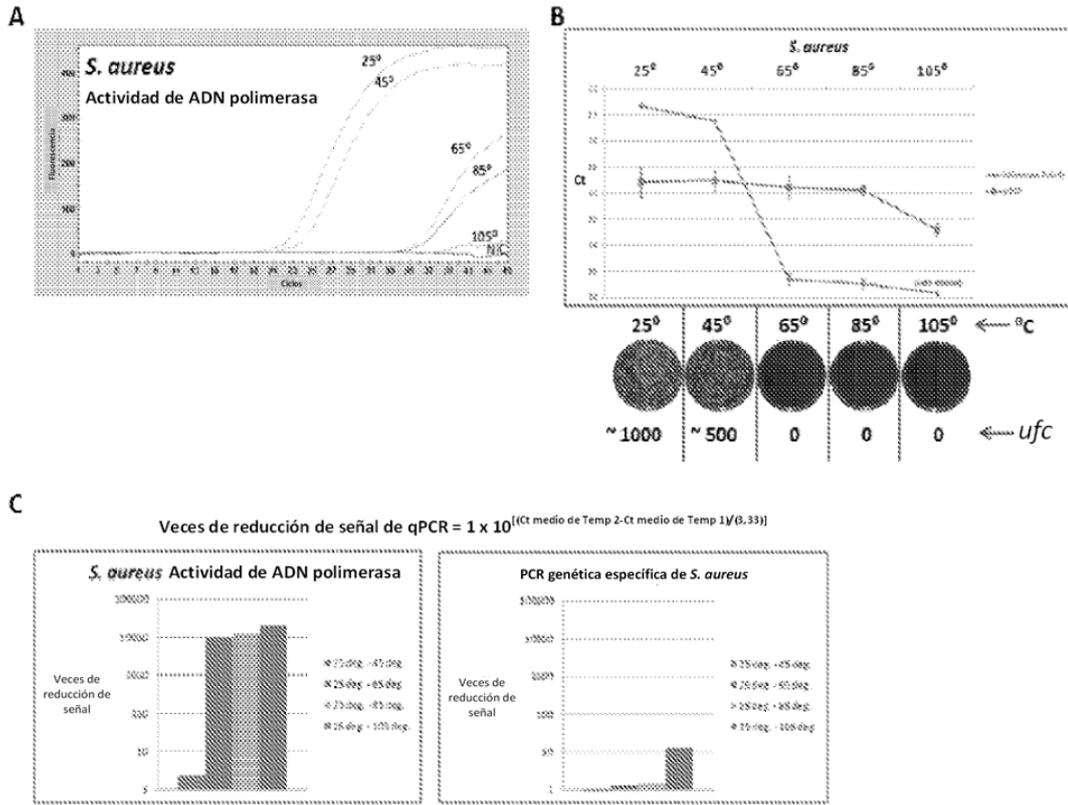


Figura 8

Tabla 1

<b>Panel bacteriano</b>	Límite inferior detectado por DPE-PCR	$R^2(1e4-1e1ufc)$
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	< 10	0,9957
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	< 10	0,9860
<i>Enterobacter cloacae</i>	< 10	0,9995
<i>Acinetobacter baumannii</i>	< 10	0,9980
<i>Haemophilus influenzae</i>	< 10	0,9996
<i>Serratia marcescens</i>	< 10	0,9956
<i>Enterococcus faecalis</i>	< 10	0,9963
<i>Enterococcus faecium</i>	< 10	0,9899
<i>Streptococcus pyogenes</i>	< 10	0,9945
<i>Streptococcus agalactiae</i>	< 10	0,9969
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	< 10	0,9999
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	< 10	0,9990

<b>Panel de <i>Candida</i></b>	Límite inferior detectado por DPE-PCR	$R^2(1e5-1e3 ufc)$
<i>Candida albicans</i>	≈ 20	0,9945
<i>Candida tropicalis</i>	≈ 20	0,9969
<i>Candida glabrata</i>	≈ 40	0,9111
<i>Candida parapsilosis</i>	≈ 20	0,9953
<i>Candida krusei</i>	≈ 15	0,9868