

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 964**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.07.2015 PCT/GB2015/052006**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.01.2016 WO16005768**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2015 E 15738453 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 3167077**

54 Título: **Método y kit de detección de la ausencia de microorganismos**

30 Prioridad:

10.07.2014 GB 201412316

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

06.02.2019

73 Titular/es:

**MOMENTUM BIOSCIENCE LIMITED (100.0%)
Unit 19 Willowbrook Technology Park, Llandogo
Road
St. Mellons, Cardiff, Wales CF3 0EF, GB**

72 Inventor/es:

**CROW, MATTHEW ALUN;
BENNETT, HELEN VICTORIA;
LOCKHART, DANIEL STEPHEN y
MULLEN, WILLIAM HENRY**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 698 964 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

Método y kit de detección de la ausencia de microorganismos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere de forma general al campo de la detección de la ausencia o presencia de microorganismos en una muestra. Los métodos se basan normalmente en la medición de la actividad de enzima microbiana (si la hay) presente en una muestra y puede relacionarse con métodos que pueden realizarse aplicando técnicas de amplificación de ácidos nucleicos como reacción en cadena de la polimerasa. Los métodos de la invención permiten por tanto determinar la ausencia y presencia de patógenos microbianos en muestras, como sangre sin purificar, cultivos de sangre y otros fluidos corporales. La presente invención se refiere asimismo a reactivos para su uso en dichos métodos y los kits de ensayo que comprenden dichos reactivos útiles para llevar a cabo los métodos.

15 Antecedentes de la invención

La medición de la presencia y de los niveles de determinadas moléculas que están asociadas con la viabilidad celular es importante en una serie de contextos. Por ejemplo, la medición de los niveles de ATP es útil en células de mamífero para fines de análisis de crecimiento y toxicología. Es posible utilizar enfoques de cultivo para detectar un reducido número de bacterias, pero dichas técnicas requieren varios días para completarse, especialmente, cuando se intenta detectar un reducido número de bacterias y también cuando se detectan microorganismos de crecimiento lento.

Se ha propuesto también la detección de adenilato quinasa como indicador de la viabilidad (Squirrell DJ, Murphy MJ, Leslie RL, Green JCD: A comparison of ATP and adenylate kinase as bacterial cell markers: correlation with agar plate counts). En la patente internacional WO96/002665 se describe un método para determinar la presencia y/o cantidad de microorganismos y/o su material intracelular presente en una muestra caracterizado por que se estima la cantidad de adenilato quinasa en la muestra mezclándola con adenosina difosfato (ADP), determinando la cantidad de adenosina trifosfato (ATP) producida por la muestra a partir de dicha ADP y relacionando la cantidad de la ATP así producida con la presencia/o la cantidad de adenilato quinasa y con los microorganismos y/o su material intracelular, donde la conversión de ADP en ATP se lleva a cabo en presencia de iones de magnesio a una concentración molar suficiente como para permitir la conversión máxima de ADP en ATP.

En la patente internacional WO2009/007719, se divulgan ligasas, en particular ligasas dependientes de NAD⁻, como indicadores útiles de la presencia de un microorganismo (viable) en una muestra. Las ligasas son enzimas que catalizan la ligación de moléculas de ácido nucleico. La reacción de ligación requiere ATP o NAD⁺ como co-factor, dependiendo de la ligasa en cuestión. En la presente divulgación, se aprovecha el uso de la actividad ligasa dependiente de NAD como indicador de la presencia de un microorganismo (viable) en una muestra.

En la patente internacional WO2011/130584 se describe un método para la detección de un microorganismo viable basado en la detección de ADN o ARN polimerasas en el que se pone en contacto una muestra con un sustrato de ácido nucleico que actúa como sustrato para la polimerasa microbiana, se incuba en condiciones adecuadas para la actividad de polimerasa a partir de microorganismos intactos y se determina cualquier producto de ácido nucleico resultante utilizando una técnica de amplificación de ácido nucleico como pueda ser reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa. Dichos ensayos se engloban bajo el término "ensayos ETGA", según sus siglas en inglés ETGA corresponde a Generación y Amplificación de Matriz Enzimática. Un problema de los ensayos ETGA para microorganismos viables en muestras en bruto es la presencia de actividad de polimerasa contaminante fuera de los microorganismos que se producen desde las células hospedadoras (p.ej., humanas) y microorganismos muertos. El ensayo ETGA no tiene capacidad para distinguir la actividad de polimerasa del microorganismo de la del hospedador o los microorganismos muertos.

La solicitud co-pendiente del autor de la solicitud, la patente internacional WO2010/119270 describe un método para eliminar la actividad de enzima (en este caso, ADN ligasa) fuera de microorganismos intactos y éste se puede utilizar también para eliminar la contaminación de la actividad de polimerasa de ácidos nucleicos.

Descripción de la invención

Sin embargo, las condiciones utilizadas en la patente internacional WO 2010/119270 para eliminar la actividad de contaminación incluyen la incubación a un pH alto (en torno a un pH 11) durante 20 minutos. Los autores de la invención han observado que estas condiciones, aunque útiles, son perjudiciales para determinadas cepas bacterianas, como ciertas cepas clínicas de *H. influenzae*.

Asimismo se ha descubierto que el tratamiento con un pH alto no elimina en todos los casos toda la actividad de nucleasa extra-microbiana en muestras como un cultivo de sangre y que dicha actividad de nucleasa puede tener un efecto perjudicial para el ensayo al degradar el sustrato de ácidos nucleicos utilizado en el ensayo. Los ensayos de

amplificación de ácido nucleico pueden incluir una sonda de control interno para llevar un seguimiento del correcto funcionamiento de la reacción de amplificación (véase por ejemplo, la patente internacional WO2013/103744 en la que esto se aplica a un ensayo de ADN polimerasa similar al de la patente internacional WO2011/130584). Sin embargo, este control interno se añade como parte de la mezcla de reactivos de amplificación de ácidos nucleicos y no detecta la actividad de nucleasa anterior. Un problema adicional asociado al método que se describe en la patente internacional WO2011/130584 es una relativa falta de sensibilidad para detectar levadura como *C. albicans* y *C. glabrata*.

En un análisis rápido, la técnica se ha centrado en la detección de la presencia de microorganismos más que en determinar su ausencia. Con la expresión "determinar su ausencia", los autores de la solicitud no quieren decir que la muestra sea necesariamente estéril sino que puede tener una carga de organismos que es suficientemente baja como para ser negativa para fines prácticos. Por ejemplo, por lo general se toman cultivos de sangre de pacientes en los que se sospechan infecciones en el torrente sanguíneo que pueden estar asociadas con septicemia, una afección que puede ser rápidamente fatal si no se trata. Dentro de la rutina de los laboratorios de microbiología clínica se incuban dichas muestras durante al menos cinco días antes de notificar un resultado negativo, período durante el cual se mantiene a los pacientes a menudo con antibióticos de amplio espectro. Normalmente, hasta un 90 % de los pacientes son negativos y, por tanto, un gran número de pacientes siguen durante 5 días con una terapia de antibióticos que no es necesaria para su afección. Un método más rápido para determinar un resultado negativo (en relación con un cultivo de sangre de cinco días) sería de significativo valor para reducir los costes de una terapia de antibióticos innecesaria y proporcionar beneficios para la salud por lo que respecta a reducir el riesgo de infección por *C. difficile*, toxicidad antibiótica y reducción del índice de un aumento de resistencia antimicrobiana.

Los autores de la invención han diseñado y analizado un abanico de mejoras para los ensayos ETGA existentes con vistas a optimizar la determinación de la ausencia o presencia de un microorganismo en una muestra. El fundamento de la invención es por tanto métodos de detección de la ausencia o presencia de microorganismos en una muestra que comprende:

- (a) contacto de la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para la actividad de modificación de ácido nucleico del microorganismo en la muestra
- (b) incubación de la muestra que se ha puesto en contacto de este modo en condiciones adecuadas para la actividad de modificación de ácido nucleico; y
- (c) determinación específica de la ausencia o presencia de una molécula de ácido nucleico modificada que es el resultado de la acción de la actividad de modificación de ácido nucleico sobre la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la ausencia o presencia del microorganismo. En el presente documento se presentan varios desarrollos de este formato de ensayo básico.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un método de detección de la ausencia o presencia de un microorganismo en una muestra que comprende:

- (a) contacto de la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para la actividad de modificación de ácido nucleico del microorganismo en la muestra,
- (b) incubación de la muestra que se ha puesto en contacto de este modo en condiciones adecuadas para la actividad de modificación de ácido nucleico; y
- (c) determinación específica de la ausencia o presencia de una molécula de ácido nucleico modificada que es el resultado de la acción de la actividad de modificación de ácido nucleico en la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la ausencia o presencia del microorganismo, caracterizado por que la molécula de ácido nucleico se modifica para protegerla de la actividad de nucleasa.

En el contexto de la presente invención, se pre-modifica la molécula de ácido nucleico para protegerla de actividad de nucleasa, es decir, se modifica la molécula de ácido nucleico para protegerla de la actividad de nucleasa antes de ponerla en contacto con la muestra en etapa (a).

Los autores de la invención han determinado que la protección de la molécula de ácido nucleico sustrato de la actividad de nucleasa es ventajosa en el contexto de los ensayos de la invención. Más específicamente, tal como se muestra en el presente documento, la incorporación de moléculas de ácido nucleico protegidas en los métodos de la invención mejora la sensibilidad de detección. Puede emplearse cualquier medio adecuado para proteger la molécula de ácido nucleico de la actividad de nucleasa. Entre los ejemplos no exhaustivos se incluyen la incorporación de metilación en la molécula de ácido nucleico, modificación en el extremo, como protección de los extremos 3' y/o 5' e incorporación de nucleótidos sintéticos. En realizaciones específicas, los nucleótidos sintéticos comprenden nucleótidos fosforotioato y/o nucleótidos de ácidos nucleicos cerrados. Preferentemente, los nucleótidos sintéticos son nucleótidos fosforotioato. En ciertas realizaciones, los nucleótidos sintéticos reemplazan al menos uno de todos los nucleótidos de la molécula de ácido nucleico.

Los autores de la invención han determinado además que, en comparación con los ensayos ETGA de la técnica anterior, aumentar la concentración de la molécula de ácido nucleico en la reacción puede conducir a mejores resultados. Por tanto, en otro aspecto más, la invención proporciona un método de detección de la ausencia o

presencia de un microorganismo en una muestra que comprende:

- (a) contacto de la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para la actividad de modificación de ácido nucleico del microorganismo en la muestra,
- (b) incubación de la muestra que se ha puesto en contacto de este modo en condiciones adecuadas para la actividad de modificación de ácido nucleico; y
- (c) determinación específica de la ausencia o presencia de una molécula de ácido nucleico modificada que es el resultado de la acción de la actividad de modificación de ácido nucleico en la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la ausencia o presencia del microorganismo, caracterizado por que se agrega la molécula de ácido nucleico a la muestra a una concentración de al menos 2 nM pero menos de 50 nM.

Anteriormente, en dichos ensayos, se ha venido utilizando el sustrato de ácido nucleico a una concentración de 1 nM. Los autores de la invención han determinado que aumentar dicha concentración a menos de 50 nM, como por ejemplo 2 nM, 5 nM, 7,5 nM o 10 nM tiene como resultado una mejor sensibilidad de detección. A 50 nM o por encima de ella, se pierde la mejor sensibilidad debido al aumento de falsos positivos que resultan del ensayo. La concentración, tal como se señala en el presente documento, es normalmente la concentración de la mezcla de lisis utilizada para lisar los microorganismos cuando están presentes en la muestra. Por lo tanto, la etapa (a) de poner en contacto la muestra con la molécula de ácido nucleico sustrato normalmente implica la adición del sustrato en una mezcla de lisis que lisa los microorganismos cuando están presentes en la muestra. En el presente documento se proporcionan otros detalles del reactivo/mezcla de lisis.

Los autores de la invención han determinado también además que aumentar la concentración de nucleótidos libres en la reacción sirve además para mejorar la sensibilidad del ensayo. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los métodos de la invención comprenden añadir a la muestra desoxirribonucleótido trifosfatos (dNTP) a una concentración de más de 50 μ M, como por ejemplo de 55 a 300 μ M o de 60 a 250 μ M o de 75 a 200 μ M en particular al menos 100 μ M. Los dNTP pueden añadirse en la etapa (a) y/o en la etapa (b) en algunas realizaciones. La concentración, tal como se señala en el presente documento, es normalmente la concentración en la mezcla de lisis utilizada para lisar los microorganismos cuando están presentes en la muestra. Por tanto, la etapa (a) de poner en contacto la muestra con la molécula de ácido nucleico sustrato implica normalmente la adición del sustrato en una mezcla de lisis que lisa los microorganismos cuando están presentes en la muestra, en la que la mezcla de lisis contiene los dNTP. En el presente documento se proporcionan otros detalles del reactivo/mezcla de lisis.

Tal como se ha explicado, los autores de la invención han descubierto que si bien las condiciones de pH alto adoptadas en la patente internacional WO2010/119270 para eliminar la actividad contaminante son útiles, dichas condiciones pueden ser perjudiciales para cepas bacterianas en particular, como ciertas cepas clínicas de *H. influenzae*. Por consiguiente, en otro aspecto más, la invención proporciona un método de detección de la ausencia o presencia de un microorganismo en una muestra, conteniendo la muestra una fuente que no es microorganismo de actividad de modificación de ácido nucleico que comprende:

- (a) tratamiento de la muestra en condiciones de pH alto durante no más de 8 minutos para inhibir la fuente que no es microorganismo de actividad de modificación de ácido nucleico (al mismo tiempo que no afecta a la actividad de modificación de ácido nucleico del microorganismo en la muestra),
- (b) contacto de la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para la actividad de modificación de ácido nucleico del microorganismo en la muestra,
- (c) incubación de la muestra que se ha puesto en contacto de este modo en condiciones adecuadas para la actividad de modificación de ácido nucleico; y
- (d) determinación específica de la ausencia o presencia de una molécula de ácido nucleico modificada que es el resultado de la acción de la actividad de modificación de ácido nucleico en la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la ausencia o presencia del microorganismo.

La duración de las condiciones de pH alto es de menos de 20 minutos y puede ser no más de 10, 9, 8, 7, 6 o 5 minutos y puede ser en torno a 5, 6, 7, 8, 9 o 10 minutos. En otras realizaciones más, el tratamiento se lleva a cabo durante entre en torno a 2 y 15 minutos, por ejemplo en torno a 5 minutos. Se entiende por "en torno a" más o menos 30 segundos.

Se puede añadir cualquier reactivo adecuado a la muestra para proporcionar condiciones de pH alto. En realizaciones en particular, las condiciones de pH alto comprenden poner en contacto la muestra con un álcali. En realizaciones en particular, se utilizan NaOH o Na₂CO₃. En realizaciones específicas, la concentración de NaOH o Na₂CO₃ es en torno a 5mM o mayor.

Las condiciones de pH alto inhiben normalmente la actividad de enzimas que modifican ácido nucleico incluyendo ligasa dependiente de ATP y polimerasas de una fuente que no es microorganismo, como células de mamífero, pero no inhiben la actividad de ligasas o polimerasas microbianas. Esto se puede deber a la mayor resistencia de las enzimas microbianas a estas condiciones y/o a las condiciones de lisis diferenciales empleadas en los métodos para asegurar que solamente las enzimas que no son microorganismos quedan expuestas a las condiciones de pH alto. El pH alto es generalmente un pH de al menos en torno a 10, por ejemplo, en torno a 10, 11, 12, 13 o 14. Un pH bajo

es generalmente un pH de menos o igual a en torno a 4, por ejemplo, en torno a 4, 3, 2 o 1. Se entiende por "en torno a" 0,5 de una unidad de pH a cada lado del valor señalado. La alteración del pH de la muestra se puede conseguir utilizando cualquier medio adecuado, tal como podrán apreciar las personas especializadas en la materia. Las enzimas microbianas, como polimerasas y ligasas, pueden ser resistentes a los extremos de pH, mientras que las ligasas de mamífero se pueden inactivar en las mismas condiciones de pH. Esto permite la detección selectiva de ligasas microbianas en una muestra que contiene tanto células de mamífero como células microbianas. En realizaciones específicas, las condiciones que inhiben la actividad de modificación de ácido nucleico de lo que no es microorganismo, como ligasa dependiente de ATP, desde células de mamífero pero que no inhibe la actividad de la fuente de microorganismo de actividad de modificación de ácido nucleico, como por ejemplo ligasas microbianas, comprenden tratar la muestra con hidróxido sódico (NaOH) o carbonato sódico (Na₂CO₃). Dichos agentes pueden utilizarse fácilmente, tal como se muestra en el presente documento, para aumentar el pH de la muestra a un pH alto inactivando así la actividad de ligasa de mamífero al mismo tiempo que se dejan activas las ligasas microbianas (fúngica y bacteriana). Las personas especializadas podrán aplicar las concentraciones y volúmenes adecuados del agente apropiado. En ciertas realizaciones, sin embargo, NaOH es al menos en torno a 5 mM NaOH. En algunas realizaciones, la concentración de álcali es no más de 10 mM, como por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mM.

En otras realizaciones, el pH es en torno a 12 para inactivar la actividad de modificación de ácido nucleico de mamífero (como actividad de polimerasa y/o ligasa dependiente de ATP), pero no actividad de modificación de ácido nucleico microbiana (como actividad de polimerasa y/o ligasa). En realizaciones específicas, las condiciones de pH pueden aumentarse a al menos en torno a 11 o al menos 11,2. Este tratamiento puede tener como resultado la lisis de microorganismos en la muestra y llevar por tanto a que la actividad de modificación de ácido nucleico (p.ej. polimerasa y/o ligasa) se libere en la muestra. Esto permite la detección de actividad de modificación de ácido nucleico (p.ej. polimerasas y/o ligasas) en la muestra, que se origina desde el microorganismo, sin necesidad de una etapa de lisis por separado. En estas condiciones, se inactivan las ligasas de mamífero (como ligasas dependientes de ATP de la sangre). Sin embargo, normalmente los métodos incluyen normalmente una etapa por separado para la lisis de microorganismos en la muestra, tal como se explica con mayor detalle más adelante en el presente documento.

En algunas realizaciones, el tratamiento en condiciones de pH alto se detiene por adición de un reactivo para disminuir el pH. Entre los reactivos adecuados se incluyen un tampón y/o un ácido. En realizaciones específicas, el tampón comprende un tampón Tris-HCl (p.ej. pH 7,2 o 8). Otros agentes adecuados para reducir el pH incluyen ácidos como ácido clorhídrico (HCl) y ácido sulfúrico (H₂SO₄). Estos ácidos (y otros) pueden incorporarse en un tampón, tal como podrán apreciar las personas especializadas en la materia. Estas etapas pueden incorporarse en la etapa (a) del método descrito.

En realizaciones específicas, se lleva a cabo la etapa (a) a una temperatura de entre en torno a (lo que significa más menos 0,5 grados) 15 y 30 grados Celsius. En ciertas realizaciones, se lleva a cabo la etapa (a) a temperatura ambiente. En conjunto, todos los métodos que se describen en el presente documento pueden realizarse a estas temperaturas.

En una cita más específica de estos métodos, la invención proporciona además un método de detección de la ausencia o presencia de un microorganismo en una muestra, conteniendo la muestra una fuente de actividad de modificación de ácido nucleico que no es microorganismo que comprende:

- (i) incubación de la muestra con un reactivo que lisa lo que no es microorganismos, cuando están presentes en la muestra, pero que no lisa microorganismos en la muestra
- (ii) opcionalmente, separación del material celular lisado de los microorganismos intactos (si los hay) en la muestra
- (iii) contacto de los microorganismos intactos (separados) (si los hay) en la muestra con un reactivo de pH alto e incubación durante no más de 5 minutos para inhibir la fuente que no es microorganismo de actividad de modificación de ácido nucleico (al mismo tiempo que no afecta a la actividad de modificación de ácido nucleico del microorganismo en la muestra)
- (iv) adición de un reactivo que disminuye el pH para detener la incubación a un pH alto
- (v) separación de los microorganismos cuando están presentes en la muestra de los reactivos que modifican el pH
- (vi) lisis de cualquier microorganismo separado
- (vii) contacto de la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para la actividad de modificación de ácido nucleico del microorganismo en la muestra,
- (viii) incubación de la muestra que se ha puesto en contacto de este modo en condiciones adecuadas para la actividad de modificación de ácido nucleico; y
- (ix) determinación específica de la ausencia o presencia de una molécula de ácido nucleico modificada que es el resultado de la acción de la actividad de modificación de ácido nucleico en la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la ausencia o presencia del microorganismo.

La etapa (ii) es una etapa opcional ya que, en algunas realizaciones, no es necesario separar el material celular lisado de los microorganismos intactos. Esto es porque la etapa (iii) se utiliza para inhibir la actividad de modificación

de ácido nucleico encontrada en el material celular lisado en cualquier caso.

Se entiende por "material celular lisado" el producto de lisis de lo que no es microorganismos. Esto incluye las membranas celulares y el contenido intracelular de las células lisadas.

Más específicamente, los métodos pueden comprender las etapas de:

- (i) incubación de la muestra con un reactivo que lisa lo que no es microorganismos, cuando están presentes en la muestra, pero no lisa los microorganismos en la muestra
- (ii) centrifugación de la muestra para formar un aglomerado que contiene microorganismos cuando están presentes en la muestra
- (iii) separación del sobrenadante del aglomerado
- (iv) re-suspensión del aglomerado en un reactivo de pH alto e incubación durante no más de 8 minutos para inhibir la fuente de lo que no es microorganismo de actividad de modificación de ácido nucleico (al mismo tiempo que no afecta a la actividad de modificación de ácido nucleico del microorganismo en la muestra)
- (v) adición de un reactivo que disminuye el pH para detener la incubación a un pH alto
- (vi) una segunda centrifugación de la muestra para formar un aglomerado que contienen microorganismos, cuando están presentes en la muestra
- (vi) separación del sobrenadante del aglomerado
- (vii) lisado de cualquier microorganismo en el aglomerado
- (viii) contacto de la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para la actividad de modificación de ácido nucleico del microorganismo en la muestra,
- (ix) incubación de la muestra que se ha puesto en contacto de este modo en condiciones adecuadas para la actividad de modificación de ácido nucleico; y
- (x) determinación específica de la ausencia o presencia de una molécula de ácido nucleico modificada que es el resultado de la acción de la actividad de modificación de ácido nucleico en la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la ausencia o presencia del microorganismo.

En realizaciones específicas, la etapa (iii) o (iv) respectivamente o todo el método se lleva a cabo a una temperatura de entre 15 y 30 grados Celsius. Alternativamente, la etapa (iii) o (iv), respectivamente, o todo el método pueden llevarse a cabo a temperatura ambiente.

El reactivo que lisa lo que no es microorganismos, en particular, células de mamífero, cuando están presentes en la muestra, pero que no lisa microorganismos en la muestra puede ser cualquier reactivo adecuado. El reactivo puede incluir un tensioactivo o detergente en algunas realizaciones, como por ejemplo un detergente no iónico. Entre los ejemplos adecuados se incluyen monolaurato de polietilén glicol sorbitano (Tween 20), por ejemplo a 5 % p/v. El reactivo puede incluir una saponina, por ejemplo a 5 % p/v. El reactivo puede incluir una sal de haluro de metal, como cloruro sódico, por ejemplo a 8,5 g/l. El reactivo puede incluir una mezcla de los tres componentes. La muestra puede mezclarse con el reactivo en condiciones adecuadas para asegurar la lisis de lo que no es microorganismos, en particular, células de mamífero, cuando están presentes en la muestra, pero sin la lisis de microorganismos (o insignificante) cuando están presentes en la muestra. La muestra puede exponerse al reactivo durante un período de entre 5 y 30 minutos, por ejemplo 5, 10, 15, 20, 25 o 30 minutos. Esta etapa puede realizarse a cualquier temperatura adecuada, por ejemplo entre 15 y 30 grados Celsius o a temperatura ambiente.

Cuando se utiliza, la separación del material celular lisado de los microorganismos intactos (si los hay) en la muestra puede realizarse a través de cualquier método adecuado. Por ejemplo puede basarse en una forma de purificación por afinidad como pueda ser un enfoque a base de anticuerpos (policlonal). Puede basarse en la filtración, en algunas realizaciones. La separación puede basarse en la centrifugación de la muestra para formar un aglomerado que contiene microorganismos cuando están presentes en la muestra. La centrifugación de la muestra puede realizarse a cualquier velocidad adecuada y durante un período de tiempo adecuado. Por ejemplo, puede centrifugarse la muestra a una velocidad de entre 3000 y 10000 g, por ejemplo en torno a 7000 g o 7300 g. Puede centrifugarse la muestra durante un período de tiempo adecuado para asegurar el éxito de la lisis de lo que no es microorganismos, en particular células de mamífero, cuando están presentes en la muestra, pero sin la lisis de microorganismos en la muestra, o insignificante. Esto se puede determinar en conjunto con la velocidad de centrifugación. El período de tiempo puede ser entre 1 y 30 minutos, como por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 o 30 minutos. Esta etapa puede realizarse a cualquier temperatura adecuada, por ejemplo a entre 15 y 30 grados Celsius o a temperatura ambiente. Tras la separación, puede descartarse el material celular lisado (en forma de sobrenadante) y retenerse las células no lisadas (por ejemplo como un aglomerado).

La explicación expuesta en lo que respecta a los métodos más generales se aplica en este caso haciendo los cambios necesarios. Por lo tanto, en algunas realizaciones el reactivo de pH alto comprende NaOH o Na₂CO₃. En algunas realizaciones, la concentración del reactivo de pH alto es en torno a 5 mM o más. En ciertas realizaciones, el reactivo que disminuye el pH comprende un tampón o un ácido, como un tampón Tris-HCl. El tampón puede ser un tampón de pH 7,2 u 8 en realizaciones específicas.

Tras la exposición al agente de modificación del pH, se separa cualquier microorganismo en la muestra de las condiciones de modificación de pH. Esto se puede conseguir mediante una segunda centrifugación de la muestra para formar un aglomerado que contiene microorganismos, cuando están presentes en la muestra, seguido de la separación del sobrenadante del aglomerado. Las condiciones de centrifugación adecuadas se han explicado anteriormente.

El método requiere después la lisis de cualquier microorganismo separado para permitir la detección de la actividad de modificación de ácido nucleico. Esto se puede conseguir por adición de una mezcla de lisis. La mezcla de lisis es generalmente útil en los métodos de la invención. La mezcla de lisis puede incluir una mezcla específica de componentes para asegurar una lisis de los microorganismos eficiente sin afectar negativamente a la actividad de la actividad de modificación de ácido nucleico dentro de las células. Los componentes pueden seleccionarse entre vehículos/proteínas de suero como BSA, tensioactivos/detergentes, sales de haluros de metal, tampones, quelantes etc. en su forma básica, la mezcla de lisis de la invención puede incluir los siguientes componentes:

1. Un tensioactivo/detergente
2. Proteína de suero como albúmina (p.ej. BSA)
3. Tampón
4. Nucleótidos, como dNTP
5. Molécula de ácido nucleico (que actúa sobre un sustrato en los ensayos de la invención).

En la Tabla 1 se exponen una mezcla de lisis adecuada y forma un aspecto por separado de la invención:

Tabla 1. Componentes de la mezcla de lisis

L1	Albúmina de suero bovino Triton X100 Tween 20	1,5% p/v 1,5% v/v 1,5% v/v
L2	Sulfato de amonio Sulfato de magnesio heptahidratado Cloruro de potasio Tris-HCl, pH 8,0 dNTP (A,G,C,T)	2,64 g/l 0,98 g/l 1,5 g/l 40 mM 500 µM
L3	Sustrato ETGA (molécula de ácido nucleico) Tris-HCl, pH 8,5 KCl EDTA	0,001 µM - 0,01 µM 20 mM 10 µM 10 µM

Se enumeran ejemplos de concentraciones de cada componente, pero se pueden modificar tal como podrán apreciar las personas especializadas en la materia.

La lisis también puede requerir la ruptura de las células. Por ejemplo, se pueden romper las células utilizando una mezcla de lisis en combinación con medios físicos y/o enzimáticos. En algunas realizaciones, la rotura física emplea un disruptor. El disruptor puede llevar incorporadas perlas, como por ejemplo perlas de vidrio, para lisar las células. Existen disponibles en el mercado aparatos adecuados e incluyen el Disruptor Genie fabricado por Scientific Industries. La rotura enzimática puede requerir el uso de un agente seleccionado entre lisostafina, lisozima y/o liticase, en algunas realizaciones.

Tal como se indica en la Tabla 1, la etapa de contacto de la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como un sustrato para actividad de modificación de ácido nucleico del microorganismo en la muestra puede incluir la adición de la molécula de ácido nucleico a la mezcla de lisis.

A continuación, se incuba la muestra en condiciones adecuadas para la actividad de modificación de ácido nucleico. Esto puede implicar la incubación a una temperatura óptima para la actividad de modificación de ácido nucleico. Por ejemplo, la muestra puede incubarse a una temperatura entre en torno 15 y 40 grados Celsius, como, por ejemplo, en torno a 37 grados Celsius. Esto puede ser durante cualquier período de tiempo adecuado, por ejemplo entre 5 y 60 minutos, por ejemplo en torno a 5, 10, 15, 20, 25 o 30 minutos. A continuación, se puede inactivar la actividad de modificación de ácido nucleico antes de la etapa de detección de la molécula de ácido nucleico modificada. Esto se puede conseguir elevando la temperatura, por ejemplo a una temperatura por encima de 60 grados Celsius, por ejemplo, 95 grados Celsius durante un período de tiempo adecuado. Puede ser un período de tiempo relativamente corto, como 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 o más minutos.

Determinar específicamente la ausencia o presencia de una molécula de ácido nucleico modificada que es el resultado de la acción de la actividad de modificación de ácido nucleico en la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la ausencia o presencia del microorganismo puede realizarse a través de cualquier método adecuado tal como se explica en el presente documento. Los métodos preferentes se basan en la amplificación de ácido nucleico y pueden permitir la cuantificación de la actividad de modificación de ácido nucleico (y por tanto los microorganismos) en la muestra.

Los autores de la invención han investigado también el uso de una molécula de control positivo interno (IPC) en el contexto de los métodos ETGA. En particular, la invención puede basarse en la inclusión de IPC con la molécula de ácido nucleico sustrato de manera que el IPC quede expuesto a condiciones idénticas. Han observado que la actividad residual de nucleasa en la muestra puede afectar al sustrato añadido a la muestra (particularmente, en la mezcla de lisis, tal como se define en el presente documento). Por tanto, hay una ventaja en proteger el IPC de la actividad de nucleasa. Por consiguiente, la invención proporciona también un método de detección de la ausencia o presencia de un microorganismo en una muestra (líquida), conteniendo la muestra potencialmente una fuente que no es microorganismo de actividad de nucleasa, que comprende:

- (i) incubación de la muestra con un reactivo que lisa lo que no es microorganismos cuando están presentes en la muestra pero no lisa microorganismos en la muestra
- (ii) separación del material celular lisado de los microorganismos intactos (si los hay) en la muestra y/o inactivación del material celular lisado
- (iii) lisis de cualquier microorganismo tras la separación y/o inactivación
- (iv) contacto de la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como un sustrato para actividad de modificación de ácido nucleico del microorganismo en la muestra junto con la molécula de ácido nucleico de control positivo interno (IPC),
- (v) incubación de la muestra que se ha puesto en contacto de este modo en condiciones adecuadas para la actividad de modificación de ácido nucleico; y
- (vi) determinación específica de la ausencia o presencia de una molécula de ácido nucleico modificada que es el resultado de la acción de la actividad de modificación de ácido nucleico en la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la ausencia o presencia del microorganismo, caracterizado por que se modifica la molécula de ácido nucleico de IPC para protegerla de actividad de nucleasa.

La separación de la etapa (ii) es una etapa opcional ya que, en algunas realizaciones no es necesario separar el material celular lisado de los microorganismos intactos. En algunas realizaciones, se lleva a cabo una etapa alternativa o adicional de inactivación de la actividad de modificación de ácido nucleico encontrado en el material celular lisado. Puede emplearse cualquier técnica de inactivación adecuada tal como se explica en el presente documento. Por ejemplo, la inactivación puede ser de la actividad de modificación de ácido nucleico y/o la actividad de nucleasa en el material celular lisado. La inactivación se puede conseguir utilizando cualquier medio adecuado, por ejemplo tratamiento con pH alto tal como se explica en el presente documento. El hecho de que el microorganismo permanezca intacto puede protegerlo de un tratamiento de inactivación.

De manera similar, la invención proporciona también un método de detección de la ausencia o presencia de un microorganismo en una muestra (líquida), conteniendo potencialmente la muestra una fuente de actividad de nucleasa que no es microorganismo que comprende:

- (a) centrifugación de la muestra para formar un aglomerado que contiene microorganismos cuando están presentes en la muestra
- (b) separación del sobrenadante del aglomerado
- (c) lisis de cualquier microorganismo en el aglomerado
- (d) contacto de la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para la actividad de modificación de ácido nucleico del microorganismo en la muestra junto con una molécula de ácido nucleico de control positivo interno (IPC),
- (e) incubación de la muestra que se ha puesto en contacto de este modo en condiciones adecuadas para la actividad de modificación de ácido nucleico; y
- (f) determinación específica de la ausencia o presencia de una molécula de ácido nucleico modificada que es el resultado de la acción de la actividad de modificación de ácido nucleico en la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la ausencia o presencia del microorganismo, caracterizado por que se modifica la molécula de ácido nucleico IPC para protegerla de actividad de nucleasa.

El IPC protegido es particularmente ventajoso en el contexto del uso de moléculas sustrato protegidas. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico (sustrato) se modifica también para protegerla de actividad de nucleasa. Esto asegura que las moléculas de ácido nucleico queden protegidas y sujetas a las mismas condiciones. Puede emplearse cualquier medio adecuado para proteger las moléculas de ácido nucleico de la actividad de nucleasa. Entre los ejemplos no exhaustivos se incluyen la incorporación de metilación en las moléculas de ácido nucleico, la modificación de los extremos, como por ejemplo protección de los extremos 3' y/o 5' y la incorporación de nucleótidos sintéticos. En realizaciones específicas, los nucleótidos sintéticos comprenden nucleótidos fosforotioato y/o nucleótidos de ácidos nucleicos cerrados. Preferentemente, los nucleótidos sintéticos son nucleótidos fosforotioato. En ciertas realizaciones, los nucleótidos sintéticos reemplazan al menos uno de todos nucleótidos en la molécula de ácido nucleicos. En realizaciones específicas, se modifican el IPC y molécula de ácido nucleico sustrato de la misma manera. Esto es con vistas a proporcionar una protección lo más igual posible contra la actividad de nucleasa.

En el contexto de la presente invención, si se modifica el IPC para protegerlo de la actividad de nucleasa, se pre-modifica el IPC para protegerlo de actividad de nucleasa, es decir, se modifica el IPC para protegerlo de actividad de

nucleasa antes de su contacto con la muestra.

La invención contempla asimismo el uso del IPC para llevar un seguimiento de la posible actividad contaminante de la nucleasa en la muestra. Por consiguiente, la invención proporciona también un método de detección de la ausencia o presencia de un microorganismo en una muestra (líquida), conteniendo potencialmente la muestra una fuente de actividad de nucleasa que no es microorganismo, que comprende:

- (i) incubación de la muestra con un reactivo que lisa lo que no es microorganismos cuando están presentes en la muestra pero no lisa los microorganismos en la muestra
- (ii) separación del material celular lisado de los microorganismos intactos (si los hay) en la muestra y/o inactivación del material celular lisado
- (iii) lisis de cualquier microorganismo tras la separación y/o inactivación
- (iv) contacto de la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como un sustrato para actividad de modificación de ácido nucleico del microorganismo en la muestra junto con una molécula de ácido nucleico de control positivo interno (IPC),
- (v) incubación de la muestra que se ha puesto en contacto de este modo en condiciones adecuadas para la actividad de modificación de ácido nucleico; y
- (vi) determinación específica de la ausencia o presencia de una molécula de ácido nucleico modificada que es el resultado de la acción de la actividad de modificación de ácido nucleico en la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la ausencia o presencia del microorganismo, caracterizado por que la molécula de ácido nucleico IPC es susceptible de la actividad de nucleasa y se utiliza para identificar la actividad contaminante de nucleasa en el aglomerado.

La separación en la etapa (ii) es una etapa opcional ya que, en algunas realizaciones, no es necesario separar el material celular lisado de los microorganismos intactos. En algunas realizaciones, se lleva a cabo una etapa alternativa o adicional de inactivación de la actividad de modificación de ácido nucleico encontrado en el material celular lisado. Puede emplearse cualquier técnica de inactivación adecuada tal como se explica en el presente documento. Por ejemplo, la inactivación puede ser de la actividad de modificación de ácido nucleico y/o la actividad de nucleasa en el material celular lisado. La inactivación se puede conseguir utilizando cualquier medio adecuado, por ejemplo tratamiento de pH alto tal como se ha explicado anteriormente. El hecho de que los microorganismos permanezcan intactos puede protegerlos de un tratamiento de inactivación.

De manera similar, se proporciona además un método de detección de la ausencia o presencia de un microorganismo en una muestra (líquida), conteniendo potencialmente la muestra una fuente que no es microorganismo de actividad de nucleasa que comprende:

- (a) centrifugación de la muestra para formar un aglomerado que contiene microorganismos cuando están presentes en la muestra
- (b) separación del sobrenadante del aglomerado
- (c) lisis de cualquier microorganismo en el aglomerado
- (d) contacto de la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como un sustrato para actividad de modificación de ácido nucleico del microorganismo en la muestra junto con una molécula de ácido nucleico de control positivo interno (IPC),
- (e) incubación de la muestra que se ha puesto en contacto de este modo en condiciones adecuadas para la actividad de modificación de ácido nucleico; y
- (f) determinación específica de la ausencia o presencia de una molécula de ácido nucleico modificada que es el resultado de la acción de la actividad de modificación de ácido nucleico en la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la ausencia o presencia del microorganismo, caracterizado por que la molécula de ácido nucleico IPC es susceptible a la actividad de nucleasa y se utiliza para identificar la actividad contaminante de nucleasa en el aglomerado.

Normalmente, se realizan conjuntamente las etapas (iii) y (iv) o (c) y (d).

En realizaciones específicas, la molécula de ácido nucleico (sustrato) utilizada en los métodos de la invención es al menos parcialmente de doble cadena y comprende restos uracilo en la cadena complementaria y la etapa de determinar específicamente la ausencia o presencia de la molécula de ácido nucleico modificado comprende la adición de uracil ADN glicosilasa (UDG) a la muestra para degradar los restos uracilo en la cadena complementaria.

En ciertas realizaciones, la primera cadena de la molécula de ácido nucleico (sustrato) parcialmente de doble cadena comprende (o consiste en) nucleótidos sintéticos (p.ej. nucleótidos fosforotioato) y la segunda cadena (complementaria) comprende (o consiste en) restos uracilo y, opcionalmente, nucleótidos sintéticos (p.ej. nucleótidos fosforotioato). Preferentemente, la región de doble cadena abarca las regiones del extremo 3' de las cadenas primera y segunda (complementaria). Preferentemente, la región de doble cadena es de al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20 o al menos 25 nucleótidos; opcionalmente, la región de doble cadena es de no más de 50 nucleótidos. La primera cadena puede extenderse durante una etapa de incubación, tal como se describe en el presente documento, utilizando dNTP desprotegido (o normal) mediante la actividad de polimerasa de un

microorganismo en la muestra para formar una primera cadena extendida que comprende nucleótidos sin proteger (o normales). Esta etapa se basa en el uso de la segunda cadena como matriz (aguas arriba de la región de complementariedad entre las cadenas primera y segunda). Tras la etapa de incubación, se puede degradar la segunda cadena (complementaria) añadiendo uracil ADN glicosilasa (UDG) a la muestra dejando la primera cadena extendida como una molécula de una sola cadena que comprende nucleótidos sintéticos y nucleótidos sin proteger. Tras la degradación de la segunda cadena, puede detectarse la primera cadena extendida de la molécula de ácido nucleico (sustrato) en una etapa de amplificación. Los autores de la invención han observado que el uso de una molécula de ácido nucleico (sustrato) parcialmente de doble cadena, tal como se ha descrito, mejora la detección de un microorganismo en la muestra.

En ciertas realizaciones, la molécula de ácido nucleico IPC comprende sitios de unión a cebador idénticos a la molécula de ácido nucleico de manera que existe competencia por la unión de cebador (en la etapa (vi) o (f) del método).

En otras realizaciones, se añade una sonda de ácido nucleico (en la etapa (vi) o (f)) que se une a la secuencia de sonda diana dentro de la molécula de ácido nucleico. Normalmente, la sonda se une a la cadena codificante de la molécula de ácido nucleico. En otras realizaciones, se añade otra sonda de ácido nucleico más en la etapa (vi) o (f) respectivamente que se une a la secuencia de sonda diana dentro de la molécula de ácido nucleico IPC. En realizaciones específicas, la sonda de ácido nucleico no se une a la molécula de ácido nucleico IPC y la otra sonda adicional de ácido nucleico no se une a la molécula de ácido nucleico. La sonda de ácido nucleico y/o la sonda de ácido nucleico adicional pueden estar marcadas. Preferentemente, están marcadas de forma diferente.

En realizaciones específicas, la cadena complementaria de la molécula de ácido nucleico comprende una modificación en el extremo 3' para impedir la extensión. Esta modificación puede comprender la incorporación de un nucleótido no extensible. En realizaciones específicas, el nucleótido no extensible es un nucleótido didesoxi trifosfato (ddNTP), como didesoxi Citidina.

En los métodos en los que IPC es susceptible a la actividad de nucleasa, puede modificarse la molécula de ácido nucleico (sustrato) para protegerla de la actividad de nucleasa. Las modificaciones adecuadas se explican en el presente documento y pueden seleccionarse entre incorporación de metilación, protección de los extremos 3' y/o 5', incorporación de nucleótidos sintéticos. Los ejemplos de nucleótidos sintéticos comprenden nucleótidos fosforotioato y/o nucleótidos de ácidos nucleicos cerrados. Preferentemente, los nucleótidos sintéticos son nucleótidos fosforotioato.

Los diversos desarrollos del formato de ensayo básico pueden combinarse ventajosamente para producir un método particularmente específico y sensible. Por consiguiente, la invención proporciona además un método de detección de la ausencia o presencia de un microorganismo en una muestra, conteniendo la muestra una fuente de actividad de modificación de ácido nucleico que no es microorganismo que comprende:

- (i) incubación de la muestra con un reactivo que lisa lo que no es microorganismos, cuando están presentes en la muestra, pero no lisa los microorganismos en la muestra
- (ii) opcionalmente, separación del material celular lisado de los microorganismos intactos (si los hay) en la muestra
- (iii) contacto de los microorganismos intactos (separados) (si los hay) en la muestra con un reactivo de pH alto e incubación durante no más de 5 minutos para inhibir la fuente de actividad de modificación de ácido nucleico que no es microorganismo (al mismo tiempo que no afecta a la actividad de modificación de ácido nucleico del microorganismo en la muestra)
- (iv) adición de un reactivo que disminuye el pH para detener la incubación a un pH alto
- (v) separación de los microorganismos cuando están presentes en la muestra desde los reactivos que modifican el pH
- (vi) lisis de cualquier microorganismo separado
- (vii) contacto de la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como un sustrato para actividad de modificación de ácido nucleico del microorganismo en la muestra,
- (viii) incubación de la muestra que se ha puesto en contacto de este modo en condiciones adecuadas para la actividad de modificación de ácido nucleico; y
- (ix) determinación específica de la ausencia o presencia de una molécula de ácido nucleico modificada que es el resultado de la acción de la actividad de modificación de ácido nucleico en la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la ausencia o presencia del microorganismo, donde la molécula de ácido nucleico se modifica para protegerla de la actividad de nucleasa.

La Etapa (ii) es una etapa opcional ya que, en algunas realizaciones, no es necesario separar el material celular lisado de los microorganismos intactos. Esto es porque la etapa (iii) se emplea para inhibir la actividad de modificación de ácido nucleico encontrada en el material celular lisado en cualquier caso.

De manera similar, la invención proporciona además un método de detección de la ausencia o presencia de un microorganismo en una muestra, conteniendo la muestra una fuente de actividad de modificación de ácido nucleico

que no es microorganismo que comprende:

- (a) incubación de la muestra con un reactivo que lisa lo que no es microorganismos cuando están presentes en la muestra pero no lisa los microorganismos en la muestra
- (b) centrifugación de la muestra para formar un aglomerado que contiene microorganismos cuando están presentes en la muestra
- (c) separación del sobrenadante del aglomerado
- (d) re-suspensión del aglomerado en un reactivo de pH alto e incubación durante no más de 5 minutos para inhibir la fuente de actividad de modificación de ácido nucleico que no es microorganismo (al mismo tiempo que no afecta a la actividad de modificación de ácido nucleico del microorganismo en la muestra)
- (e) adición de un reactivo que disminuye el pH para detener la incubación a un pH alto
- (f) una segunda centrifugación de la muestra para formar un aglomerado que contiene microorganismos cuando están presentes en la muestra
- (g) separación del sobrenadante del aglomerado
- (h) lisis de cualquier microorganismo en el aglomerado
- (i) contacto de la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como un sustrato para actividad de modificación de ácido nucleico del microorganismo en la muestra,
- (j) incubación de la muestra que se ha puesto en contacto de este modo en condiciones adecuadas para la actividad de modificación de ácido nucleico; y
- (k) determinación específica de la ausencia o presencia de una molécula de ácido nucleico modificada que es el resultado de la acción de la actividad de modificación de ácido nucleico en la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la ausencia o presencia del microorganismo, donde la molécula de ácido nucleico se modifica para protegerla de la actividad de nucleasa.

Por tanto, estos métodos representan una combinación de otros métodos que se describen en el presente documento. Por consiguiente, todas las realizaciones pertinentes se aplican a este método general haciendo los cambios necesarios. Por ejemplo, en cuanto a otras realizaciones en las que se modifica el ácido nucleico, la modificación puede seleccionarse entre incorporación de metilación, protección de los extremos 3' y/o 5', incorporación de nucleótidos sintéticos. Los nucleótidos sintéticos pueden comprender nucleótidos fosforotioato y/o nucleótidos de ácidos nucleicos cerrados. Preferentemente, los nucleótidos sintéticos son nucleótidos fosforotioato.

En realizaciones en particular, se añade la molécula de ácido nucleico a la muestra a una concentración de al menos 2 nM y menos de 50 nM (p.ej. de 2 nM a 25 nM, de 5 nM a 15 nM o de 7,5 a 12,5 nM), como por ejemplo 2 nM, 5 nM, 7,5 nM o 10 nM. La molécula de ácido nucleico puede incluirse en la mezcla de lisis utilizada en la etapa (vi) o (h) del método (es decir la concentración especificada es la concentración en la mezcla de lisis). Por tanto, las etapas (vi) y (vii) o (h) y (i) respectivamente pueden combinarse eficazmente como una sola etapa en algunas realizaciones. La mezcla de lisis puede ser tal como se especifica en la Tabla 1 o tal como se explica a lo largo de la presente divulgación.

El método puede comprender de manera similar la adición a la muestra de desoxirribonucleótido trifosfatos a una concentración de más de 50 μ M, preferentemente al menos 100 μ M, como por ejemplo de 55 a 300 μ M o de 60 a 250 μ M o de 75 a 200 μ M. También en este caso, pueden incluirse los dNTP en la mezcla de lisis utilizada en la etapa (vi) o (h) del método (es decir la concentración especificada es la concentración en la mezcla de lisis). Por tanto, las etapas (vi) y (vii) o (h) y (i), respectivamente, pueden combinarse eficazmente en una sola etapa en algunas realizaciones.

Tal como se ha explicado con mayor detalle anteriormente, el reactivo de pH alto puede ser o comprender NaOH o Na_2CO_3 . En realizaciones específicas, la concentración del reactivo de pH alto es en torno a 5 mM o más. El reactivo que disminuye el pH puede comprender un tampón o un ácido, como un tampón Tris-HCl (p.ej. pH 7,2 u 8). En realizaciones específicas, la etapa (iii) o (d) se lleva a cabo a una temperatura entre 15 y 30 grados Celsius o se lleva a cabo a temperatura ambiente. Cada una de las etapas y/o todas las etapas del método puede realizarse a una temperatura entre 15 y 30 grados Celsius o a temperatura ambiente en algunas realizaciones. Cuando se utilizan etapas de amplificación del ácido nucleico, como PCR, es necesario realizar dichas etapas a temperaturas apropiadas, tal como se detalla en el presente documento y entienden las personas especializadas.

En realizaciones específicas, puede emplearse IPC susceptible de nucleasa. Por tanto, las etapas (vii) o (i) respectivamente pueden comprender el contacto de la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para la actividad de modificación de ácido nucleico del microorganismo en la muestra junto con una molécula de ácido nucleico de control positivo interno (IPC), donde la molécula de ácido nucleico IPC es susceptible de la actividad de nucleasa y se utiliza para identificar la actividad contaminante de nucleasa en el aglomerado.

Alternativamente, puede emplearse IPC resistente a nucleasa. Por tanto, las etapas (vii) o (i), respectivamente, pueden comprender el contacto de la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como un sustrato para la actividad de modificación de ácido nucleico del microorganismo en la muestra junto con una molécula de ácido nucleico de control positivo interno (IPC), donde la molécula de ácido nucleico IPC se modifica para protegerla de la actividad de nucleasa. Las modificaciones adecuadas se explican con mayor detalle en el presente documento y

pueden seleccionarse entre incorporación de metilación, protección de los extremos 3' y/o 5', incorporación de nucleótidos sintéticos. Los nucleótidos sintéticos pueden ser o comprender nucleótidos fosforotioato y/o nucleótidos de ácidos nucleicos cerrados. Preferentemente, los nucleótidos sintéticos son nucleótidos fosforotioato. Si se modifican ambas moléculas, preferentemente, se modifican de la misma manera o similar, de tal modo que la resistencia a nucleasa sea comparable. Esto permite que el IPC realice una función comparativa muy útil para determinar el impacto de la actividad de nucleasa en la molécula sustrato.

Tal como se ha mencionado, en algunas realizaciones, se realizan conjuntamente las etapas (vi) y (vii) o (h) y (i). En este caso, se añade la molécula de ácido nucleico a la muestra junto con un reactivo de lisis para formar una mezcla de lisis.

Tal como se explica con mayor detalle en el presente documento, cuya explicación se aplica haciendo los cambios necesarios, la detección de la molécula de ácido nucleico modificada puede detectarse a través de una gama de métodos entre los que se incluyen la secuenciación o amplificación del ácido nucleico. En realizaciones específicas, la etapa (ix) o (k), respectivamente, comprende una etapa de amplificación de ácido nucleico.

Puede emplearse cualquier molécula de ácido nucleico adecuada. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico incorpora restos uracilo. En realizaciones específicas, la molécula de ácido nucleico es al menos parcialmente de doble cadena y comprende restos uracilo en la cadena complementaria. En dichas realizaciones, los métodos (y en particular las etapas (ix) o (k) del método correspondiente) pueden comprender la adición de uracil ADN glicosilasa (UDG) a la muestra para degradar los restos uracilo en la cadena complementaria. En otras realizaciones, la cadena complementaria de la molécula de ácido nucleico comprende una modificación en el extremo 3' para evitar la extensión. Se entiende por "extensión" la adición de otros nucleótidos. Puede emplearse cualquier modificación adecuada. En realizaciones específicas, la modificación es o comprende la incorporación de un nucleótido no extensible. Puede emplearse cualquier nucleótido no extensible adecuado. Por ejemplo, el nucleótido no extensible puede ser o comprender un didesoxi nucleótido trifosfato (ddNTP), como didesoxi Citidina.

En ciertas realizaciones, la molécula de ácido nucleico IPC comprende sitios de unión a cebador que son idénticos a la molécula de ácido nucleico de tal modo que hay competencia para la unión de cebador durante la etapa de detección de la molécula de ácido nucleico modificada (en la etapa (ix) o (k)).

Tal como se explica en el presente documento existe toda una gama de tecnologías de amplificación disponibles, muchas de las cuales se basan en sondas (como sondas hidrolíticas o de horquilla). Por tanto, en algunas realizaciones, los métodos incluyen el uso de una sonda, en particular en etapa (ix) o (k). En realizaciones específicas, se añade una sonda de ácido nucleico en la etapa (ix) o (k) del método. Dicha sonda se une a una secuencia de sonda diana dentro de la (cadena codificante de la) molécula de ácido nucleico. Se entiende por "unirse" la hibridación en las condiciones aplicadas para el método, tal como podrán apreciar las personas especializadas en la materia. En algunas realizaciones, se utiliza otra sonda de ácido nucleico adicional, por ejemplo añadida en la etapa (ix) o (k), que se une a una secuencia de sonda diana dentro de la molécula de ácido nucleico IPC. En realizaciones específicas, la sonda de ácido nucleico no se une a la molécula de ácido nucleico IPC y la otra sonda de ácido nucleico adicional no se une a la molécula de ácido nucleico (sustrato). Las sondas y moléculas de ácido nucleico (IPC o sustrato) pueden diseñarse para evitar la hibridación cruzada no deseadas aplicando técnicas y herramientas (como herramientas de diseño online) conocidas en la técnica. La sonda de ácido nucleico y/o la sonda de ácido nucleico adicional pueden marcarse. En realizaciones específicas, la sonda de ácido nucleico y la sonda de ácido nucleico adicional están marcadas de forma diferente. Por ejemplo, pueden estar marcadas con fluoróforos que tienen diferentes longitudes de onda de emisión máxima. Las personas especializadas en la materia podrán seleccionar fácilmente los pares de marcadores adecuados, por ejemplo, pueden utilizarse FAM y rojo Texas como marcadores diferentes. De acuerdo con todos los aspectos de la invención, la actividad de modificación de ácido nucleico puede ser para cualquier actividad que sea útil para indicar la viabilidad del microorganismo. La actividad de modificación de ácido nucleico es para una actividad enzimática proporcionada por el microorganismo. Entre los ejemplos se incluyen actividad de polimerasa y/o ligasa. Preferentemente, la actividad de modificación de ácido nucleico es para actividad de polimerasa. La actividad de polimerasa puede comprender actividad de ADN y/o ARN polimerasa. Preferentemente la actividad de polimerasa es actividad de ADN y/o ARN polimerasa. La actividad de ligasa puede ser dependiente de ATP o NAD. Alternativamente, pueden medirse otras actividades de modificación de ácido nucleico pertinentes para la viabilidad como fosfatasa, quinasa y/o actividad de nucleasa.

Preferentemente, la acción de la actividad de modificación de ácido nucleico en la molécula de ácido nucleico sustrato produce una molécula de ácido nucleico extendida.

En el presente documento se describen en detalle moléculas sustrato adecuadas. Se puede hacer referencia también a las patentes internacionales WO2011/130584, WO2010/119270 y WO2009/007719, en las que se divulgan moléculas sustrato adecuadas útiles para detectar la actividad de modificación de ácido nucleico. En el caso de actividad fosfatasa, se divulgan moléculas de ácido nucleico adecuadas en la patente internacional WO2006/123154.

Las moléculas de ácido nucleico sustrato para su uso en los métodos, y la inclusión en los kits, de la invención, ha de ser de la secuencia y estructura adecuadas para que la ligasa dependiente de NAD pueda actuar sobre la molécula para producir una molécula de ácido nucleico ligada detectable (nueva).

- 5 En la sección experimental, a continuación, se describen con más detalle moléculas de ácido nucleico sustrato para su uso en la invención. Por tanto, el sustrato puede comprender las siguientes moléculas:

AS

Uaggcgucggugacaaacggccagcguguugucucu-DDC (3' terminal es didesoxi-C) (SEQ ID NO: 6)

10 S1
Gccgatatcggacaacggccgaactgggaaggcgagactgaccgaccgataagctagaac
agagagacaacaac (SEQ ID NO: 7)

15 Esto es un ejemplo de una molécula de ácido nucleico sustrato que incorpora restos uracilo en la cadena no codificante. La molécula de ácido nucleico es parcialmente de doble cadena y comprende restos uracilo en la cadena complementaria. Esto permite que uracil ADN glicosilasa (UDG) degrade los restos uracilo en la cadena complementaria tras la extensión y evita así que la molécula sustrato se amplifique no específicamente en ausencia de extensión (es decir en ausencia de actividad de modificación de ácido nucleico en la muestra). En otras realizaciones, la cadena complementaria de la molécula de ácido nucleico comprende una modificación en el extremo 3' para evitar la extensión. Se entiende por "extensión" la adición de otros nucleótidos. Puede emplearse cualquier modificación adecuada. En realizaciones específicas, la modificación es o comprende la incorporación de un nucleótido no extensible. Puede emplearse cualquier nucleótido no extensible adecuado. Por ejemplo, el nucleótido no extensible puede ser o comprender un didesoxi nucleótido trifosfato (ddNTP), como didesoxi Citidina tal como se muestra en SED ID NO: 6.

25 Debe señalarse que pueden utilizarse variantes de estas secuencias en la presente invención. Por ejemplo, pueden añadirse secuencias flanqueantes. Pueden emplearse ddNTP alternativos. Las secuencias variantes pueden tener al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % identidad de secuencia de nucleótidos con la secuencia de nucleótidos de las moléculas de ácido nucleico sustrato que se expone como las SEQ ID NO 6 y 7. Las moléculas de ácido nucleico pueden incorporar análogos de nucleótidos sintéticos según sea apropiado o pueden basarse en ARN o ANP, por ejemplo, o mezclas de los mismos. En el presente documento se describen modificaciones adecuadas, por ejemplo, para proteger contra la actividad de nucleasa. Pueden estar marcados, por ejemplo, empleando un marcador fluorescente o un par FRET, en ciertas realizaciones para facilitar la detección. Los métodos de detección adecuados son como se describe en el presente documento.

35 Por tanto, las moléculas de ácido nucleico (sustrato) incluyen cualquier ácido nucleico natural y análogos naturales o sintéticos que sean capaces de actuar con la actividad de modificación de ácido nucleico para generar molécula de ácido nucleico una (detectable nueva). El sustrato puede extenderse y/o ligarse en realizaciones específicas. Pueden emplearse combinaciones de moléculas de ácido nucleico sustrato para permitir la detección de actividad de polimerasa y ligasa en algunas realizaciones.

40 Preferentemente, el sustrato de ácido nucleico está presente en exceso y, en particular, en un exceso molar grande, con respecto a la actividad de modificación de ácido nucleico (provisto por los microorganismos) en la muestra. Se trata de una diferenciación técnica importante con respecto a los métodos de la técnica anterior. Dado que se detecta una molécula de ácido nucleico extendida o ligada, únicamente la presencia de esta molécula en la mezcla es esencial para que los métodos de detección funcionen eficazmente. Por lo tanto, no es perjudicial para los métodos de la invención que estén presentes otras moléculas de ácido nucleico en la muestra, como puedan ser las de los microorganismos que se van a detectar o de mamíferos u otras fuentes que se puedan encontrar en la muestra que se va a analizar, por ejemplo.

50 En algunas realizaciones, el sustrato y/o los cebadores pueden incorporar moléculas de origen no natural complementarias que pueden aparearse entre sí para evitar una detección no específica del ADN genómico. Por ejemplo, pueden incorporarse pyDAD y puADA en los cebadores y las moléculas sustrato según sea apropiado (Sismour et al., Nucleic Acids Research, 2004, Vol. 32, No. 2: 728-735).

55 Tal como se explica también en el presente documento, los métodos de la invención pueden incorporar una molécula IPC. Puede emplearse cualquier IPC adecuado de acuerdo con los requisitos del método. Como ejemplo, puede utilizarse el siguiente IPC en la invención:

gcc gat atc gga caa cgg ccg aac tgg gaa ggc gag atc agc agg
cca cac gtt aaa gac aga gag aca aca acg ctg gcc gtt tgt cac
60 cga cgc cta (SEQ ID NO: 3)

En todos los métodos de la invención determinar específicamente la ausencia o presencia de la molécula de ácido nucleico modificada puede comprender, consiste esencialmente en o consiste en una amplificación de ácido nucleico etapa. Esto sirve para hacer que los métodos de la invención sean máximamente sensibles. Dichas técnicas de amplificación se conocen perfectamente en la técnica e incluyen métodos como PCR, NASBA (Compton, 1991), 3SR (Fahy et al., 1991), replicación en círculo rodante, amplificación mediada por transcripción (TMA), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) (Clinical Chemistry 45: 777-784, 1999), el proceso de auto-ensamblaje de oligómero de ADN descrito en la patente estadounidense US6261846; reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Barringer et al., 1990), amplificación selectiva amplificación de secuencia de poli nucleótidos diana (patente estadounidense US 6410276), PCR cebada arbitrariamente (patente internacional WO 90/06995), PCR cebada con secuencia de consenso (patente estadounidense US 4437975), tecnología de invasor, tecnología de desplazamiento de cadena amplificación de desplazamiento de marca (patente internacional WO 2004/067726). No se pretende que esta lista sea exhaustiva. Puede emplearse cualquier técnica de amplificación de ácido nucleico siempre y cuando se amplifique específicamente el producto de ácido nucleico apropiado. De manera similar, en algunas realizaciones, pueden emplearse las metodologías basadas en secuenciación para incluir cualquiera de las diversas plataformas de secuenciación de próxima generación. La amplificación se consigue con el uso de cebadores de amplificación específicos para la secuencia de la molécula de ácido nucleico modificada que se va a detectar. Para proporcionar especificidad para las moléculas de ácido nucleico pueden seleccionarse sitios de unión de cebador que corresponden a una región de la secuencia adecuada. Las personas especializadas podrán apreciar que las moléculas de ácido nucleico pueden incluir también secuencias distintas a los sitios de unión de cebador que se requieren para la detección de la molécula de ácido nucleico nueva producida por modificación de la actividad en la muestra, por ejemplo pueden requerirse sitios de unión de ARN Polimerasa o secuencias de promotor para tecnologías de amplificación isotérmica, como NASBA, 3SR y TMA. Uno o más de los sitios de unión de cebador pueden unir con puente el límite de ligación/extensión de la molécula de ácido nucleico sustrato de tal modo que se genera solamente un producto de amplificación si ha tenido lugar la ligación/extensión, por ejemplo. Alternativamente, los cebadores pueden unir cada uno de los lados del límite de ligación/extensión y la amplificación directa a través del límite, de manera que se genera únicamente un producto de amplificación (exponencialmente) si se forma la molécula de ácido nucleico ligada/extendida. Los cebadores y las molécula(s) de ácido nucleico sustrato pueden diseñarse para impedir la amplificación no específica (p.ej., de ADN genómico en la muestra).

En la sección experimental, más adelante, se exponen cebadores adecuados para su uso en los métodos de la invención. Incluyen cebadores que comprenden, consisten esencialmente en o consisten en la SEQ ID NO: 4 y/o 5. Dichos cebadores forman un aspecto por separado de la invención. Debe señalarse que es posible utilizar variantes de estas secuencias en la presente invención. En particular, puede añadirse una secuencia adicional, secuencias flanqueantes específicas, por ejemplo para mejorar la especificidad de unión, según se requiera. Las secuencias variantes pueden tener al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia de nucleótidos con secuencia de nucleótidos de los cebadores expuestos en la sección experimental. Los cebadores pueden incorporar análogos de nucleótidos sintéticos según sea apropiado o pueden basarse en ARN o ANP, por ejemplo, o mezclas de los mismos. Los cebadores pueden estar marcados, por ejemplo con marcadores fluorescentes y/o Pares FRET, dependiendo del modo de detección empleado. Pueden utilizarse sondas que también pueden estar marcadas, según se desee.

Por lo tanto, en ciertos aspectos, los métodos de la invención se llevan a cabo utilizando técnicas de amplificación de ácido nucleico para detectar la molécula de ácido nucleico modificada producida como resultado directo de la acción de la actividad de modificación de ácido nucleico en la molécula de ácido nucleico sustrato lo cual indica la presencia de un microorganismo en la muestra. En ciertas realizaciones, la técnica utilizada se selecciona entre PCR, NASBA, 3SR, TMA, SDA y auto-ensamblaje de oligómero de ADN.

La detección de los productos de amplificación puede ser a través de métodos de rutina como, por ejemplo, electroforesis de gel, si bien, en algunas realizaciones se lleva a cabo utilizando métodos de detección de punto final y en tiempo real.

Dentro de la técnica se conoce una serie de técnicas para la detección en tiempo real o de punto final de los productos de una reacción de amplificación. Entre ellos se incluyen el uso de tintes fluorescentes intercalados como SYBR Verde I (Sambrook y Russell, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Tercera edición), que permite estimar el rendimiento de ADN amplificado sobre la base de la cantidad de fluorescencia producida. Muchos de los métodos de detección en tiempo real producen una lectura fluorescente que puede controlarse de forma continua; entre los ejemplos específicos se incluyen balizas moleculares, sondas de transferencia de energía de resonancia fluorescente. Las técnicas de punto final y tiempo real son ventajosas ya que mantienen la reacción en un "solo tubo". Esto significa que no es necesario un análisis aguas abajo para obtener resultados, lo que conlleva la obtención de resultados más rápidamente. Asimismo, el hecho de mantener la reacción en un entorno de un "solo tubo" reduce el riesgo de contaminación cruzada y permite la producción cuantitativa de los métodos de la invención. Esto puede revestir una particular importancia en el contexto de la presente invención en el que son de crucial importancia las cuestiones de la seguridad y la salud (como pueda ser la detección de una posible infección microbiana en muestras del paciente, por ejemplo).

La cuantificación en tiempo real y de punto final de las reacciones de PCR puede llevarse a cabo utilizando un

sistema TaqMan® (Applied Biosystems), véase Holland et al; Detection of specific polimerase chain reaction product by utilising the 5'-3' exoactivity of nuclease of *Thermus aquaticus* DNA polimerase; Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 88, 7276-7280 (1991), Gelmini et al. Quantitative polimerase chain reaction-based homogeneous assay with furogenic probes to measure C-Erb-2 oncogene amplification. Clin. Chem. 43, 752-758 (1997) y Livak et al. Towards fully automated genome wide polymorphism screening. Nat. Genet. 9, 341-342 (1995). Se puede hacer referencia a este tipo de sonda de forma general como sonda hidrolítica. Se proporcionan asimismo sondas hidrolíticas/Taqman adecuadas para su uso en la detección en tiempo real o punto final. La sonda puede marcarse convenientemente, por ejemplo, utilizando los marcadores que se detallan a continuación.

En el Sistema de Baliza Molecular, véase Tyagi & Kramer. Molecular beacons - probes that fluoresce upon hybridization. Nat. Biotechnol. 14, 303-308 (1996) y Tyagi et al. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. Nat. Biotechnol. 16, 49-53 (1998), las balizas son sondas con forma de horquilla que apagan internamente el fluoróforo cuya fluorescencia se restaura cuando se une a su diana. Dichas sondas se conocen como sondas de horquilla. Las sondas adecuadas, útiles en la presente invención son como se expone en la SEQ ID NO: 1 y 2.

Otro sistema más a base de fluorescencia en tiempo real que puede incorporarse en los métodos de la invención es el sistema Scorpion, véase Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence by Whitcombe et al. Nature Biotechnology 17, 804 - 807 (01 agosto 1999). Otras técnicas de detección en tiempo real y de punto final más que son muy conocidas entre las personas especializadas y que están disponibles en el mercado incluyen la tecnología Lightcycler®, tecnología de cebador Amplifluor®, cebadores DzyNA (Todd et al., Clinical Chemistry 46:5, 625-630 (2000)) o los sistemas de qPCR y qRT-PCR Plexor™.

Por tanto, en otros aspectos más de la invención, se detectan los productos de amplificación del ácido nucleico aplicando técnicas de tiempo real o punto final. En realizaciones específicas de la invención, la técnica de tiempo real consiste en el uso de una cualquiera entre sondas hidrolíticas (el sistema Taqman®), sondas FRET (Sistema Lightcycler®), cebadores de horquilla (sistema Amplifluor®), sondas de horquilla (sistema de baliza molecular), sondas de horquilla incorporadas en un cebador (sistema de sonda Scorpion®), cebadores que incorporan la secuencia complementaria de una ADN enzima y un sustrato de ADN enzima fluorescente escindible (DzYNA), sistemas de qPCR Plexor y de bloqueo de oligonucleótido.

Los productos de amplificación pueden cuantificarse para dar una aproximación de la actividad de modificación de ácido nucleico microbiano en la muestra y, por tanto, el nivel de microorganismos en la muestra. Por tanto, se pretende que "ausencia o presencia" abarque la cuantificación de los niveles de microorganismos en la muestra.

En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción contendrá todos los siguientes: la muestra que se está analizando, la molécula de ácido nucleico sustrato(s), reactivos, tampones y enzimas necesarias para la amplificación de la molécula de ácido nucleico modificada, opcionalmente, además de los reactivos necesarios para permitir una detección en tiempo real o de punto final de los productos de amplificación. Por tanto, el método de detección en conjunto para la actividad de modificación de ácido nucleico (desde uno o más células bacterianas o microorganismos de interés) puede tener lugar en una sola reacción, con una producción cuantitativa y sin necesidad de ninguna etapa de lavado intermedia. El uso de una reacción en "un solo tubo" es ventajosa ya que no hay necesidad de un análisis aguas abajo para obtener resultados, lo que conlleva la obtención de resultados más rápidamente. Asimismo, el hecho de mantener la reacción en un entorno de un "solo tubo" reduce también el riesgo de una contaminación cruzada y permite la producción cuantitativa de los métodos de la invención. Asimismo, las reacciones en un solo tubo son más susceptibles de automatización, por ejemplo, en un contexto de una alta producción.

Alternativamente, los métodos de la invención pueden llevarse a cabo en etapas. Por tanto, en una primera etapa puede ser necesario preparar la muestra en una forma adecuada para su uso en el método de la invención. Por ejemplo, tal como se explica en el presente documento, puede ser necesario la lisis celular selectiva o el aumento de la permeabilidad celular. Puede ser deseable también la captura de la actividad de modificación de ácido nucleico específica, como polimerasa o ligasa, también en este caso, tal como se describe en el presente documento. Pueden inhibirse otras (fuentes de) actividad de modificación de ácido nucleico, como la actividad de nucleasa, etc.

Las etapas de los métodos de la invención antes de la etapa de amplificación pueden no comprender una etapa realizada a una temperatura de más de 40 °C, más de 50 °C, más de 60 °C, más de 70 °C, más de 80 °C, más de 90 °C o más de 95 °C.

Alternativamente, los métodos de la invención pueden no comprender etapas realizadas a una temperatura de más de 40 °C, más de 50 °C, más de 60 °C, más de 70 °C, más de 80 °C, más de 90 °C o más de 95 °C.

Las etapas de los métodos de la invención antes de la etapa de amplificación pueden realizarse a una temperatura entre 10 y 50 grados Celsius, entre 15 y 45 grados Celsius, entre 20 y 40 grados Celsius, entre 25 y 40 grados Celsius, entre 30 y 40 grados Celsius, entre 25 y 35 grados Celsius o entre 15 y 30 grados Celsius, opcionalmente, las etapas de los métodos antes de la etapa de amplificación pueden realizarse a temperatura ambiente.

Alternativamente, las etapas de los métodos de la invención pueden realizarse todas ellas a una temperatura entre 10 y 50 grados Celsius, entre 15 y 45 grados Celsius, entre 20 y 40 grados Celsius, entre 25 y 40 grados Celsius,

entre 30 y 40 grados Celsius, entre 25 y 35 grados Celsius o entre 15 y 30 grados Celsius, opcionalmente, todas las etapas de los métodos pueden realizarse a temperatura ambiente.

Los métodos de la invención pueden comprender una etapa de inactivación de la actividad de nucleasa en la muestra. Alternativamente, los métodos de la invención no comprenden una etapa de inactivación de la actividad de nucleasa en la muestra. Si se realiza, la etapa de inactivación de la actividad de nucleasa tiene lugar tras la incubación etapa y antes de la etapa de determinar específicamente la ausencia o presencia de una molécula de ácido nucleico modificada (p.ej. por amplificación).

Una "muestra" en el contexto de la presente invención se define por incluir cualquier muestra en la que es deseable analizar la presencia de un microorganismo, como un hongo (p.ej. una levadura) o una bacteria, que expresa la actividad de modificación de ácido nucleico. Por lo tanto, la muestra puede comprender, consiste esencialmente en o consiste en una muestra clínica, como pueda ser una muestra de sangre. Los métodos de la invención se pueden aplicar en particular para la rápida determinación de cultivos de sangre negativos. Por tanto, la muestra puede comprender una muestra de cultivo de sangre de un paciente del que se sospecha que padece o en el que se está realizando una exploración en busca de una infección en el torrente sanguíneo. La muestra puede ser cualquier volumen adecuado, como entre 1 y 10 ml, preferentemente 1 ml de muestra de cultivo de sangre.

Alternativamente la muestra puede ser o comprender un sistema de ensayo *in vitro* por ejemplo. Las muestras pueden comprender, consistir esencialmente en o consistir en muestras de bebidas o comidas o preparaciones de las mismas o productos farmacéuticos o cosméticos como productos para la higiene personal, incluyendo champús, acondicionadores, hidratantes, etc., todos los cuales se analizan en cuanto a la contaminación microbiana por cuestión de rutina. La muestra puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en tejido o células y pueden comprender, consistir esencialmente en o consistir en un esputo o una muestra de sangre o una muestra de plaquetas, por ejemplo. Por otra parte, los métodos y kits de la invención pueden utilizarse para controlar la contaminación de las superficies, como por ejemplo en emplazamientos en los que se preparan comidas. Contaminación se indica por la presencia de actividad de modificación de ácido nucleico microbiana. La contaminación puede derivarse de cualquier fuente microbiana, en particular contaminación bacteriana o fúngica (p.ej. levadura). Asimismo, la invención es útil para controlar las condiciones del entorno, por ejemplo, los suministros de agua, las aguas residuales, los entornos marinos, etc. La invención es útil también para controlar el crecimiento bacteriano en procedimientos de fermentación y en muestras de aire en las que se puede evaluar el contenido en bacterias o esporas en hospitales, instalaciones industriales o en aplicaciones de biodefensa.

Los métodos de la invención presentan varias utilidades además de la exploración de muestras en cuanto a la ausencia o presencia de un microorganismo. Por consiguiente, en otro aspecto más, la invención proporciona el uso de un método tal como se describe en el presente documento para explorar la resistencia de un microorganismo a un agente dirigido contra el microorganismo. El método puede implicar etapas de exposición de la muestra que contiene el microorganismo de interés al agente y a continuación la realización de un método de la invención para determinar si el microorganismo es resistente o no. Si el microorganismo es resistente, se detectará la molécula de ácido nucleico modificada. Normalmente, dichos métodos se realizan utilizando muestras bien caracterizadas, como por ejemplo aislados de cultivos clínicos de un microorganismo de interés.

De manera similar, la invención proporciona el uso de un método tal como se describe en el presente documento para la identificación sistemática de agentes candidato que sean capaces de eliminar o prevenir el crecimiento de uno o más microorganismos. Dicho método puede implicar la exposición de la muestra que contiene el microorganismo al agente y la realización de un método de la invención a continuación. Si el agente es un agente de eliminación eficaz, no habrá detección de ácido nucleico modificado (o será reducida). Normalmente, dichos métodos se realizan utilizando muestras bien caracterizadas, como por ejemplo un aislado de cultivo clínico de un microorganismo de interés. Los métodos pueden realizarse en el transcurso de un experimento para determinar si el agente es capaz o no de evitar el crecimiento del microorganismo (incluso si no es capaz de eliminarlo). Puede haber una reacción paralela que se pone en marcha en ausencia del agente para determinar el crecimiento del microorganismo en ausencia del agente. Esto proporciona una comparación en cuanto a la eficacia del agente por lo que respecta a la actividad de inhibición de crecimiento.

Asimismo, la invención proporciona el uso del método, tal como se describe en el presente documento, para diagnosticar una infección o una enfermedad asociada con la presencia de un microorganismo en un sujeto. En este contexto la "muestra" será generalmente una muestra clínica. La muestra que se utilice dependerá de la afección que se esté analizando. Las muestras típicas que se pueden utilizar, pero sin pretender con ello limitar la invención, incluyen sangre completa, suero, plasma, plaquetas y muestras de orina, etc., extraídas de un paciente, siendo sobre todo preferente de un paciente humano. En una realización preferente, el análisis será un análisis *in vitro* que se lleva cabo sobre una muestra extraída de un sujeto. En otra realización más, los métodos de diagnóstico descritos pueden incluir adicionalmente, la etapa en la que se obtiene la muestra de un sujeto. Los métodos para obtener una muestra adecuada de un sujeto se conocen perfectamente en la técnica. Alternativamente, el método puede llevarse a cabo empezando con una muestra que ya ha sido aislada del paciente en un procedimiento por separado. Los métodos de diagnóstico se llevarán a cabo sobre todo de forma preferente en una muestra de un ser humano, pero el método de la invención puede tener utilidad diagnóstica para muchos animales.

Los métodos de diagnóstico de la invención pueden utilizarse para complementar cualquier otra técnica de diagnóstico ya disponible, potencialmente como un método para confirmar un diagnóstico inicial. Alternativamente, los métodos pueden utilizarse como método de diagnóstico preliminar por sí solo, ya que los métodos proporcionan un medio de diagnóstico rápido y conveniente. Asimismo, dada su sensibilidad inherente, los métodos de diagnóstico de la invención requieren únicamente una muestra mínima, de modo que se evita una cirugía invasiva innecesaria. Asimismo, es posible analizar una muestra grande, pero no concentrada, de forma eficaz de acuerdo con los métodos de la invención.

Por tanto, los métodos de la invención presentan múltiples aplicaciones más allá de la detección de organismos contaminantes en una muestra. La descripción que se ha proporcionado por lo que respecta a los distintos aspectos de la invención se aplica haciendo los cambios necesarios a otros aspectos de la invención y no se repiten para ser más concisos. Por ejemplo, pueden incorporarse controles adecuados para cada método de la invención.

En realizaciones específicas el microorganismo es un microorganismo patógeno, como pueda ser una bacteria patógena. La bacteria puede ser cualquier bacteria capaz de causar una infección o enfermedad en un sujeto, preferentemente, un sujeto humano. En una realización, la bacteria comprende o consiste esencialmente en o consiste en una cualquiera o más entre especies de Estafilococos, en particular *Staphylococcus aureus* y preferentemente cepas resistentes a meticilina, especies de Enterococos, especies de Streptococos, especies de Micobacterias, en particular *Mycobacterium tuberculosis*, especies Vibrio, en particular *Vibrio cholerae*, *Salmonella* y/o *Escherichia coli* etc. Las bacterias pueden comprender, consistir esencialmente o consistir en especies de Clostridium y en particular *C. difficile* en ciertas realizaciones. *C. difficile* es la causa principal de la diarrea y colitis asociada antibióticos, una infección intestinal asociada a los cuidados sanitarios que afecta sobre todo a los pacientes ancianos con otras enfermedades subyacentes. Pueden detectarse especies de Candida como *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata*. Pueden detectarse especies de criptococos como *C. neoformans*. Pueden detectarse Fungaemia como Candidaemia (ausencia o presencia) aplicando la invención.

En ciertas realizaciones, de acuerdo con estos otros aspectos de la invención, la molécula que se analiza en el método (ya sea en cuanto a su resistencia o su capacidad para tratar una infección o toxicidad para las células) es un compuesto antimicrobiano. En los métodos de identificación sistemática de un compuesto, es posible analizar cualquier molécula. Entre los ejemplos se incluyen agentes antimicrobianos, moléculas de ácido nucleico, incluyendo moléculas de ARNsi (ARNds) y moléculas no codificantes, moléculas pequeñas, anticuerpos y todos sus derivados incluyendo fragmentos Fab, fragmentos de región variable y anticuerpos de único dominio, como por ejemplo, siempre y cuando retengan su afinidad de unión, etc. El método se puede llevar a cabo en un contexto de alta producción para identificar un gran número de moléculas en un breve período de tiempo.

El agente antimicrobiano, en una realización, puede tomarse de los dos tipos principales de agentes antimicrobianos, antibióticos (sustancias naturales producidas por microorganismos) y agentes quimioterapéuticos (sintetizados químicamente) o pueden ser un híbrido de dichos dos antibióticos semi-sintéticos (un antibiótico producido naturalmente modificado posteriormente) o antibióticos sintéticos (versiones sintetizadas de antibióticos naturales).

Se pueden analizar los agentes antimicrobianos candidatos adecuados, tras un resultado positivo en los métodos de la invención por lo que respecta a la capacidad para eliminar o impedir el crecimiento de una bacteria o una célula bacteriana u otro microorganismo adecuado, en cuanto al menos una o más de las siguientes propiedades:

- (1) el agente deberá ser no tóxico para el sujeto sin efectos secundarios adversos,
- (2) el agente deberá ser no alergénico para el sujeto,
- (3) el agente no deberá eliminar la flora natural del sujeto,
- (4) el agente deberá ser estable,
- (5) el agente deberá ser preferentemente económico y asequible/fácil de fabricar; y
- (6) el agente deberá ser suficientemente potente para que no se desarrolle la resistencia del patógeno (en ningún grado apreciable)

Esta característica deberá analizarse de acuerdo con los métodos que se han descrito.

En una realización, puede analizarse una combinación de varios agentes antimicrobianos adecuados en cuanto a su capacidad para tratar una infección y/o en cuanto a su resistencia.

Los antibióticos o derivados de los mismos que se pueden analizar en cuanto a su resistencia, y quizá también en cuanto a su nueva capacidad para tratar ciertas infecciones pueden seleccionarse de los siguientes grupos, que se proporcionan a modo de ejemplo y no como limitación; betalactamasas como penicilina, en particular penicilina G o V, y cefalosporinas como cefalothin, penicillinas semi-sintéticas como ampicilina, meticilina y amoxicilina, ácido clavulánico preferentemente utilizado conjuntamente con una preparación de penicilina semi-sintética (como clavamox o augmentine, por ejemplo), monobactamas como aztreonam, carboxipenems como imipenem, aminoglucosidos como estreptomina, kanamicina, tobramicina y gentamicina, glucopéptidos como vancomicina, lincomicina y clindamicina, macrólidos como eritromicina y oleandomicina, polipéptidos como polimixina y bacitracina, polienos como amfotericina y nistatina, rifamicinas como rifampicina, tetraciclinas como tetraciclina, tetraciclina

semi-sintéticas como doxiciclina, clorhidrato de tetraciclina, cloramfenicol, quinolonas como ácido nalidíxico y fluoroquinolona e inhibidores competitivos, como sulfonamidas, por ejemplo gantrisin y trimetoprim. Se pueden utilizar también ceftriaxona y/o nitrofurazona.

5 Asimismo, la invención proporciona también el uso de un método, tal como se describe en el presente documento para detectar la presencia de contaminación de microorganismos en una muestra que contiene plaquetas. En ciertos aspectos, los métodos pueden incorporar sub-etapas de:

- 10 (i) lisis de las plaquetas en condiciones que dejen intacto el microorganismo. Esto permite principalmente la concentración selectiva de microorganismos antes de analizar la presencia de actividad de modificación de ácido nucleico. Por tanto, la actividad de modificación de ácido nucleico que proporcionan las células de mamífero puede eliminarse antes del análisis
- (ii) concentración de los microorganismos (por ejemplo por centrifugación para producir un aglomerado que contienen células bacterianas)
- 15 (iii) lisis de los microorganismos o un tratamiento para aumentar la permeabilidad de los microorganismos para liberar la actividad de modificación de ácido nucleico.

La invención se refiere también a kits útiles para llevar a cabo los métodos de la invención. Por tanto, se proporciona un kit para llevar a cabo un método tal como se describe en el presente documento que comprende:

- 20 (a) al menos una molécula de ácido nucleico que actúa como un sustrato para actividad de modificación de ácido nucleico del microorganismo en la muestra, donde la al menos una molécula de ácido nucleico es al menos parcialmente de doble cadena y comprende restos uracilo en la cadena complementaria, caracterizado por que la molécula de ácido nucleico se modifica para protegerla de la actividad de nucleasa
- 25 (b) al menos una molécula de ácido nucleico de control positivo interno (IPC) que comprende sitios de unión a cebador idénticos a la molécula de ácido nucleico de modo que haya una competencia por la unión de cebador en una reacción de amplificación de ácido nucleico que contiene tanto la molécula de ácido nucleico como el IPC.

30 Los kits pueden incorporar cualquiera de los componentes necesarios para llevar a cabo los métodos de la invención. Por consiguiente, toda la explicación de los métodos de la invención se aplica haciendo los cambios necesarios.

35 En el contexto de la presente invención, se pre-modifica la molécula de ácido nucleico para protegerla de la actividad de nucleasa.

En algunas realizaciones, el kit comprende además una sonda de ácido nucleico que se une a una secuencia de sonda diana dentro de la (cadena codificante de la) molécula de ácido nucleico. El kit puede comprender además otra sonda de ácido nucleico que se une a una secuencia de sonda diana dentro de la molécula de ácido nucleico IPC. En ciertas realizaciones, la sonda de ácido nucleico no se une a la molécula de ácido nucleico IPC y la sonda de ácido nucleico adicional no se une a la molécula de ácido nucleico. La sonda de ácido nucleico y/o la sonda de ácido nucleico adicional pueden estar marcadas. En realizaciones específicas, la sonda de ácido nucleico y la sonda de ácido nucleico adicional están marcadas de forma diferente. Por ejemplo, pueden estar marcadas con fluoróforos que tienen diferentes longitudes de ondas de máxima emisión. Las personas especializadas en la materia podrán seleccionar fácilmente los pares de marcadores adecuados, por ejemplo, pueden utilizarse FAM y Texas Red como marcadores diferentes.

En otras realizaciones, la cadena complementaria de la molécula de ácido nucleico comprende una modificación en el extremo 3' para evitar la extensión. Se entiende por "extensión" la adición de otros nucleótidos. Puede emplearse cualquier modificación adecuada. En realizaciones específicas, la modificación es o comprende la incorporación de un nucleótido no extensible. Puede emplearse cualquier nucleótido adecuado no extensible. Por ejemplo, el nucleótido no extensible puede ser o comprender un didesoxi nucleótido trifosfato (ddNTP), como didesoxi Citidina.

En otras realizaciones, el IPC se modifica para protegerlo de la actividad de nucleasa. En el contexto de la presente invención, se pre-modifica el IPC para protegerlo de la actividad de nucleasa. En el presente documento se explican modificaciones adecuadas con mayor detalle y se pueden seleccionar entre incorporación de metilación, protección de los extremos 3' y/o 5', incorporación de nucleótidos sintéticos. Los nucleótidos sintéticos pueden ser o comprender nucleótidos fosforotioato y/o nucleótidos de ácidos nucleicos cerrados. Preferentemente, los nucleótidos sintéticos son nucleótidos fosforotioato. Si se modifican ambas moléculas, preferentemente, se modifican de la misma manera o de manera similar, de tal modo que la resistencia a nucleasa sea comparable. Esto permite que IPC realice una función de comparación muy útil para determinar el impacto de la actividad de nucleasa en la molécula sustrato. En otras realizaciones, el kit comprende además un reactivo de pH alto. El reactivo de pH alto puede ser o comprender NaOH o Na₂CO₃. En realizaciones específicas, la concentración del reactivo de pH alto es en torno a 5 mM o más. El kit puede comprender además un agente de disminución del pH. El reactivo que disminuye el pH pueden comprender un tampón o un ácido, como un tampón Tris-HCl (p.ej. pH 7,2 o 8). Los kits pueden incorporar un vehículo adecuado en el que tiene lugar las reacciones. Ventajosamente, dicho

vehículo puede comprender una placa de varios pocillos, como por ejemplo, una placa de 48 o 96 pocillos. Dicho vehículo permite llevar a cabo los métodos de detección en volúmenes relativamente reducidos, facilitando así su aumento a escala y reduciendo al mínimo el volumen de muestra requerido.

Los kits llevan incorporados normalmente instrucciones adecuadas. Dichas instrucciones permiten llevar a cabo los métodos de la invención de forma fiable utilizando los kits de la invención.

Descripción de las figuras

Figura 1. Detección de microorganismos ETGA mejorada al aumentar la concentración de dNTP y sustrato. En cada uno de los gráficos se muestra el valor Ct obtenido para la detección del sustrato diana ETGA (canal FAM) en experimentos de detección ETGA para una gama de microorganismos pertinentes. En todos los casos, el control del cultivo de sangre negativo fue >39,9 unidades Ct, los controles negativos reactivos negativos fueron >40 unidades Ct y los controles reactivos positivos fueron <20 unidades Ct.

Figura 2. Detección de Molécula IPC en una muestra de cultivo de sangre preparada con la adición de ADN IPC solamente en la mezcla de lisis (ML) microbiana o la mezcla madre (MM) de PCR en comparación con una muestra de control negativa. Se añadió una cantidad de ADN IPC a la ML para proporcionar el mismo valor Ct que cuando se añadió a la MM. Los datos demuestran que existe una pérdida completa en la detección de la molécula IPC (en una reacción de PCR de 40 ciclos) y en la muestra de cultivo de sangre negativa en comparación con el control negativo (sin sangre) cuando se añade a la ML y no cuando se añade a la MM.

Figura 3. Aumento del fondo causado por la adición de IPC a la ML en lugar de MM. Los datos del gráfico presentan el valor Ct en el canal FAM (sustrato ETGA de detección) frente al recuento viable total (RVT) obtenido para muestras de cultivo de sangre utilizando un protocolo en el que se añadió IPC a la ML (rombos) y MM (cuadrados). La cantidad de IPC añadida a la ML fue equivalente a 50 x más que en MM para cada reacción de PCR. El fondo medido fue mayor cuando se utilizó 50 x la concentración de PC normal en la ML en comparación con el uso de la concentración normal de IPC en la MM. Se midieron los niveles del fondo a través de un procedimiento de ensayo ETGA con IPC en la MM (línea discontinua azul) o ML (línea discontinua verde) en las muestras de cultivo de sangre que no contienen ninguna bacteria añadida.

Figura 4. Reducción del fondo de ensayo ETGA y sensibilidad de ensayo mejorada. Los gráficos presentan la fluorescencia detectada en el canal FAM de la reacción de qPCR a partir de los ensayos ETGA llevados a cabo en una serie en dilución de *C. albicans* en cultivos de sangre. La reacción de qPCR contenía sonda marcada con FAM, capaz de detectar el sustrato ETGA modificado, de manera que la amplificación indica la presencia de un microorganismo. La Fig. 4a presenta los resultados de un grupo de ensayos ETGA que se llevan a cabo utilizando un sustrato normal y oligonucleótidos IPC. La Fig. 4b presenta los resultados obtenidos a partir de las mismas muestras exactamente utilizando sustrato PTO e IPC. Adviértase que el fondo es mucho más bajo en la Fig. 4b, y que es posible detectar un menor número de células de levadura en el ensayo.

Figura 5. Mejora de la detección de levadura mediante el uso de oligonucleótidos PTO. En el gráfico se muestra la sensibilidad de detección de levadura (*C. albicans*) en un ensayo ETGA utilizando oligonucleótidos normales en comparación con el ensayo ETGA utilizando oligonucleótidos PTO.

Figura 6. Detección de microorganismos menos robustos por ETGA. En el gráfico se muestra como la detección de una cepa delicada de *H. influenzae* se ve afectada por el procedimiento de ensayo ETGA. Se añadió el cultivo puro de *S. aureus* y *H. influenzae* (10^5 ufc) al protocolo de ensayo general (10 ml) en diferentes fases. Los datos muestran que la detección se redujo significativamente cuando se añadieron los microorganismos antes de la etapa de resuspensión de NaOH.

Figura 7. Control de exposición a NaOH para mejorar la detección de *H. influenzae*. Los gráficos muestran el efecto del control de la cantidad de tiempo que se expone la muestra de cultivo que contiene 10^5 ufc de *H. influenzae* a NaOH en el procedimiento de ensayo ETGA en comparación con el procedimiento normal. Se llevó a cabo el protocolo general para 10 ml en una suspensión de *H. influenzae* en caldo de cultivo BacT/ALERT sin sangre; tras la resuspensión en NaOH y la incubación durante 0, 0,5, 2,5 y 5 min, se añadió 1 ml de 200mM Tris-HCl [pH 7,2] antes de la centrifugación.

Figura 8. Mejora del protocolo EGTA de 1 ml ETGA con una etapa de disminución del pH. Se analizaron muestras de cultivo de sangre que contiene A) ninguna adición, B) *H. influenzae* (10^5 ufc), C) *H. influenzae* (10^4 ufc), D) *S. aureus* (10^5 ufc), E) *S. aureus* (10^4 ufc) con el procedimiento original de 1 ml (sobre la base de la suspensión en 1 ml NaOH) y un procedimiento que contenía una etapa de disminución del pH (resuspensión en 0,75 ml NaOH, incubación de 5 min, 0,5 ml de reactivo C). El valor Ct más bajo indica que se detectaron más fuertemente los microorganismos.

Figura 9A-C. Resultados de Cognitor Minus para muestras de caldo de cultivo en sangre con adición de *E. coli* y control positivo (Pol (+)). Se presentan los datos para muestras Cognitor Minus analizadas en los momentos 0, 2 y 20 horas con y sin la etapa a 95 °C durante (A) experimento 2, (B) experimento 3 y (C) experimento 4. Los

datos para el experimento 1 no se muestran ya que se analizaron las muestras solamente por qPCR en el momento 0 horas.

Figura 10, valores Ct para muestras de caldo de cultivo de sangre con adición de *E. coli* (n = 4) en gráfico frente al log de valores de ufc total transformadas. Se trazan en gráfico las líneas de tendencia para cada punto temporal (0 horas, 2 horas y 20 horas) dentro de los grupos de datos 95 °C (+) o 95 °C (-). No se muestran aquí los datos de control positivo.

Figura 11A-B. Valores Ct para muestras de caldo de cultivo con adición de *E. coli* y controles positivos (Pol+ve) en el momento 0, 2 y 20 horas para muestras a 95 °C (+) y 95 °C (-) procesadas utilizando (A) mezcla de lisis de oligonucleótidos sin modificar o (B) mezcla de lisis de oligonucleótido de fosforotioato. Los datos mostrados son de un solo experimento (n = 1)

Figura 12A-E. Resultados de Cognitor Minus para muestras de cultivo con adición de (A) *E. coli*, (B) *S. aureus* y (C) *C. albicans*, (D) controles positivos (PC) y (E) controles sin adición (NSC). Se trazan en gráfico los valores Ct de los tres experimentos replicados (n = 3) frente a la duración del almacenamiento de muestra. Se trazan las líneas de tendencia para cada grupo de muestras: PTO 95 °C (+); PTO 95 °C (-); UMO 95 °C (+); y UMO 95 °C (-). Solamente se muestran los datos de la ML UMO para las muestras NSC ya que la mayoría de las muestras de ML de PTO produjeron "sin Ct" debido a una amplificación insuficiente.

Sección experimental

La invención quedará comprendida en relación con los siguientes ejemplos no exhaustivos:

Ejemplo 1 – Modificaciones de ensayo ETGA

Métodos – Protocolo general

Para cada muestra se mezcló 1 ml de cultivo de sangre (añadiendo o sin añadir microorganismos, con o sin sangre) con 0,333 ml de reactivo A (5 % p/v de saponina, 5 % p/v Tween 20, 8,5 g/l cloruro sódico) en un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Se centrifugó cada muestra durante 3 min a 7300 g, a continuación, se vertió el sobrenadante para desecharlo y se golpeó el borde del tubo sobre un papel de tejido de laboratorio limpio. A continuación, se resuspendió cada uno de los aglomerados en 0,75 ml de Reactivo B (5 mM NaOH) y se incubó durante 5 min, a continuación, se disminuyó el pH añadiendo 0,5 ml de Reactivo C (1,32 g/l sulfato de amonio, 0,49 g/l sulfato de magnesio heptahidratado, 0,75 g/l de cloruro de potasio, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0). Tras la incubación, se volvieron a centrifugar las muestras y se eliminó el sobrenadante vertiéndolo para desecharlo. Se resuspendió el resto del aglomerado en 0,5 ml de Reactivo C e inmediatamente después se transfirió a un tubo nuevo que contenía una mezcla de perlas de vidrio (perlas de vidrio de 0,1 mm y 0,5 mm; suministradas por Cambio cat. 13118-400, y 13116-400, respectivamente). Se llevó a cabo una posterior centrifugación para aglomerar las células suspendidas con las perlas de vidrio y se volvió a eliminar y descartar el sobrenadante.

Se añadieron 50 µl de mezcla de lisis microbiana que contenía sustrato ETGA (ML; que contenía los reactivos L1, L2, L3 en una proporción de 7:2:1, véase Tabla 1) a las perlas de vidrio y se colocó en un disruptor de células Genie (Scientific Industries, Inc.), durante 6 min a 2800 rpm para lisar las células microbianas. Después de la disrupción, se colocaron las muestras en un bloque calefactor a 37 °C y se incubó durante 20 minutos, a continuación, se transfirió a otro bloque calefactor a 95 °C y se incubó durante 5 minutos. Tras la incubación, de enfriaron las muestras a temperatura ambiente al mismo tiempo que se preparaban los reactivos de PCR.

Después del enfriamiento, se añadieron 3 µl de sobrenadante de muestra a 27 µl de mezcla madre de PCR (MM que contenía una mezcla madre de PCR de polimerasa Taq general (Roche – cat. 04902343001), cebadores para el sustrato ETGA, control positivo interno – IPC - DNA, sonda marcada con FAM para el sustrato ETGA sustrato, sonda marcada con rojo Texas Red para el IPC, y (1,2 µl) enzima UDG (Bioline – cat. no BIO-27044)) en un tubo de PCR SmartCycler (Cepheid). Se colocaron las muestras en el SmartCycler PCR y se sometieron a las siguientes condiciones de reacción; 1 ciclo; 40 °C 10 min, 50 °C 10 min, 95 °C 5 min 40-50 ciclos: 95 °C 5 s, 61 °C 20 s, 72 °C 20 s.

Se controló la amplificación durante toda la reacción en tiempo real en los canales de detección/excitación rojo Texas y FAM del SmartCycler.

Tabla 1. Componentes de mezcla de lisis

L1	Albúmina de suero bovino Triton X100 Tween 20	1,5 % p/v 1,5 % v/v 1,5 % v/v
L2	Sulfato de amonio Sulfato de magnesio heptahidratado Cloruro de potasio Tris-HCl, pH 8,0 dNTP (A,G,C,T)	2,64 g/l 0,98 g/l 1,5 g/l 40 mM 500 µM

L3	Sustrato ETGA Tris-HCl, pH 8,5 KCl EDTA	0,001 μ M - 0,01 μ M 20 mM 10 mM 10 μ M
----	--	--

Las secuencias de los componentes de la reacción de PCR son las siguientes:

Sonda marcada con Fam (una baliza molecular):

FAM-cgc tgc gac cga ccg ata age tag aac agg cag cg-BHQ1 (SEQ ID NO: 1)

5 Sonda marcada con rojo Texas (una sonda molecular):

TxR- cgc gat cag cag gcc aca cgt taa aga cat cgc g-BHQ2 (SEQ ID NO: 2)

IPC

gcc gat atc gga caa cgg ccg aac tgg gaa ggc gag atc agc agg

cca cac gtt aaa gac aga gag aca aca acg ctg gcc gtt tgt cac

cga cgc cta

(SEQ ID NO: 3)

10

Cebador directo

ccg ata tcg gac aac ggc cga act gg (SEQ ID NO: 4)

Cebador inverso

tag gcg tcg gtg aca aac ggc cag c (SEQ ID NO: 5)

15 Los componentes de sustrato son;

AS

uagggcgucggugacaaacggccagcguuguugucucu-DDC (3' terminal es didesoxi-C) (SEQ ID NO: 6)

S1

gccgatatcggacaacggccgaactgggaaggcgagactgaccgaccgataagctagaac

20 agagagacaacaac (SEQ ID NO: 7)

Resultados y explicación 1 – Aumento de la concentración del sustrato

25 Se modificó el protocolo general aumentando la cantidad de sustrato ETGA en la ML 10 veces (de 0,001 μ M a 0,01 μ M) y aumentando la cantidad de dNTP 2 veces más (de 50 μ M a 100 μ M).

La mayor cantidad de sustrato y dNTP permitió mejorar la detección de *C. albicans* (Fig. 1a), *E. coli* (Fig. 1b), *S. aureus* (Fig. 1c), *E. faecalis* (Fig. 1d), *P. aeruginosa* (Fig. 1e) o 2 cepas diferentes de *H. influenzae* (incluyendo una cepa clínica delicada) (Fig. 1f y Fig. 1g). Los datos de muestran en la Figura 1.

30

Resultados y explicación 2 – Mejorar de la sensibilidad del ensayo ETGA y disminución del fondo por modificación de componentes oligo

Evidencia de la actividad de nucleasa

35

Se pensó que la adición de la molécula IPC al mismo tiempo que la molécula del sustrato ETGA suponía una mejora del protocolo original. Si se añadiera IPC en la ML, el IPC se sometería exactamente a las mismas condiciones de ensayo que el sustrato ETGA y por tanto proporcionaría un control de ensayo más preciso. Por ejemplo, las condiciones que pueden afectar negativamente a la molécula sustrato, como la actividad de nucleasa que podría digerir el sustrato, también afectarían al IPC. Si se añade el IPC más adelante (en la MM por ejemplo) no estaría sujeto a las mismas condiciones y es posible que tuviera como resultado una interpretación falsa de los datos. Si se añade IPC al mismo tiempo que el sustrato ETGA, se mediría la magnitud del efecto de las condiciones de ensayo en las matrices de ácido nucleico.

40

45 Para ilustrarlo, la Figura 2 demuestra que las condiciones de ensayo podrían tener un impacto negativo en la detección del sustrato ETGA; al añadir cantidades comparables de IPC ADN en la ML en lugar de la MM, se observó que se producía realmente una pérdida de la capacidad para detectar el IPC en muestras de cultivo de sangre en comparación con las muestras de control negativo (sin sangre). No se observó la misma pérdida de detección cuando se utilizó IPC en MM. La pérdida del IPC cuando se añadió a ML se atribuyó a nucleasas que pueden haber estado activas durante la etapa de incubación a 37 °C del protocolo ETGA. Es muy probable que las nucleasas se originaran de la muestra de sangre.

50

Claramente, si se perdió la molécula de IPC durante el ensayo, la molécula sustrato de ETGA también podría haberse perdido. La pérdida de la molécula de sustrato ETGA en una muestra de cultivo de sangre positivo de tendría como resultado evidentemente una menor sensibilidad de detección o conduciría posiblemente a un resultado falso negativo, pero al añadir IPC a la ML, sería posible determinar (y tal vez cuantificar) la actividad de nucleasa sospechada e interpretar los resultados, en consecuencia. Las muestras en las que se observó una caída de la cantidad de IPC (tal como se observa por una elevación del valor Ct en comparación con el control de reactivo negativo) podrían registrarse como “sin resolver” en lugar de “negativo”, indicando así que la muestra estuvo sometida a la actividad de nucleasa y, de hecho podría ser positiva.

La adición de una molécula IPC a la ML podría mejorar el ensayo ETGA. Sin embargo, dependiendo de lo común que fuera la actividad de nucleasa en las muestras clínicas, esto podría elevar el número global de resultados sin resolver haciendo que el ensayo fuera menos atractivo para los posibles usuarios debido al alto índice de fallos percibidos (y por tanto, lo que explica por qué IPC se añadió originalmente a la MM en lugar de la ML).

Los ensayos demostraron que se pudo añadir la molécula IPC al ensayo en la ML y detectarse todavía en presencia de la presunta actividad de nucleasa al aumentar la concentración 20-50 veces más, si bien se detectaron altos niveles de fondo incluso en cultivos negativos de muestras de sangre (Figura 3). En este caso, el fondo puede haberse causado por la presencia de oligonucleótidos parcialmente digeridos que interfieren en la detección de la reacción de PCR. Evidentemente, los altos niveles de fondo pueden reducir la sensibilidad del ensayo, especialmente, cuando se trata de detectar números muy reducidos de bacterias.

Si bien aumentar la cantidad de IPC en la ML puede considerarse una solución al problema de la pérdida de moléculas de ADN diana debido a la actividad de nucleasa, tan sólo puede enmascarar la cuestión y, tal como se ha mencionado, puede contribuir a un mayor nivel de fondo. El aumento de la cantidad de la molécula IPC en las muestras en las que la actividad contaminante de nucleasa era baja podría reducir la sensibilidad del ensayo aumentando la competencia por los componentes de reacción en la PCR de detección reduciendo así la capacidad del ensayo para detectar el sustrato diana. Se requirió una mejor solución para el problema de nucleasa parental.

Protección de sustrato ETGA e IPC de la actividad de nucleasa

Sobre la base de la suposición de que la molécula IPC podría incluirse en la ML, y que la actividad de nucleasa podría estar teniendo un efecto perjudicial en el ensayo ETGA, se realizó una tentativa para proteger las dianas de ADN (IPC y sustrato ETGA) de la degradación de nucleasa. ADN se puede proteger de la actividad de nucleasa a través de diversos medios, por modificación (p.ej. metilación, modificación final) o utilizando nucleótidos no normales, durante la síntesis de los oligonucleótidos sintéticos (p.ej., ácidos nucleicos cerrados, fosforotioato nucleótidos).

Se ha observado que el ensayo ETGA es menos sensible a levaduras que a bacterias. La razón de ello es desconocida, pero es probable que se deba a una combinación de razones, como pueda ser las diferencias en la actividad *in vitro* y la cantidad absoluta de las enzimas fúngicas en las células en comparación con las enzimas bacterianas o la sensibilidad a los inhibidores.

Demonstración del uso de oligonucleótidos PTO en el ensayo ETGA

El sustrato ETGA normal y los oligonucleótidos IPC se reemplazaron por oligonucleótidos fosforotioato (PTO) con la misma secuencia de nucleótidos en ML en el protocolo general. Se añadió el sustrato ETGA modificado con PTO a ML a 0,01 μ M se añadió IPC modificado con PTO en una cantidad suficiente para conseguir un valor Ct de 37-41 en una reacción de PCR de 50 ciclos.

Se analizó una serie en dilución de células de levadura (105, 104, 103 y 0 ufc/ml) en cultivo de sangre con un protocolo de ensayo ETGA original con oligonucleótidos normales y con oligonucleótidos modificados con PTO. Ambos ensayos se pusieron en marcha en los mismos cultivos de sangre con adición exactamente (Figura 4).

Los datos demostraron que el ensayo ETGA con oligonucleótidos normales rindió resultados que incluyeron altos niveles de fondo que pueden ocluir la detección de niveles reducidos de células de levadura, mientras que los resultados obtenidos con oligonucleótidos PTO modificados no adolecieron del mismo efecto. De hecho, los resultados demostraron que los oligonucleótidos PTO redujeron el fondo global a niveles no detectables en las mismas muestras de cultivo, permitiendo así reducir el nivel umbral en la reacción de qPCR y aumentando potencialmente la sensibilidad del ensayo ETGA. Debe señalarse que cuando se utilizan oligonucleótidos normales, el nivel umbral se estableció en 50 unidades debido a la cantidad de fluorescencia de fondo detectada, pero cuando se utilizan oligonucleótidos PTO el nivel umbral podría reducirse a 10 unidades o menos, si se requiere. Los oligonucleótidos PTO se detectaron más tarde en la reacción de PCR que, cuando se utilizaron oligonucleótidos normales, pero la reacción qPCR PTO pudo ponerse en marcha también durante más tiempo (50 ciclos en lugar de 40) ya que el nivel del fondo fue bajo. El resultado de esta reducción en el fondo significó que se pudieran detectar niveles más bajos de carga microbiana (de hasta 10^3 ufc/ml en este ejemplo) con oligonucleótidos de PTO que no se pudieron detectar previamente utilizando oligonucleótidos normales.

En otro experimento más, se emplearon las versiones de PTO resistentes a nucleasa de las moléculas sustrato (MWG-Eurofins) en un ensayo ETGA. Se utilizó una dilución en serie de un cultivo de toda la noche de levadura para la adición artificial a un cultivo de sangre (una muestra de cultivo de sangre se extendió después sobre SDA para confirmar el recuento viable total). A continuación, se analizó cada suspensión con un ensayo ETGA utilizando oligonucleótidos normales y un ensayo ETGA utilizando oligonucleótidos PTO. La sensibilidad de detección de la levadura mejoró mucho más con el uso de PTO. Debe advertirse que los resultados con PTO se trazan en los diferentes gráficos en el eje de las Y para el análisis normal, debido a los diferentes números de ciclos de PCR. Las líneas discontinuas indican el valor Ct del control negativo (el cultivo de sangre sin microorganismos). Los datos de este experimento demuestran que se demostró que el sustrato PTO mejora la detección de levaduras (Figura 5) 1000 veces más y, además, no presentó el efecto de elevar los niveles de fondo. El hallazgo de que se pudiera utilizar sustrato PTO para aumentar la sensibilidad de ensayo ETGA fue muy significativo.

Ejemplo 2 – Resultados del ensayo de reducción de falsos negativos en el ensayo ETGA

Protocolos generales

Para muestra de 10 ml

Para cada muestra, se mezclaron 10 ml de cultivo de sangre (añadiendo o sin añadir microorganismos, con o sin sangre) con 3,33 ml de Reactivo A (5 % p/v Saponina, 5 % p/v Tween 20, 8,5 g/l de cloruro sódico) en un tubo Falcon de 15 ml y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Se centrifugó cada una de las muestras durante 8 min a 3600 g, a continuación, se vertió el sobrenadante para desecharlo y se golpeó el borde del tubo sobre un papel de tejido de laboratorio limpio. A continuación, se resuspendió cada uno de los aglomerados en 5 ml de Reactivo B (5 mM NaOH) y se incubó durante 5 min. Tras la incubación, se volvieron a centrifugar las muestras y se eliminó el sobrenadante vertiéndolo para desecharlo. Se resuspendió el resto del aglomerado en 1 ml de Reactivo C (1,32 g/l sulfato de amonio, 0,49 g/l sulfato de magnesio heptahidratado, 0,75 g/l cloruro de potasio, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0) y se transfirió inmediatamente a un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml que contenía una mezcla de perlas de vidrio. Se llevó a cabo una posterior centrifugación durante 3 minutos a 7300 x g para aglomerar las células suspendidas con las perlas de vidrio y se volvió a eliminar y descartar el sobrenadante.

Se añadieron 50 µl de mezcla de lisis microbiana (ML; que contenía sustrato ETGA véase Tabla 1 en el Ejemplo 1 anterior) a las perlas de vidrio y se colocó en un disruptor Genie, durante 6 min a 2800 rpm para lisar las células microbianas. Después de la disrupción, se colocaron las muestras en un bloque calefactor a 37 °C y se incubó durante 20 minutos, a continuación, se transfirió a otro bloque calefactor a 95 °C y se incubó durante 5 minutos. Tras la incubación, se enfriaron las muestras a temperatura ambiente al mismo tiempo que se preparaban los reactivos de PCR.

Después del enfriamiento, se añadieron 3 µl de sobrenadante de muestra a 27 µl de mezcla madre de PCR (MM que contenía una mezcla madre de PCR de polimerasa Taq general, cebadores para el sustrato ETGA, control positivo interno – IPC – ADN, sonda marcada con FAM para el sustrato ETGA sustrato, sonda marcada con rojo Texas Red para el IPC, y enzima UDG, en un tubo de PCR SmartCycler (Cepheid). Se colocaron las muestras en el SmartCycler PCR y se sometieron a las siguientes condiciones de reacción; 1 ciclo; 40 °C 10 min, 50 °C 10 min, 95 °C 5 min 40-50 ciclos: 95 °C 5 s, 61 °C 20 s, 72 °C 20 s. se controló la amplificación durante toda la reacción en tiempo real en los canales de detección/excitación rojo Texas y FAM del SmartCycler.

Para muestras de 1 ml

Para cada muestra, se mezcló 1 ml de cultivo de sangre con 0,333 ml de Reactivo A (5 % p/v Saponina, 5 % p/v Tween 20, 8,5 g/l de cloruro sódico) en un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Se centrifugó cada una de las muestras durante 3 min a 3700 g, a continuación, se vertió el sobrenadante para desecharlo y se golpeó el borde del tubo sobre un papel de tejido de laboratorio limpio. A continuación, se resuspendió cada uno de los aglomerados en 1 ml de Reactivo B (5 mM NaOH) y se incubó durante 5 min. Tras la incubación, se volvieron a centrifugar las muestras y se eliminó el sobrenadante vertiéndolo para desecharlo. Se resuspendió el resto del aglomerado en 0,5 ml de Reactivo C (1,32 g/l sulfato de amonio, 0,49 g/l sulfato de magnesio heptahidratado, 0,75 g/l cloruro de potasio, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0) y se transfirió inmediatamente a un nuevo tubo que contenía una mezcla de perlas de vidrio. Se llevó a cabo una posterior centrifugación para aglomerar las células suspendidas con las perlas de vidrio y se volvió a eliminar y descartar el sobrenadante.

A continuación, se llevó a cabo la lisis microbiana y la detección por PCR tal como se ha descrito anteriormente para el protocolo con 10 ml.

Los componentes de reacción de PCR y los sustratos son como en el Ejemplo 1 anterior.

Antecedentes

Un solo aislado microbiano clínico único, identificado como *Haemophilus influenzae* dio un resultado de falso negativo en el ensayo ETGA durante una evaluación de rendimiento clínico. Se detectó el microorganismo por cultivo automático normal de cultivo de sangre en medios de cultivo de sangre Biomerieux Bact/ALERT.

Cuando se añadió una adición de células microbianas cultivadas en diferentes fases del ensayo ETGA, se observó que la cepa de *H. influenzae* se detectó solamente cuando se añadió después de la etapa de lavado con NaOH (Reactivo B). Se observó que se podían detectar otras especies bacterianas más robustas cuando se añadieron al ensayo desde el inicio (véase Figura 6). Los resultados indicaron que la cepa de *H. influenzae* fue particularmente sensible para la etapa de lavado con NaOH (o una combinación de las etapas hasta la etapa de lavado con NaOH o incluyéndola).

Este resultado no fue típico para todas las cepas de *H. influenzae* y hasta la fecha se ha asociado solamente con esta cepa. Se utilizó el aislado como organismo "débil" modelo para desarrollar un nuevo procedimiento ETGA que fue mejor en la detección de microorganismos menos robustos.

La incubación en NaOH es una etapa esencial en el protocolo ETGA que debe llevarse a cabo para inactivar las polimerasas libres, reducir los contaminantes y reducir el fondo. Por tanto se realizaron tentativas para reducir el efecto perjudicial de NaOH sin afectar perjudicialmente a los resultados de ensayo. La concentración de NaOH no pudo reducirse ya que no eliminó suficiente material contaminante, lo que lleva al fracaso del ensayo.

Resultados – Reducción de exposición de la muestra a NaOH

En el protocolo general de 10 ml, debe advertirse que el tiempo tomado para centrifugar la muestra aumenta el tiempo total que se expone la muestra a NaOH en 8 min. La reducción del período de tiempo podría conseguirse y controlarse mediante la neutralización del álcali, o al menos la disminución del pH de la muestra tras un período de incubación óptimo añadiendo ml de tampón Tris-HCl 200 mM, pH 7,2 al NaOH.

Se llevó a cabo el protocolo general para muestras de 10 ml sobre una suspensión de *H. influenzae* en el medio de cultivo extraído de una botella BacT/ALERT SA (sin añadir sangre). Los resultados demuestran que la neutralización (o la reducción significativa del pH) del NaOH conduce a valores Ct inferiores (de muestras idénticas) y por lo tanto una mejor sensibilidad de detección (véase Figura 7).

Los datos indican también que cuanto más corto es el período de incubación mejor, pero una vez más, tiempos de incubación cortos no permitieron una eliminación suficiente de los contaminantes como para permitir una amplificación por PCR fiable, lo que condujo al fracaso de la reacción o a niveles de fondo altos y resultados de falsos positivos.

La disminución del pH de la muestra tras el tratamiento de NaOH pudo conseguirse potencialmente añadiendo cualquier tampón o ácido adecuado. El método preferente para disminuir el pH sería el uso del reactivo C (un tampón Tris-HCl, pH 8) ya que el reactivo se utiliza ya en el ensayo.

Resultados – Realización preferente, 1 ml

La detección tanto de *H. influenzae* como *S. aureus* pudo mejorarse en el protocolo general para muestras de 1 ml reemplazando la etapa de NaOH original con etapas más complejas que consistieron en la resuspensión en 0,75 ml de NaO, la incubación a temperatura ambiente durante 5 min, y a continuación la adición de 0,5 ml de Reactivo C para reducir el pH. Los resultados, resumidos en la Figura 8, demostraron que los valores Ct para los ensayos ETGA en todas las muestras que contenían microorganismos fueron más bajas cuando se utilizó el protocolo de disminución de pH en comparación con el protocolo de 1 ml original, lo cual demuestra que el protocolo de disminución del pH mejoró la detección.

Ejemplo 3 – Análisis de la importancia de 95 °C y el uso de un sustrato PTO

Propósito

El propósito del trabajo descrito en este ejemplo fue evaluar el efecto de la etapa a 95 °C en el rendimiento del ensayo Cognitor Minus. Se llevó a cabo el ensayo Cognitor Minus utilizando muestras de caldo de cultivo de sangre con adición de bacterias con o sin la etapa a 95 °C para comparar las siguientes características:

- Los valores Ct obtenidos
- La estabilidad del ADN de matriz ETGA tal como se mide por QPCR en diferentes puntos temporales una vez completada la preparación de la muestra
- Los valores Ct obtenidos y la estabilidad del ADN de matriz de ETGA cuando la mezcla de lisis (ML) contiene sustrato ETGA de oligonucleótido sin modificar (UMO) en oposición al sustrato ETGA de oligonucleótido

fosforotioato modificado (PTO).

Introducción

- 5 Las primeras etapas del ensayo Cognitor Minus tienen por objetivo lisar las células de sangre y eliminar por lavado las proteínas derivadas de sangre, como ADN polimerasas, que producirán un ADN de matriz de ETGA que no se deriva de microorganismo y enzimas nucleasa que pueden digerir ADN de matriz de ETGA derivado de microorganismo. Cualquier microorganismo intacto resultante se lisa a continuación, mediante la adición de la mezcla de lisis (ML) y molienda de bolas. Tras la lisis de microorganismo y la reacción de ETGA, las muestras
- 10 contienen una mezcla de proteínas de microorganismo, componentes de ML, ADN de matriz de ETGA recién sintetizado y proteínas de células de sangre residuales. La etapa a 95 °C tiene por objeto desnaturalizar todas las proteínas con el fin de proteger el ADN de matriz de ETGA y el ADN de control de proceso interno (IPC) de la digestión de nucleasa para poderlo detectar con éxito por QPCR.
- 15 Para evaluar la importancia de la etapa a 95 °C, se llevó a cabo el ensayo Cognitor Minus utilizando cultivos de sangre con adición de bacterias con o sin la etapa a 95 °C. Se analizaron las muestras por QPCR en tres puntos temporales: inmediatamente después de la preparación de la muestra; al cabo de 2 horas a temperatura ambiente; y al cabo de otras 18 horas a 4 °C. El objetivo fue comparar los valores Ct obtenidos y la consistencia de los valores Ct a través de los tres puntos temporales como indicador de la estabilidad de ADN de matriz de ETGA. Se realizó un experimento adicional utilizando ML que contenía sustrato ETGA UMO para analizar si la estabilidad del ADN de matriz de ETGA resultante difería del de ML que contenía sustrato PTO ETGA.
- 20

Materiales y métodos

25 Reactivos utilizados

Reactivo A - 5% (p/v) Saponina, 5% (v/v) Tween 20 y 146 mM Cloruro sódico

Reactivo B - 5 mM Hidróxido sódico.

Reactivo C - 10 mM sulfato de amonio, 2 mM sulfato de magnesio heptahidratado, 10 mM cloruro potásico y 20 mM Tris-HCl [pH 8,0].

Mezcla de lisis (ML) que comprende L1, L2, L3, dNTP, material PTO-IPC:

- L1 (252 ml en 360 ml LM) – 1,46% (p/v) BSA, 0,15% (v/v) Triton X100 y 0,15% (v/v) Tween 20;
- L2 (36 ml en 360 ml LM) - 100 mM sulfato de amonio, 20 mM sulfato de magnesio heptahidratado, 100 mM cloruro de potasio y 200 mM Tris-HCl [pH 8,0];
- L3 (36 ml en 360 ml LM) - 0,1 µM oligo PTO-AS, 0,1 µM oligo PTO-S1, 20 mM Tris-HCl [pH 8,5], 10 mM cloruro de potasio y 10 µM EDTA;
- 10 mM dNTPs (3,6 ml en 360 ml LM)
- Material PTO-IPC (~180 µl en 360 ml LM) *Nota: concentración variable
- H₂O (~32,22 ml en 360 ml LM)

45 Método 1: El ensayo Cognitor Minus sobre caldo de cultivo de sangre con adición de *E. coli* con y sin etapa a 95 °C

Se cultivó *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) en caldo de cultivo nutriente durante 18 horas a 37°C. Se inoculó caldo de cultivo de sangre BacT/ALERT SA (sangre de oveja) a aproximadamente 1×10^7 ufc/ml, 1×10^6 ufc/ml, 1×10^5 ufc/ml, 1×10^4 ufc/ml, y 1×10^3 ufc/ml con *E. coli*. Se prepararon dos grupos de muestras de 1 ml para el análisis con la etapa a 95 °C y sin ella. Se prepararon placas de recuento viable total (RVT) para confirmar los valores ufc/ml. Se prepararon también dos grupos de controles “sin adición” de caldo de cultivo solamente (NSC), controles positivos (caldo de cultivo solamente más ADN polimerasa) y controles negativos (solamente caldo de cultivo) para dar un total de 16 muestras (véase Tabla 2).

Se añadieron a cada muestra de 1 ml, 330 µl de Reactivo A y se mezclaron invirtiendo el tubo cinco veces. Se incubaron las muestras durante 15 minutos a temperatura ambiente (aproximadamente 19°C) y después se centrifugaron durante 3 minutos a 7300 RCF. Tras la centrifugación, se decantaron los sobrenadantes en un receptáculo de residuos clínicos y se transfirieron los tubos abiertos sobre un papel de tejido estéril. Se resuspendió cada aglomerado en 750 µl de Reactivo B por mezclado inclinado y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 500 µl de Reactivo C a cada muestra y se mezcló invirtiendo el tubo tres veces. Se centrifugaron las muestras durante 3 minutos a 7300 RCF. Se decantaron los sobrenadantes resultantes en un receptáculo de residuos clínicos y se transfirieron los tubos abiertos sobre papel de tejido estéril. Se resuspendió cada aglomerado en 500 µl de Reactivo C por mezclado inclinado, transferido a un tubo de molino de bolas que contenía perlas de vidrio (perlas de vidrio de 0,1 mm y 0,5 mm) y se centrifugó durante 3 minutos a 7300 RCF. Tras la centrifugación, se transfirieron los sobrenadantes a los residuos con una pipeta. Se añadieron 50 µl de

ML a cada muestra y otros 10 µl de solución de ADN polimerasa a las muestras de control positivo. A continuación se colocaron las muestras en un Disruptor Genie y se puso en marcha durante 6 minutos a 2800 rpm. Tras la molienda de bolas, se transfirieron las muestras a un bloque de calor ajustado a 37 °C y se incubaron durante 20 minutos.

Tras la etapa de lisis del microorganismo a 37 °C (ETGA), las muestras 95 °C (-) (muestras 9-16) prosiguieron inmediatamente al ajuste de QPCR, mientras que las muestras 95 °C (+) (muestras 1-8) se incubaron a 95 °C durante 5 minutos antes del ajuste para QPCR. Se analizaron ambos grupos de muestras por QPCR inmediatamente. Se analizaron las mismas muestras por QPCR de nuevo al cabo de 2 horas a temperatura ambiente (aproximadamente 19 °C) y de nuevo al cabo de 18 horas a 4 °C. Se replicó este experimento cuatro veces para permitir el análisis estadístico de los resultados.

Tabla 2 - Muestras de ensayo

Muestras 95 °C (+)	Muestras 95 °C (-)
1. <i>E. coli</i> 1 x 10 ⁷ ufc/ml	9. <i>E. coli</i> 1 x 10 ⁷ ufc/ml
2. <i>E. coli</i> 1 x 10 ⁶ ufc/ml	10. <i>E. coli</i> 1 x 10 ⁶ ufc/ml
3. <i>E. coli</i> 1 x 10 ⁵ ufc/ml	11. <i>E. coli</i> 1 x 10 ⁵ ufc/ml
4. <i>E. coli</i> 1 x 10 ⁴ ufc/ml	12. <i>E. coli</i> 1 x 10 ⁴ ufc/ml
5. <i>E. coli</i> 1 x 10 ³ ufc/ml	13. <i>E. coli</i> 1 x 10 ³ ufc/ml
6. Caldo de cultivo de sangre solo (NSC)	14. Caldo de cultivo de sangre solo (NSC)
7. Control positivo (Pol+ve)	15. Control positivo (Pol+ve)
8. Control negativo (Pol-ve)	16. Caldo de cultivo solamente (Pol-ve)
NSC: Control sin adición	

Método 2: sustrato PTO ETGA frente a sustrato UMO ETGA

Se inoculó caldo de cultivo SA BacT/ALERT a aproximadamente 1 x 10⁷ ufc/ml y 1 x 10⁴ ufc/ml con *E. coli*. Se prepararon cuatro grupos de muestras de 1 ml para comparar los resultados del ensayo Cognitor Minus con el uso y sin el uso de PTO, con o sin la etapa a 95 °C. Se prepararon placas de RVT para confirmar los valores ufc/ml. Se prepararon también NSC y controles positivos (véase Tabla 3). Se procesaron todas las muestras de acuerdo con el protocolo general descrito en el "Método 1". Tras la etapa de lisis (ETGA) del microorganismo a 37°C, las muestras 95 °C (-) (muestras 9-16) prosiguieron inmediatamente a un ajuste de QPCR, mientras que las muestras 95 °C (+) (muestras 1-8) fueron incubadas a 95 °C durante 5 minutos antes del ajuste de QPCR. Se analizaron ambos grupos de muestras por QPCR inmediatamente. Se analizaron las mismas muestras por QPCR al cabo de 2 horas a temperatura ambiente y de nuevo tras otras 18 horas más a 4 °C.

Tabla 3 - Muestras de ensayo

95 °C (+) Muestras	95 °C (-) Muestras
1. <i>E. coli</i> 1 x 10 ⁷ ufc/ml: UMO ML	9. <i>E. coli</i> 1 x 10 ⁷ ufc/ml: UMO ML
2. <i>E. coli</i> 1 x 10 ⁷ ufc/ml: PTO ML	10. <i>E. coli</i> 1 x 10 ⁷ ufc/ml: PTO ML
3. <i>E. coli</i> 1 x 10 ⁴ ufc/ml: UMO ML	11. <i>E. coli</i> 1 x 10 ⁴ ufc/ml: UMO ML
4. <i>E. coli</i> 1 x 10 ⁴ ufc/ml: PTO ML	12. <i>E. coli</i> 1 x 10 ⁴ ufc/ml: PTO ML
5. Caldo de cultivo de sangre solo (NSC): UMO ML	13. Caldo de cultivo de sangre solo (NSC): UMO ML
6. Caldo de cultivo de sangre solo (NSC): PTO ML	14. Caldo de cultivo de sangre solo (NSC): PTO ML
7. Control positivo (Pol+ve): UMO ML	15. Control positivo (Pol+ve): UMO ML
8. Control positivo (Pol+ve): PTO ML	16. Control positivo (Pol+ve): PTO ML
NSC: control sin adición, UMO: oligonucleótido sin modificar, PTO: oligonucleótido fosforotioato, ML: lisis mix	

Resultados y explicación

Resultados 1: Eliminación de la etapa a 95 °C etapa mejora la señal ETGA QPCR sin una reducción de la señal con el tiempo

En la Figura 9 A-C se presentan los resultados para las muestras procesadas con o sin la etapa a 95 °C en los momentos 0, 2, 20 tras la preparación de la muestra (n = 3). Dentro de los experimentos individuales, la eliminación de la etapa a 95 °C resultó en valores Ct educidos (aumento de la señal ETGA) para todas las diluciones de caldo de cultivo de sangre con adición de *E. coli* y controles positivos (Figura 9 A-C). Los valores Ct obtenidos para las mismas muestras en los momentos 0, 2 y 20 horas son muy consistentes a través de los tres experimentos replicados con valores ΔCt máximos comprendidos entre 0,07 unidades Ct a 1,07 unidades Ct (promedio del valor ΔCt máximo de 0,30 unidades Ct) para muestras 95 °C (+) y valores ΔCt máximos comprendidos entre 0,03 unidades Ct y 0,58 unidades Ct (promedio de valor ΔCt máximo de 0,38 unidades Ct) para muestras 95 °C (-). Los NSC y los controles negativos produjeron valores Ct por encima de 40 o no tuvieron amplificación QPCR en absoluto (no se muestran los datos). La Figura 10 presenta todos los datos de las muestras de caldo de cultivo de sangre con adición de *E. coli* en un gráfico y se pueden observar varias tendencias. En primer lugar, existe una clara diferencia

entre los valores Ct obtenidos para las muestras 95 °C (+) en comparación con las muestras 95 °C (-), con aproximadamente una reducción de la unidad de 1,0 Ct en los valores Ct para las muestras 95 °C (-). En segundo lugar hay una diferencia muy reducida entre los valores Ct obtenidos en diferentes puntos temporales tanto para las muestras 95 °C (+) como las muestras 95 °C (-). Sin embargo, existe una pequeña reducción en el valor Ct ya que el período de almacenamiento aumenta cuando se elimina la etapa a 95 °C, lo cual es evidente si se observa las líneas de tendencia en la Figura 10 y es más pronunciada en el experimento 3 (Figura 9B).

Se llevó a cabo el moldeado lineal (utilizando R) para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores Ct obtenidos de la serie de dilución de caldo de cultivo de sangre con adición de *E. coli* con y sin la etapa a 95 °C etapa y en diferentes puntos temporales. En la Tabla 4 se muestran los valores p obtenidos para diferentes comparaciones. La comparación de los valores Ct para las muestras 95 °C (+) con las muestras 95 °C (-) utilizando los datos de todos los experimentos produjeron valores-p muy significativos ($p < 0,001$) independientemente de que se incluyeran o no los datos de puntos temporales individuales o datos de todos los puntos temporales en el análisis. La comparación de los valores Ct para diferentes puntos temporales dentro de los grupos de datos de 95 °C (+) o 95 °C (-) utilizando los datos de los cuatro experimentos produjo valores p no significativos ($p > 0,05$). Las comparaciones de puntos temporales dentro del mismo experimento produjeron valores p no significativos ($p > 0,05$) para todos los grupos de datos aparte del grupo de datos 95 °C (-) en el experimento 3 (T3), que tuvo un valor p de 0,016. Este valor p significativo probablemente se deba a una reducción más pronunciada del valor Ct con el momento que se observó en este experimento en particular.

Tabla 4 – Modelos lineales (utilizando R) para comparar las curvas normales del valor Ct para dilución en serie de cultivo de sangre con adición de *E.coli* en diferentes puntos temporales con y sin etapa 95 °C.

Datos analizados	Comparación	Valor p	Significancia
Todos los datos	95 °C (+) frente a 95 °C (-)	$<2 \times 10^{-16}$	***
momento 0 H: datos T1-T4	95 °C (+) frente a 95 °C (-)	$4,82 \times 10^{-8}$	***
momento 2 H: datos T2-T4	95 °C (+) frente a 95 °C (-)	$1,31 \times 10^{-8}$	***
momento 20 H: datos T2-T4	95 °C (+) frente a 95 °C (-)	$1,47 \times 10^{-10}$	***
95 °C (+):datos T1-T4	momento	0,730	-
95 °C (-):datos T1-T4	momento	0,094	-
95 °C (+):datos T2 solamente	momento	0,896	-
95 °C (-):datos T2 solamente	momento	0,657	-
95 °C (+):datos T3 solamente	momento	0,956	-
95 °C (-):datos T3 solamente	momento	0,016	*
95 °C (+):datos T4 solamente	momento	0,769	-
95 °C (-):datos T4 solamente	momento	0,061	-

Códigos de significancia: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, -: no significativo, T: experimento

Resultados 2: Los resultados de Cognitor Minus son más consistentes a través de los diferentes puntos temporales cuando se utiliza ML de PTO en lugar de ML de UMO

La Figura 11A-B presenta los valores Ct obtenidos para muestras de caldo de cultivo de sangre con adición de *E. coli* (1×10^7 ufc/ml y 1×10^4 ufc/ml) y controles positivos procesados utilizando ML UMO (Figura 11A) o ML PTO (Figura 11B) con y sin la etapa a 95 °C. Los datos que se muestran aquí son de un solo experimento. Los valores Ct para NSC utilizados ML UMO fueron todos ellos al menos 5 unidades Ct más altos que los valores Ct obtenidos para 1×10^3 ufc/ml de muestras de caldo de cultivo de sangre con adición de *E. coli*, mientras que los valores Ct NSC de ML PTO fueron todos ellos por encima de 42,0 unidades Ct o no tuvieron amplificación QPCR en absoluto (no se muestran los datos). Los resultados demuestran que los valores Ct para muestra ML UMO son como promedio 10,2 unidades Ct más bajos que los valores Ct para muestras ML PTO. Existe también una mayor reducción del valor Ct para muestras ML UMO que el que existe para muestras ML PTO cuando se elimina la etapa 95 °C. Cabe destacar sobre todo, en relación con la estabilidad de ADN de matriz ETGA que los valores Ct obtenidos para muestras ML UMO son llamativamente menos consistentes a través de los diferentes puntos temporales que los valores Ct para muestras ML PTO. Los valores Ct para las muestras de caldo de cultivo de sangre con adición de *E. coli* en el grupo de datos de ML UMO 95 °C (+) aumentó aproximadamente 1,0 unidad Ct desde las 2 horas a 20 horas, mientras que el control positivo correspondiente presentó una reducción de 0,24 unidades Ct en el valor Ct. Esto indica que la digestión de nucleasa del ADN de matriz de ETGA puede estar ocurriendo en las muestras cuando están presentes bacterias y/o células de sangre hospedadoras a pesar del efecto desnaturalizante de proteína de la etapa a 95 °C, pero no en el control positivo en el que solamente se añade enzima ADN polimerasa. Cuando se elimina la etapa a 95 °C, los valores Ct para las muestras de ML UMO disminuyen al aumentar el período de almacenamiento de la muestra. Esto indica que en ausencia de desnaturalización de proteína, la generación de matriz ETGA continua puede eliminar por competición cualquier aumento de la digestión de nucleasa, con el resultado en consecuencia de un aumento de la señal QPCR ETGA. Los datos de ML PTO (Figura 11B) demuestran valores Ct altamente consistentes a través de los puntos temporales tanto para muestras 95 °C (+) como 95 °C (-). Estos datos indican que el ADN de matriz ETGA formado a partir del ADN de sustrato PTO es más resistente a los cambios por la degradación de nucleasa y/o la generación de ADN de matriz ETGA adicional tras la reacción de ETGA a 37°C.

Sumario

Los datos presentados en el presente documento demuestran que la detección de ADN de matriz ETGA se mejora cuando se elimina la etapa a 95 °C. Por otra parte, la señal de QPCR ETGA no se deteriora con el aumento del tiempo de almacenamiento de la muestra en ausencia de la etapa a 95 °C. La comparación de ML PTO y ML UMO indica que la alta estabilidad del ADN de matriz ETGA depende del uso del ADN de sustrato ETGA PTO. Todos los datos que se presentan en el presente documento corroboran la eliminación de la etapa a 95 °C del ensayo Cognitor Minus. Cabe señalar que el aumento de la sensibilidad en el ensayo puede aumentar la posibilidad de detectar señal de fondo (señal ETGA derivada de sangre), sin embargo, la optimización de otros factores como el rendimiento de lisis/lavado de sangre y la interpretación de los resultados de la QPCR deberán eliminar su impacto.

Ejemplo 4 - Análisis de la importancia de 95 °C y el uso de un sustrato de PTO: Microorganismos de panel primario

Propósito

El propósito del trabajo presentado en este informe fue:

1. Comparar los resultados de Cognitor Minus con y sin la etapa a 95 °C para microorganismos de panel primario (*E. coli*; *S. aureus*; y *C. albicans*)
2. Confirmar las observaciones del Ejemplo 3 en lo que se refiere a la comparación entre ML oligonucleótidos modificados fosforotioato (PTO) y LM oligonucleótidos sin modificar (UMO)
3. Analizar el efecto de la extensión de la duración de almacenamiento de la muestra (hasta 72 horas) en los resultados de QPCR para cada microorganismo de panel primario utilizando ML PTO y LM UMO.

Introducción

Las primeras etapas del ensayo Cognitor Minus tienen como objetivo lisar las células de sangre y eliminar por lavado las proteínas derivadas de la sangre como ADN polimerasas que producen ADN de matriz ETGA que no se derivan de microorganismos, y enzimas nucleasas, que pueden digerir ADN de matriz ETGA derivado de microorganismo. Este proceso no debería dañar a los microorganismos presentes en la muestra de sangre. Los microorganismos intactos aislados se lisan a continuación por adición de la mezcla de lisis (ML) y molienda de bolas. Tras la lisis de los microorganismos y la reacción ETGA, las muestras contienen una mezcla de proteínas de microorganismos, componentes de ML, ADN de matriz ETGA recién sintetizado y proteínas de células de sangre residuales. En el protocolo de ensayo de Cognitor Minus actual, la etapa 95 °C tiene como objeto desnaturalizar todas las proteínas para proteger el ADN de matriz EGTA y controlar el ADN de proceso interno (IPC) de la digestión de nucleasa para su detección con éxito a través de QPCR. La etapa a 95 °C también inactiva las ADN polimerasas, con lo cual apagan la reacción de ETGA. Sin embargo, dado que se incorpora la etapa a 95 °C en el protocolo, los UMO utilizados para formar el sustrato ETGA (e IPC) en la ML han sido sustituidos por PTO que son resistentes a nucleasa. Mientras que la cadena de extensión de ETGA que forma la matriz ETGA se construye a partir de dNTP normales, el ADN de sustrato PTO con el que se hibrida puede conferir protección contra la digestión de nucleasa. Dados los beneficios de la eliminación de la etapa a 95 °C, como puedan ser la simplificación del protocolo y una reducción del tiempo requerido para llevar a cabo el ensayo, se considera importante reevaluar la necesidad de la etapa a 95 °C etapa.

Para evaluar la importancia de la etapa a 95 °C, se realizó el ensayo Cognitor Minus utilizando caldo de cultivo de sangre con adición de microorganismo con y sin la etapa a 95 °C. Se analizaron las muestras por QPCR en cinco puntos temporales: inmediatamente después de la preparación de la muestra; al cabo de 2 horas de almacenamiento a temperatura ambiente (aproximadamente 19 °C) y al cabo de 24 horas, 48 horas y 72 horas de almacenamiento a 4 °C. Los valores Ct obtenidos y la consistencia de los valores Ct a través de los cinco puntos temporales sirvieron para evaluar el efecto de la etapa a 95 °C en el rendimiento del ensayo Cognitor Minus y la estabilidad de la muestra para cada uno de los microorganismos del panel primario utilizando ML PTO o ML UMO.

Materiales y Métodos

Para los detalles sobre los reactivos, véase el Ejemplo 3.

Se cultivaron *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™) y *Candida albicans* (ATCC® 10231™) en medios líquidos (*E. coli* y *S. aureus* en caldo de cultivo nutritivo; y *C. albicans* en medio Sabouraud) durante aproximadamente 18 horas a 37 °C. Se inoculó caldo de cultivo de sangre BacT/ALERT SA (sangre de oveja; véase Tabla 6) con *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans* a aproximadamente 1×10^4 ufc/ml, 1×10^4 ufc/ml y 1×10^5 ufc/ml, respectivamente. Se prepararon cuatro grupos de muestras de 1 ml para el ensayo con y sin la etapa a 95 °C para ML PTO y ML UMO. Se prepararon también caldo de cultivo de sangre solo "controles sin adición (NSC)" y controles positivos (caldo de cultivo solamente más ADN polimerasa (PC)) dando un total de 20 muestras (véase la Tabla 5). Se prepararon placas de recuento viable total (RVT) para confirmar los valores ufc/ml (véase la Tabla 7) y el caldo de cultivo negativo.

Para cada muestra de 1 ml, se añadieron 330 µl de Reactivo A y se mezclaron invirtiendo el tubo cinco veces. Se incubaron las muestras durante 15 minutos a temperatura ambiente (aproximadamente 19°C) y a continuación, se centrifugaron durante 3 minutos a 7300 RCF. Tras la centrifugación, se decantaron los sobrenadantes en un
 5 receptáculo de residuos clínicos y se transfirieron los tubos abiertos sobre un papel de tejido estéril. Se resuspendieron cada uno de los aglomerados en 750 µl de Reactivo B por mezclado inclinado y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 500 µl de Reactivo C a cada muestra y se
 10 mezclaron invirtiendo el tubo tres veces. Se centrifugaron las muestras durante 3 minutos a 7300 RCF. Se decantaron los sobrenadantes resultantes en un receptáculo de residuos clínicos y se transfirieron los tubos abiertos sobre un papel de tejido estéril. Se resuspendió cada uno de los aglomerados en 500 µl de Reactivo C por mezclado
 15 inclinado, se transfirieron a un tubo de bolas que contenía bolas de vidrio (bolas de vidrio de 0,1 mm y 0,5 mm) y se centrifugó durante 3 minutos a 7300 RCF. Tras la centrifugación, se transfirieron los sobrenadantes a los residuos con una pipeta. Se añadieron 50 µl de ML a cada una de las muestras y se añadieron 10 µl más de solución de ADN polimerasa a las muestras de control positivo. A continuación, se colocaron las muestras en un Disruptor Genie y se puso en marcha durante 6 minutos a 2800 rpm. Tras la molienda de bolas, se transfirieron las muestras a un
 bloque calefactor ajustado a 37 °C y se incubó durante 20 minutos.

Tras la etapa de lisis de los microorganismos a 37 °C (ETGA), las muestras 95 °C (-) (muestras 11-20) prosiguieron
 inmediatamente al ajuste de QPCR, al mismo tiempo que se incubaron las muestras 95 °C (+) (muestras 1-10) a
 20 95 °C durante 5 minutos antes del ajuste de QPCR. Se analizaron ambos grupos de muestras por QPCR inmediatamente. Se analizaron las mismas muestras por QPCR de nuevo al cabo de 2 horas a temperatura ambiente y de nuevo al cabo de 24 horas, 48 horas y 72 horas almacenadas a 4°C. Se replicó este experimento tres veces para permitir el análisis estadístico de los resultados.

Tabla 5 – Muestras de ensayo

95 °C (+) Muestras	95 °C (-) Muestras
1. <i>E. coli</i> 1 x 10 ⁴ ufc/ml: ML PTO	11. <i>E. coli</i> 1 x 10 ⁴ ufc/ml: ML PTO
2. <i>S. aureus</i> 1 x 10 ⁴ ufc/ml: ML PTO	12. <i>S. aureus</i> 1 x 10 ⁴ ufc/ml: ML PTO
3. <i>C. albicans</i> 1 x 10 ⁵ ufc/ml: ML PTO	13. <i>C. albicans</i> 1 x 10 ⁵ ufc/ml: ML PTO
4. PC: ML PTO	14. PC: ML PTO
5. NSC: PTO ML	15. NSC: ML PTO
6. <i>E. coli</i> 1 x 10 ⁴ ufc/ml: UMO	ML 16. <i>E. coli</i> 1 x 10 ⁴ ufc/ml: ML UMO
7. <i>S. aureus</i> 1 x 10 ⁴ ufc/ml: ML UMO	17. <i>S. aureus</i> 1 x 10 ⁴ ufc/ml: ML UMO
8. <i>C. albicans</i> 1 x 10 ⁵ ufc/ml: ML UMO	18. <i>C. albicans</i> 1 x 10 ⁵ ufc/ml: ML UMO
9. PC: ML UMO	19. PC: ML UMO
10. NSC: UMO ML	20. NSC: ML UMO
PC: Control positivo, NSC: control sin adición, UMO: oligonucleótido sin modificar, PTO: oligonucleótido fosforotioato, ML: mezcla de lisis	

Tabla 6 – Materiales

Reactivo	Proveedor	Lote/No. lote	Fecha de caducidad
Sangre de oveja (replicado1)	TCS Bioscience	30112000	27/04/2015
Sangre de oveja (replicado2)	TCS Bioscience	30210900	25/05/2015
Sangre de oveja (replicado3)	TCS Bioscience	30255300	08/06/2015

Tabla 7 – RVT de Microorganismos

Microorganismo	Exp. 1 TVC (total ufc)	Exp. 2 TVC (total ufc)	Exp. 3 TVC (total ufc)
<i>E. coli</i>	7.200	10.200	28.200
<i>S. aureus</i>	4.200	23.000	23.200
<i>C. albicans</i>	271.000	191.000	246.000

Resultados y explicación

Los resultados para las muestras procesadas mediante el uso de ML PTO o ML UMO con y sin etapa a 95 °C en los
 momentos 0, 2, 24, 48 y 72 horas (n = 3) se muestran en la Figura 12A-E.

Eliminación de la etapa a 95 °C mejora la señal QPCR ETGA

Las muestras de caldo de cultivo de sangre con adición de microorganismo y las muestras de control positivo
 procesadas sin la etapa a 95 °C etapa produjeron valores Ct más bajos (señal ETGA más fuerte) que las
 correspondientes muestras procesadas con la etapa a 95 °C tanto para ML PTO como ML UMO. El promedio de Δ
 40 de los valores Ct (95 °C (+) sustracción de 95 °C (-)) para las muestras ML PTO a las 0 horas fueron 0,98 unidades
 Ct, 1,41 unidades Ct, 0,12 unidades Ct y 1,21 unidades Ct para *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans* y Control positivo
 respectivamente.

El promedio del Δ de los valores Ct (95 °C (+) sustracción de 95 °C (-)) para las muestras ML UMO con “0 horas” fueron 3,91 unidades Ct, 4,10 unidades Ct, 5,36 unidades Ct y 1,20 unidades Ct para *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans* y control positivo respectivamente. La mayoría de las muestras NSC procesadas con ML PTO no produjeron valores Ct debido a la baja amplificación por QPCR y, por tanto, no se muestran estos datos en la Figura 12 A-E. Sin embargo, la incidencia de suficiente amplificación para los valores Ct fue superior para las muestras 95 °C (-) que para las muestras 95 °C (+) (7/15 valores Ct en comparación con 2/15 valores Ct sin ninguna tendencia evidente para la duración del almacenamiento; y todos los valores Ct de ML NSC PTO fueron entre 42,0 unidades Ct y 45,0 unidades Ct). Las muestras NSC procesadas con ML UMO produjeron valores Ct a las “0 horas” que fueron como promedio 0,42 unidades Ct más bajos sin la etapa a 95 °C. Es de esperar este aumento de la señal de QPCR para las muestras NSC procesadas sin la etapa a 95 °C dado el aumento general de la señal observada para las muestras positivas.

Los resultados de Cognitor Minus son más consistentes a través de los diferentes puntos temporales cuando se utiliza ML PTO que con LM UMO

Dentro del grupo de datos de ML PTO, todas las muestras de caldo de cultivo con adición de microorganismos y las muestras de control positivo produjeron valores Ct muy consistentes a través de las 72 horas del período de almacenamiento, independientemente de que se procesaran o no las muestras con la etapa a 95 °C. Dentro del grupo de datos de la ML UMO 95 °C (+), las muestras de *E. coli*, *S. aureus* y el control positivo produjeron valores Ct bastante consistentes a través del período de almacenamiento de 72 horas, mientras que las muestras de *C. albicans* y NSC pueden deberse a un mayor impacto de la actividad de nucleasa en la concentración de ADN de matriz ETGA cuando la concentración de partida es más baja, tal como lo indican los valores CT más altos para estas muestras a las “0 horas”. Las muestras ML UMO 95 °C (-) presentaron por lo general una disminución del valor Ct (aumento de la señal QPCR ETGA) a lo largo del tiempo, excepto para las muestras de *C. albicans* y NSC en las que los valores Ct fueron muy consistentes a través del período de 72 horas. Esto indica que para las muestras de *E. coli*, *S. aureus* y el control positivo procesadas sin la etapa a 95 °C (desnaturalización de proteínas), la continuación de la reacción ETGA tiene como resultado un aumento de la señal QPCR, eliminando por competencia cualquier actividad de nucleasa. Mientras que en las muestras *C. albicans* y NSC, en las que el efecto de la degradación de nucleasa parece ser más pronunciado, la continuación de la reacción ETGA puede contrarrestar esta degradación para proporcionar una señal de QPCR más estable a lo largo del tiempo.

Análisis estadístico de los resultados

Se llevó a cabo el moldeo lineal (utilizando R) para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los valores Ct obtenidos para las muestras ML PTO y ML UMO procesadas con y sin la etapa a 95 °C en diferentes puntos temporales. De cada grupo de datos (p.ej., el grupo de datos de *E. coli* con ML PTO), se modeló 'Ct' contra las siguientes variables explicativas y sus interacciones: “Log10 ufc”, “Tiempo” y “etapa a 95 °C”. Se eliminaron las interacciones y variables no significativas ($p > 0,05$) del modelo por etapas, con el resultado de una simplificación del modelo. Sin embargo, no se eliminaron las variables que no fueron significativas del modelo cuando ninguna de sus interacciones fue significativa ($p < 0,05$). Por lo tanto, el modelo final para cada grupo de datos tuvo interacciones solamente significativas, variables significativas y variables no significativas que formaron interacciones significativas. Los códigos de significancia para cada variable e interacción se muestran en la Tabla 8 (los códigos de significancia se basan en los valores p para cada interacción o variable en el punto de simplificación del modelo, si se elimina del modelo y desde el modelo final).

Tabla 8 – Códigos de significancia para valores p de cada variable explicativa y sus interacciones utilizando modelación lineal en R

Grupo de datos	Log10 ufc	Tiempo	95 °C	Log10 ufc: Tiempo	Log10 ufc: 95 °C	Tiempo: 95 °C	Log10 ufc: Tiempo:95 °C
<i>E. coli</i> ML PTO	***	NS	***	NS	~	NS	NS
<i>E. coli</i> ML UMO	***	**	***	NS	NS	*	NS
<i>S. aureus</i> ML PTO	***	NS	*	NS	**	NS	NS
<i>S. aureus</i> ML UMO	***	***	***	NS	***	**	NS
<i>C. albicans</i> ML PTO	*	NS	***	NS	***	NS	NS
<i>C. albicans</i> ML UMO	~	NS	**	NS	**	NS	NS
PC PTO ML		~	***			NS	
PC UMO ML		~	***				
NSC UMO ML		NS	NS			***	

Códigos de significancia: *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, ~ $p < 0,1$, NS – no significativo.

La etapa a 95 °C tiene un efecto significativo en el valor Ct para todos los microorganismos y los controles positivos con ML PTO y ML UMO. La duración de almacenamiento de la muestra (“Tiempo” e interacciones de “Tiempo”) no tiene un efecto significativo en el valor Ct para ninguno de los microorganismos o controles positivos con ML PTO; y tampoco es significativo para *E. coli* y *S. aureus* con ML UMO: es sobre todo probable que se deba a la reducción observada en el valor Ct con respecto al tiempo para las muestras procesadas sin la etapa a 95 °C en estos grupos

de muestras. No hay ningún efecto significativo de la etapa a 95 °C para el grupo de datos ML de UMO NSC; pero existe una significativa interacción entre la duración de almacenamiento de la muestra y la etapa a 95 °C ("Tiempo: 95 °C"). El análisis estadístico no pudo ser realizado en el grupo de datos de ML NSC PTO debido a la ausencia de valores Ct como resultado de la baja amplificación QPCR.

Sumario

Los datos que se muestran en el presente documento demuestran que se mejora la detección de ADN de matriz ETGA cuando se elimina la etapa a 95 °C. Asimismo, la señal de QPCR ETGA no se deteriora al aumentar el período de almacenamiento de la muestra en ausencia de la etapa a 95 °C cuando se procesan las muestras utilizando ADN sustrato de ETGA PTO. La señal ETGA no es tan estable cuando se procesan las muestras utilizando ADN de sustrato de ETGA UMO: en ausencia de la etapa a 95 °C la señal de QPCR ETGA continúa aumentando con la duración del almacenamiento de la muestra; y con la etapa a 95 °C la señal QPCR ETGA tiene más probabilidad de deteriorarse como resultado de la degradación de la nucleasa sin una producción continua del ADN de matriz de ETGA. Estos resultados están en consonancia con los resultados presentados en el Ejemplo 3.

Todos los datos que se presentan en el presente documento corroboran la eliminación de la etapa a 95 °C del ensayo Cognitor Minus y confirman la importancia del uso de ADN de sustrato ETGA PTO en la ML. Estos resultados verifican asimismo que las muestras procesadas con ML PTO se pueden almacenar durante hasta 72 horas a 4 °C, sin ser perjudiciales para los resultados del ensayo. Merece la pena destacar que el aumento de la sensibilidad del ensayo con la eliminación de la etapa a 95 °C puede aumentar la posibilidad de detectar la señal de fondo (señal QPCR ETGA derivada de la sangre). Sin embargo, mientras que las muestras de ML NSC PTO no proporcionaron un grupo completo de valores Ct para la comparación (debido a la baja amplificación), el grupo de datos de la ML NSC UMO demuestra que el aumento de la señal de QPCR ETGA asociada con la eliminación de la etapa a 95 °C es más baja para las NSC que para sus muestras positivas. Asimismo, la optimización de los demás factores como el rendimiento de la lisis/lavado de la sangre y la interpretación de los resultados de QPCR deberían eliminar su impacto.

La presente invención no está limitada en su alcance con las realizaciones específicas que se describen en el presente documento. De hecho, para las personas especializadas en la materia serán evidentes diversas modificaciones de la invención, además de las descritas en el presente documento a partir de la descripción descrita y las figuras adjuntas. Se pretende que dichas modificaciones entren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Por otra parte, todas las realizaciones que se describen en el presente documento se consideran como aplicables en un amplio sentido y se pueden combinar con cualquiera y todas las realizaciones correspondientes, según sea apropiado.

REIVINDICACIONES

1. Un método de detección de la ausencia o presencia de un microorganismo en una muestra que comprende:

- 5 (a) poner en contacto la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como un sustrato para actividad de modificación de ácido nucleico del microorganismo en la muestra,
 (b) incubación de la muestra que se ha puesto en contacto de este modo en condiciones adecuadas para la actividad de modificación de ácido nucleico; y
 10 (c) determinación específica de la ausencia o presencia de una molécula de ácido nucleico modificada que es el resultado de la acción de la actividad de modificación de ácido nucleico en la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la ausencia o presencia del microorganismo, **caracterizado por que** la molécula de ácido nucleico se modifica para protegerla de la actividad de nucleasa.

15 2. El método de la reivindicación 1 donde la modificación de la molécula de ácido nucleico se selecciona entre incorporación de nucleótidos sintéticos, incorporación de metilación y protección de los extremos 3' y/o 5', opcionalmente donde los nucleótidos sintéticos comprenden nucleótidos fosforotioato y/o nucleótidos de ácidos nucleicos cerrados.

20 3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 donde la acción de la actividad de modificación de ácido nucleico en la molécula de ácido nucleico sustrato produce una molécula de ácido nucleico extendida y/o donde la actividad de modificación de ácido nucleico comprende actividad de polimerasa.

25 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde la etapa (a) comprende poner en contacto la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como un sustrato para actividad de modificación de ácido nucleico del microorganismo en la muestra junto con una molécula de ácido nucleico de control positivo interno (IPC), donde:

- (a) la molécula de ácido nucleico IPC es susceptible de la actividad de nucleasa y se utiliza para identificar la actividad contaminante de nucleasa en el aglomerado; o
 30 (b) la molécula de ácido nucleico IPC se modifica para protegerla de la actividad de nucleasa.

35 5. El método de la reivindicación 4(b) donde la modificación de la molécula de ácido nucleico IPC se selecciona entre incorporación de nucleótidos sintéticos, incorporación de metilación y protección de los extremos 3' y/o 5', opcionalmente, donde los nucleótidos sintéticos comprenden nucleótidos fosforotioato y/o nucleótidos de ácidos nucleicos cerrados.

40 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5 donde la molécula de ácido nucleico IPC comprende sitios de unión a cebador idénticos a la molécula de ácido nucleico de tal modo que hay competencia por la unión a cebador en la etapa (c).

45 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6 donde se añade una sonda de ácido nucleico en la etapa (c) que se une a una secuencia de sonda diana dentro de la molécula de ácido nucleico, opcionalmente, donde la sonda de ácido nucleico está marcada, opcionalmente, donde se añade otra sonda de ácido nucleico adicional en la etapa (c) que se une a una secuencia de sonda diana dentro de la molécula de ácido nucleico IPC, opcionalmente donde la sonda de ácido nucleico adicional está marcada, opcionalmente, donde la sonda de ácido nucleico no se une a la molécula de ácido nucleico IPC y la sonda de ácido nucleico adicional no se une a la molécula de ácido nucleico y, opcionalmente, donde la sonda de ácido nucleico y la sonda de ácido nucleico adicional están marcadas de forma diferente.

50 8. El método de reivindicación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde la molécula de ácido nucleico es al menos parcialmente de doble cadena y comprende restos uracilo en la cadena complementaria y etapa (c) comprende la adición de uracil ADN glicosilasa (UDG) a la muestra para degradar los restos uracilo en la cadena complementaria y, opcionalmente, donde la cadena complementaria de la molécula de ácido nucleico comprende la modificación en el extremo 3' para evitar la extensión y, opcionalmente, donde la modificación en el extremo 3' comprende la incorporación de un nucleótido no extensible, opcionalmente, donde el nucleótido no extensible es un didesoxi nucleótido trifosfato (ddNTP), opcionalmente, donde el ddNTP es didesoxi Citidina.

55 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 donde el método no comprende una etapa de inactivación de la actividad de nucleasa en la muestra.

60 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde etapa (c) comprende una etapa de amplificación de ácido nucleico.

65 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde la muestra contiene una fuente de actividad de modificación de ácido nucleico que no es microorganismo y el método comprende:

- (a) tratamiento de la muestra en condiciones de pH alto durante no más de 5 minutos para inhibir la fuente que no es microorganismo de actividad de modificación de ácido nucleico (al mismo tiempo que no afecta a la actividad de modificación de ácido nucleico del microorganismo en la muestra),
- (b) contacto de la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como un sustrato para actividad de modificación de ácido nucleico del microorganismo en la muestra,
- (c) incubación de la muestra que se ha puesto en contacto de este modo en condiciones adecuadas para la actividad de modificación de ácido nucleico; y
- (d) determinación específica de la ausencia o presencia de una molécula de ácido nucleico modificada que es el resultado de la acción de la actividad de modificación de ácido nucleico en la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la ausencia o presencia del microorganismo;

y opcionalmente, donde el tratamiento en condiciones de pH alto se detiene por adición un reactivo para disminuir el pH.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 donde la muestra contiene una fuente de actividad de modificación de ácido nucleico que no es microorganismo y el método comprende:

- (a)
- (i) incubación de la muestra con un reactivo que lisa lo que no es microorganismos cuando están presentes en la muestra pero no lisa los microorganismos en la muestra,
- (ii) opcionalmente, separación del material celular lisado desde los microorganismos intactos (si los hay) en la muestra,
- (iii) contacto de los microorganismos (separados) intactos (si los hay) en la muestra con un reactivo de pH alto e incubación durante no más de 5 minutos para inhibir la fuente de actividad de modificación de ácido nucleico que no es microorganismo (al mismo tiempo que o afecta la actividad de modificación de ácido nucleico del microorganismo en la muestra),
- (iv) adición de un reactivo que disminuye el pH para detener la incubación a un pH alto,
- (v) separación de los microorganismos cuando están presentes en la muestra desde los reactivos que modifican el pH,
- (vi) lisis de cualquier microorganismo separado,
- (vii) contacto de la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como un sustrato para actividad de modificación de ácido nucleico del microorganismo en la muestra,
- (viii) incubación de la muestra que se ha puesto en contacto de este modo en condiciones adecuadas para la actividad de modificación de ácido nucleico, y
- (ix) determinación específica de la ausencia o presencia de una molécula de ácido nucleico modificada que es el resultado de la acción de la actividad de modificación de ácido nucleico en la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la ausencia o presencia del microorganismo; o
- (b)
- (i) incubación de la muestra con un reactivo que lisa lo que no es microorganismos cuando están presentes en la muestra pero que no lisa los microorganismos en la muestra,
- (ii) centrifugación de la muestra para formar un aglomerado que contiene microorganismos cuando están presentes en la muestra,
- (iii) separación del sobrenadante del aglomerado,
- (iv) re-suspensión del aglomerado en un reactivo de pH alto e incubación durante no más de 8 minutos para inhibir la fuente de actividad de modificación de ácido nucleico que no es microorganismo (al mismo tiempo que no afecta a la actividad de modificación de ácido nucleico del microorganismo en la muestra),
- (v) adición de un reactivo que disminuye el pH para detener la incubación a un pH alto,
- (vi) una segunda centrifugación de la muestra para formar un aglomerado que contiene microorganismos cuando están presentes en la muestra,
- (vii) separación del sobrenadante del aglomerado,
- (viii) lisis de cualquier microorganismo en el aglomerado,
- (ix) contacto de la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como un sustrato para actividad de modificación de ácido nucleico del microorganismo en la muestra,
- (x) incubación de la muestra que se ha puesto en contacto de este modo en condiciones adecuadas para la actividad de modificación de ácido nucleico, y
- (xi) determinación específica de la ausencia o presencia de una molécula de ácido nucleico modificada que es el resultado de la acción de la actividad de modificación de ácido nucleico en la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la ausencia o presencia del microorganismo;
- y, opcionalmente, donde etapas (a)(vi) y (a)(vii) o b(vii) y b(viii) se realizan conjuntamente, opcionalmente, donde se añade la muestra a la molécula de ácido nucleico junto con un reactivo de lisis.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 donde la muestra contiene potencialmente una fuente de actividad de nucleasa que no es microorganismo y el método comprende:

(i) incubación de la muestra con un reactivo que lisa lo que no es microorganismos cuando están presentes en la muestra pero que no lisa los microorganismos en la muestra,
(ii) separación del material celular lisado desde los microorganismos intactos (si los hay) en la muestra y/o inactivación del material celular lisado,
5 (iii) lisis de cualquier microorganismo tras la separación y/o inactivación,
(iv) contacto de la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como un sustrato para actividad de modificación de ácido nucleico del microorganismo en la muestra,
(v) incubación de la muestra que se ha puesto en contacto de este modo en condiciones adecuadas para la actividad de modificación de ácido nucleico, y
10 (vi) determinación específica de la ausencia o presencia de una molécula de ácido nucleico modificada que es el resultado de la acción de la actividad de modificación de ácido nucleico en la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la ausencia o presencia del microorganismo;

o

(a) centrifugación de la muestra para formar un aglomerado que contiene microorganismos cuando están presentes en la muestra,
(b) separación del sobrenadante desde el aglomerado,
(c) lisis de cualquier microorganismo en el aglomerado,
20 (d) contacto de la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como un sustrato para actividad de modificación de ácido nucleico del microorganismo en la muestra,
(e) incubación de la muestra que se ha puesto en contacto de este modo en condiciones adecuadas para la actividad de modificación de ácido nucleico, y
(f) determinación específica de la ausencia o presencia de una molécula de ácido nucleico modificada que es el resultado de la acción de la actividad de modificación de ácido nucleico en la molécula de ácido nucleico sustrato para indicar la ausencia o presencia del microorganismo; y, opcionalmente, donde etapas (iii) y (iv) o (c) y (d)
25 respectivamente se realizan conjuntamente, opcionalmente, donde se añade a la muestra la molécula de ácido nucleico junto con un reactivo de lisis.

14. Uso del método tal como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para:

(a) explorar la resistencia de un microorganismo a un agente dirigido contra un microorganismo;
(b) identificar sistemáticamente agentes candidato que puedan ser capaces de eliminar o prevenir el crecimiento de uno o más microorganismos;
(c) diagnosticar una infección o una enfermedad asociada con la presencia de un microorganismo en un sujeto; o
35 (d) detectar la presencia de contaminación de microorganismo en una muestra que contiene plaquetas o una muestra de sangre.

15. Un kit para llevar a cabo un método tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 que comprende:

(a) al menos una molécula de ácido nucleico que actúa como un sustrato para actividad de modificación de ácido nucleico del microorganismo en la muestra, donde la al menos una molécula de ácido nucleico es al menos parcialmente de doble cadena y comprende restos uracilo en la cadena complementaria, **caracterizado por que** la molécula de ácido nucleico se modifica para protegerla de actividad de nucleasa, y
45 (b) al menos una molécula de ácido nucleico de control positivo interno (IPC) que comprende sitios de unión a cebador idénticos a la molécula de ácido nucleico de tal modo que hay competencia por la unión a cebador en una reacción de amplificación de ácido nucleico que contiene tanto la molécula de ácido nucleico como la IPC.

16. El kit de la reivindicación 15 donde la modificación de la molécula de ácido nucleico se selecciona entre incorporación de nucleótidos sintéticos, incorporación de metilación y protección de los extremos 3' y/o 5'; opcionalmente, donde los nucleótidos sintéticos comprenden nucleótidos fosforotioato y/o nucleótidos de ácidos nucleicos cerrados; y opcionalmente donde la actividad de modificación de ácido nucleico comprende actividad de polimerasa.

17. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 15 o 16 donde el kit comprende además una sonda de ácido nucleico que se une a una secuencia de sonda diana dentro de la molécula de ácido nucleico, opcionalmente, donde la sonda de ácido nucleico está marcada, y opcionalmente, donde el kit comprende además otra sonda de ácido nucleico adicional que se une a una secuencia de sonda diana dentro de la molécula de ácido nucleico IPC, opcionalmente, donde la sonda de ácido nucleico adicional está marcada, y opcionalmente, donde la sonda de ácido nucleico no se une a la molécula de ácido nucleico IPC y la sonda de ácido nucleico adicional no se une a la molécula de ácido nucleico y, opcionalmente, donde la sonda de ácido nucleico y la sonda de ácido nucleico adicional están marcadas de forma diferente.

18. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17 donde la cadena complementaria de la molécula de ácido nucleico comprende una modificación en el extremo 3' para evitar la extensión, opcionalmente, donde la modificación en el extremo 3' comprende la incorporación de un nucleótido no extensible, opcionalmente, donde el

nucleótido no extensible es un didesoxi nucleótido trifosfato (ddNTP), opcionalmente donde el ddNTP es didesoxi Citidina.

- 5 19. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, donde la molécula de ácido nucleico IPC se modifica para protegerla de actividad de nucleasa, opcionalmente, donde la modificación de la molécula de ácido nucleico IPC se selecciona entre incorporación de nucleótidos sintéticos, incorporación de metilación y protección de los extremos 3' y/o 5' y, opcionalmente, donde los nucleótidos sintéticos comprenden nucleótidos fosforotioato y/o nucleótidos de ácidos nucleicos cerrados.
- 10 20. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19 donde el kit comprende además un reactivo de pH alto, opcionalmente, donde el reactivo de pH alto comprende NaOH o Na₂CO₃; y/u opcionalmente, donde el kit comprende además un agente para disminuir el pH.

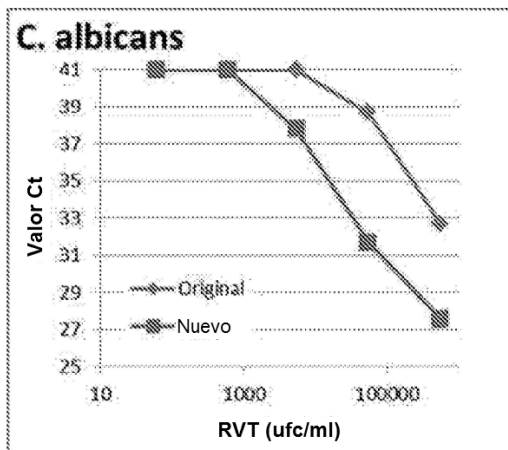


Fig. 1a

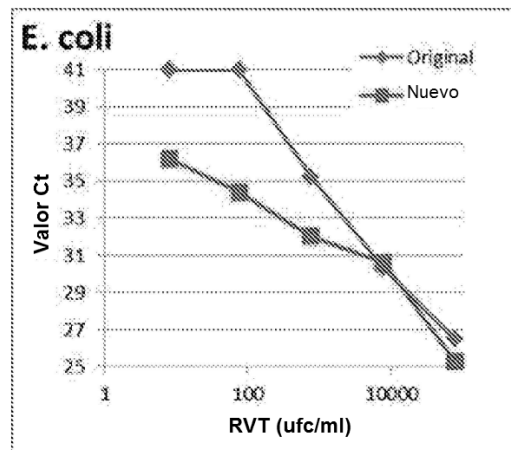


Fig. 1b

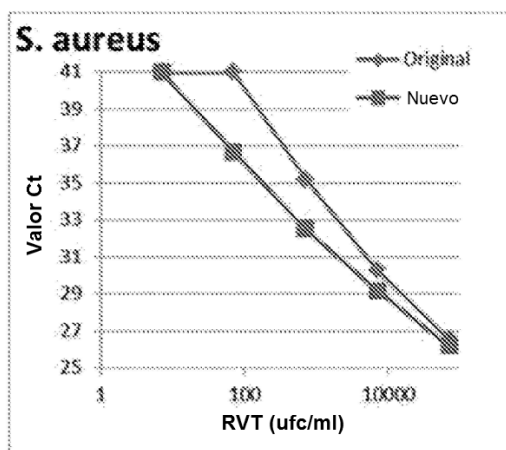


Fig. 1c

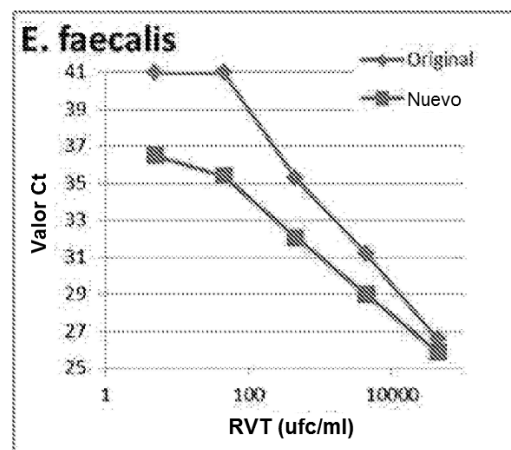


Fig. 1d

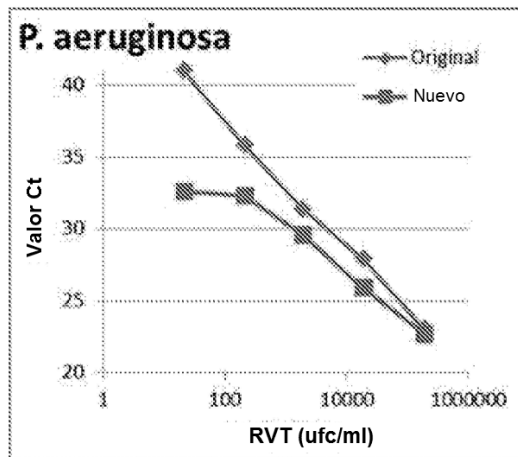


Fig. 1e

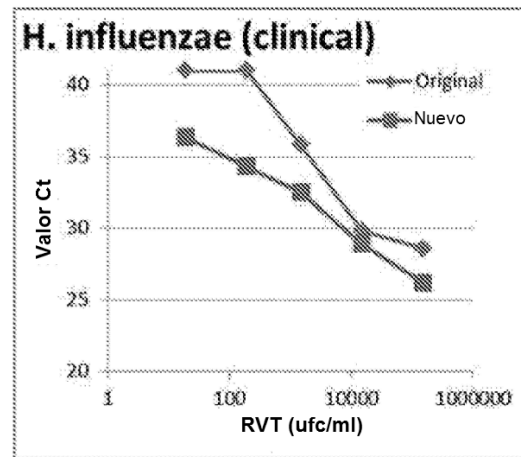


Fig. 1f

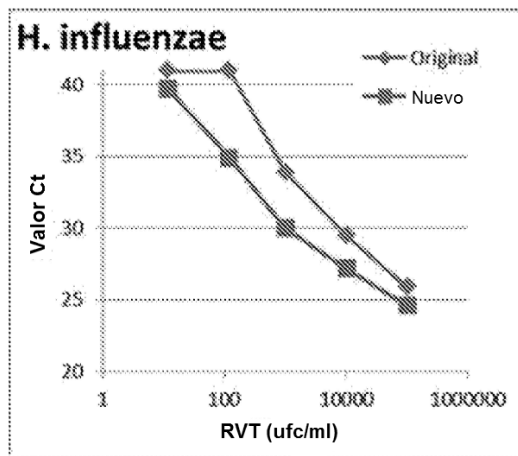


Fig. 1g

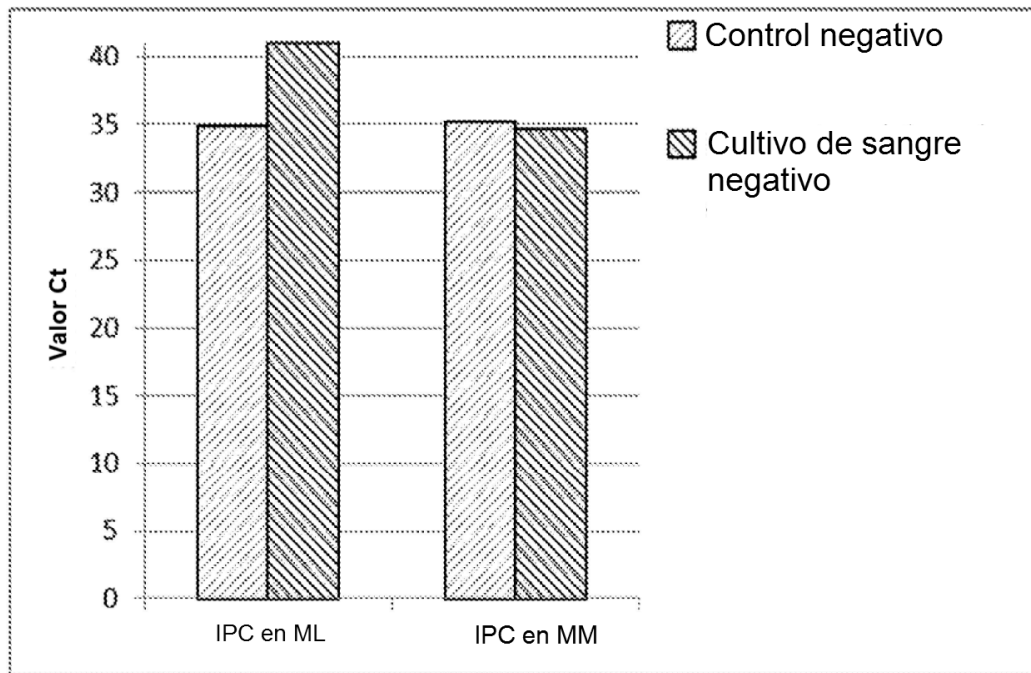


Fig. 2

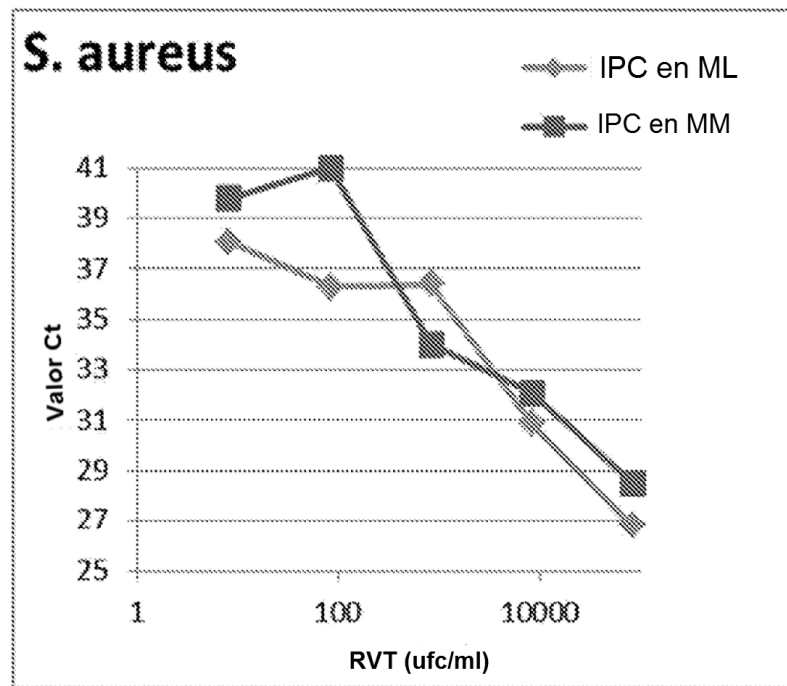


Fig. 3

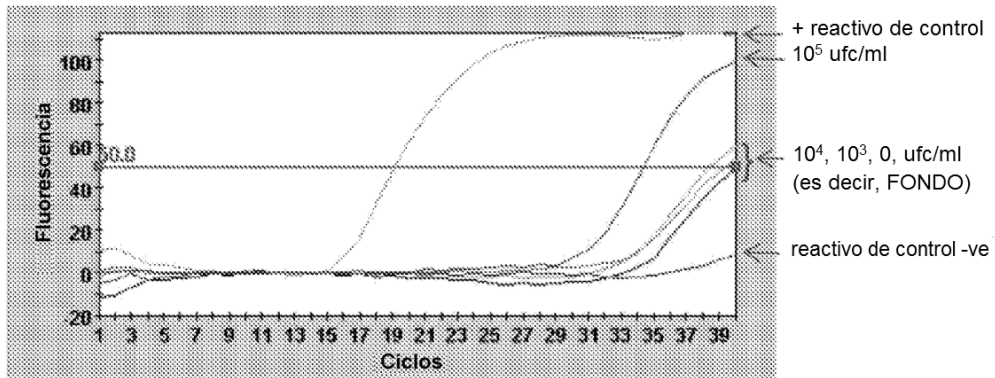


Fig. 4a

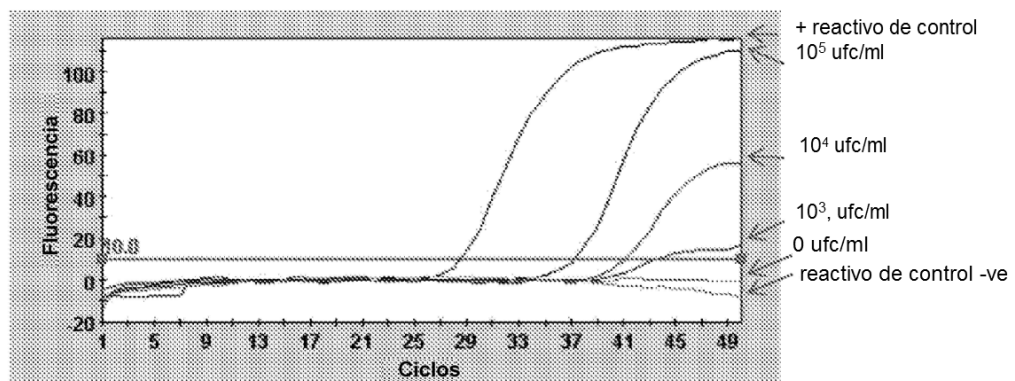


Fig. 4b

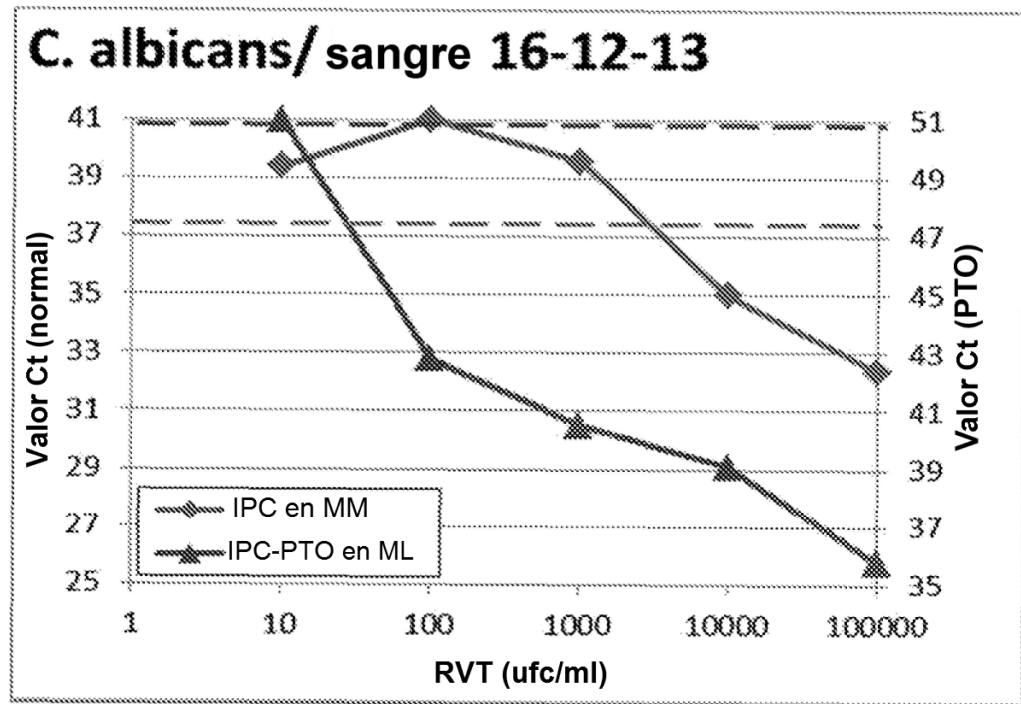


Fig. 5

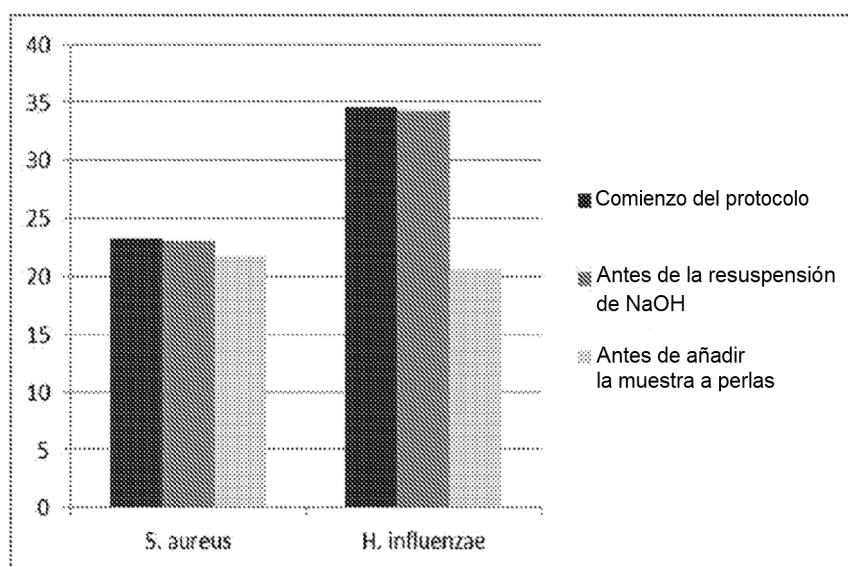


Fig. 6

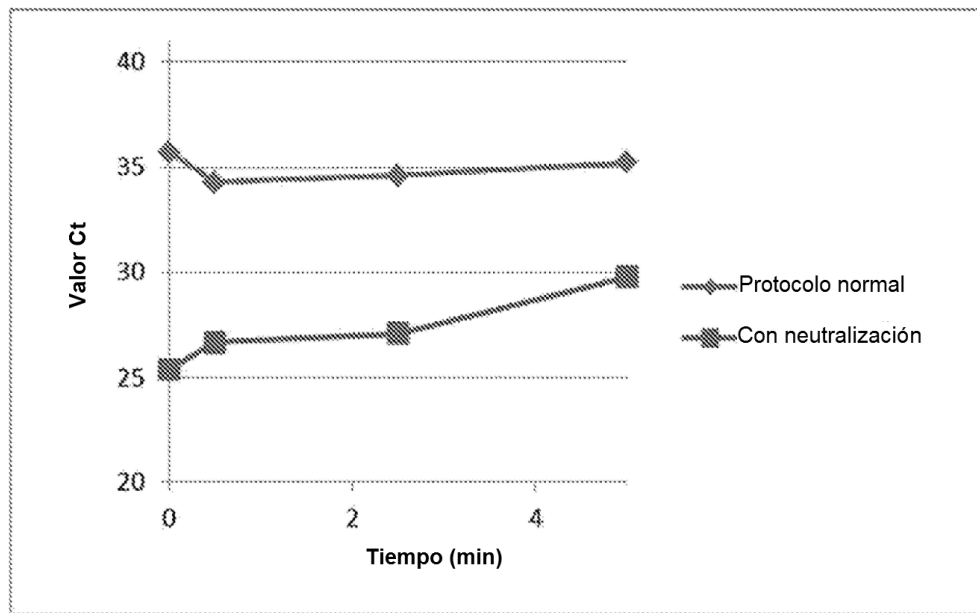


Fig. 7

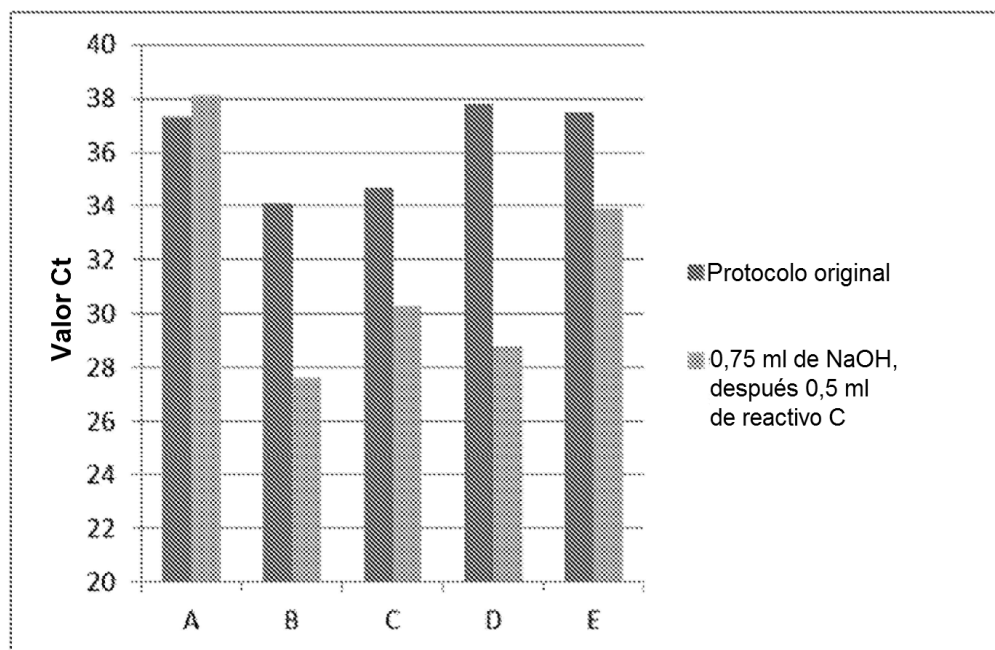


Fig. 8

95 °C(+) frente a 95 °C (-) en los momentos 0, 2 y 20 horas:
datos T2 solamente

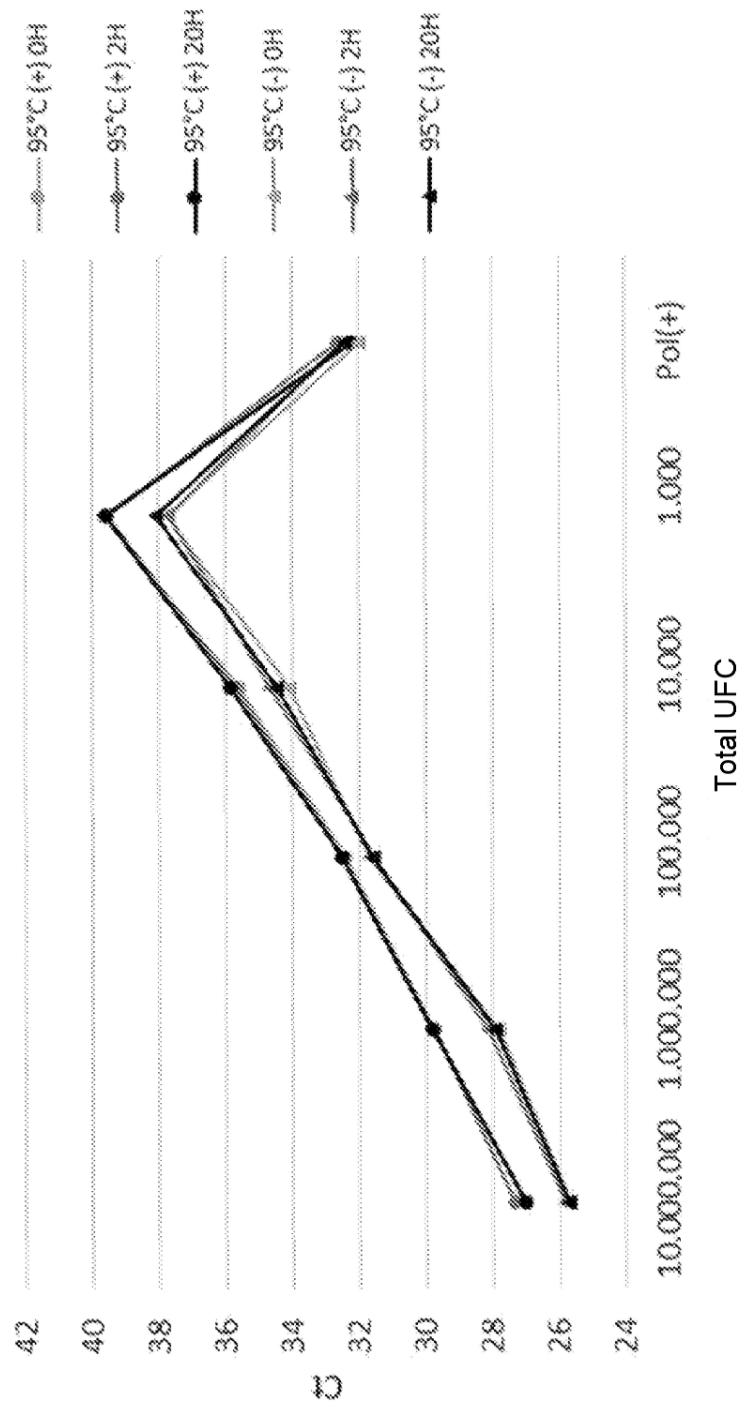


Fig. 9A

95 °C(+) frente a 95 °C (-) en los momentos 0, 2 y 20 horas:
datos T3 solamente

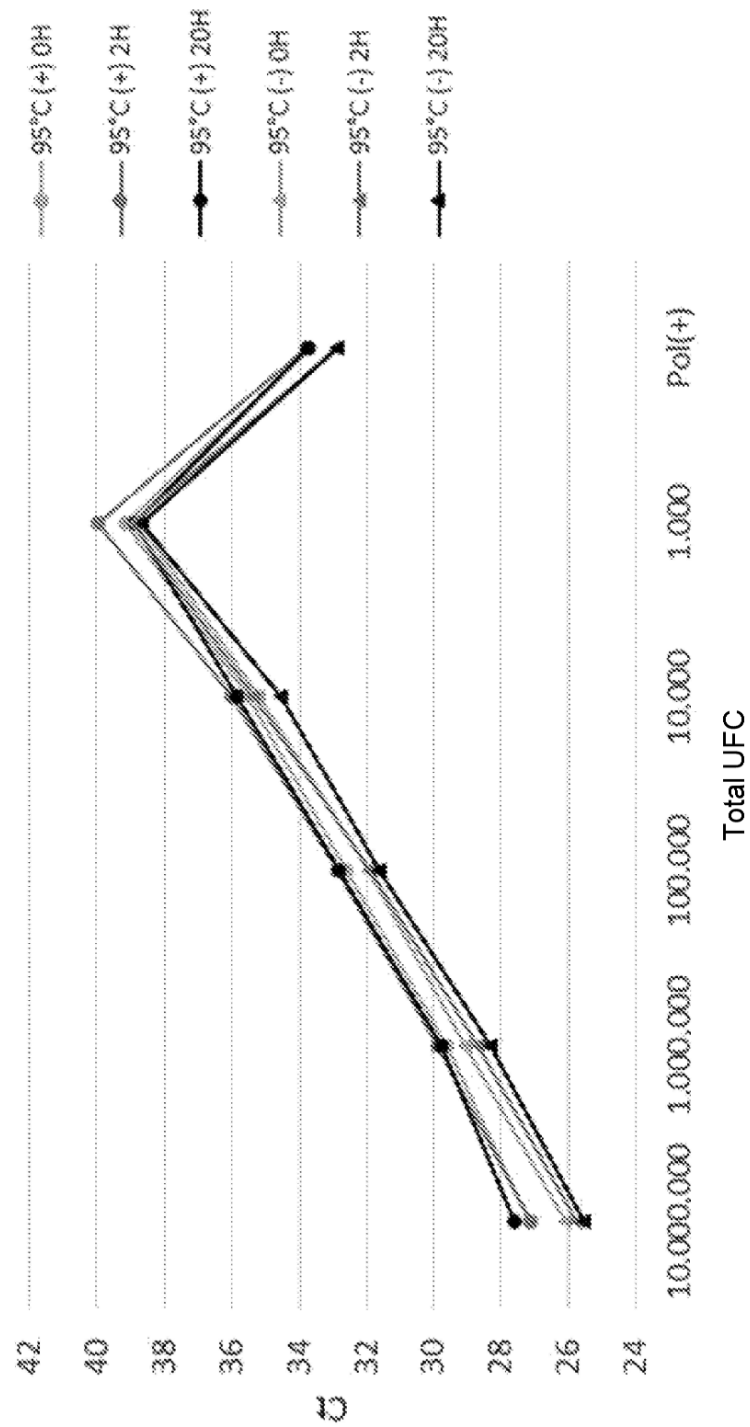


Fig. 9B

95 °C(+) frente a 95 °C (-) en los momentos 0, 2 y 20 horas:
datos T4 solamente

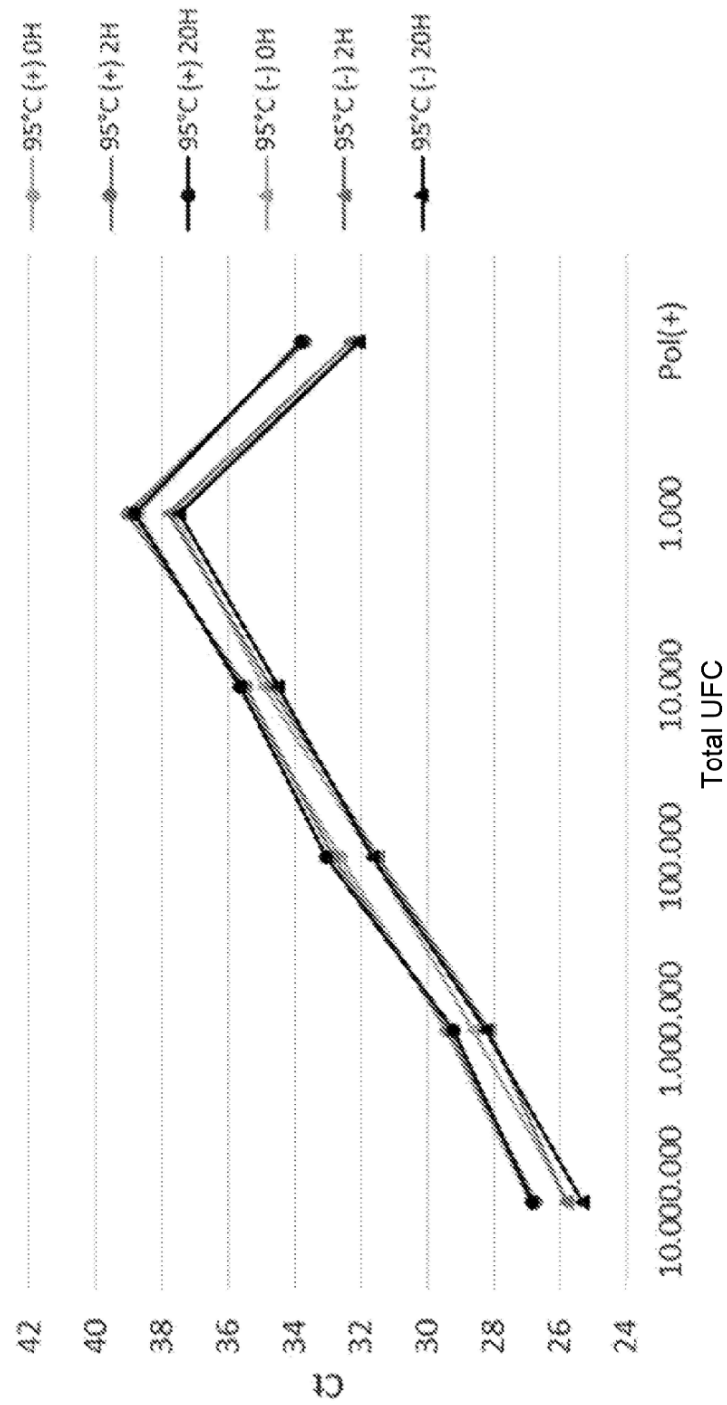


Fig. 9C

95 °C(+) frente a 95 °C (-) en los momentos 0, 2 y 20 horas: datos de 4 experimentos para el momento 0 horas y 3 experimentos para el momento 2 y 20 horas

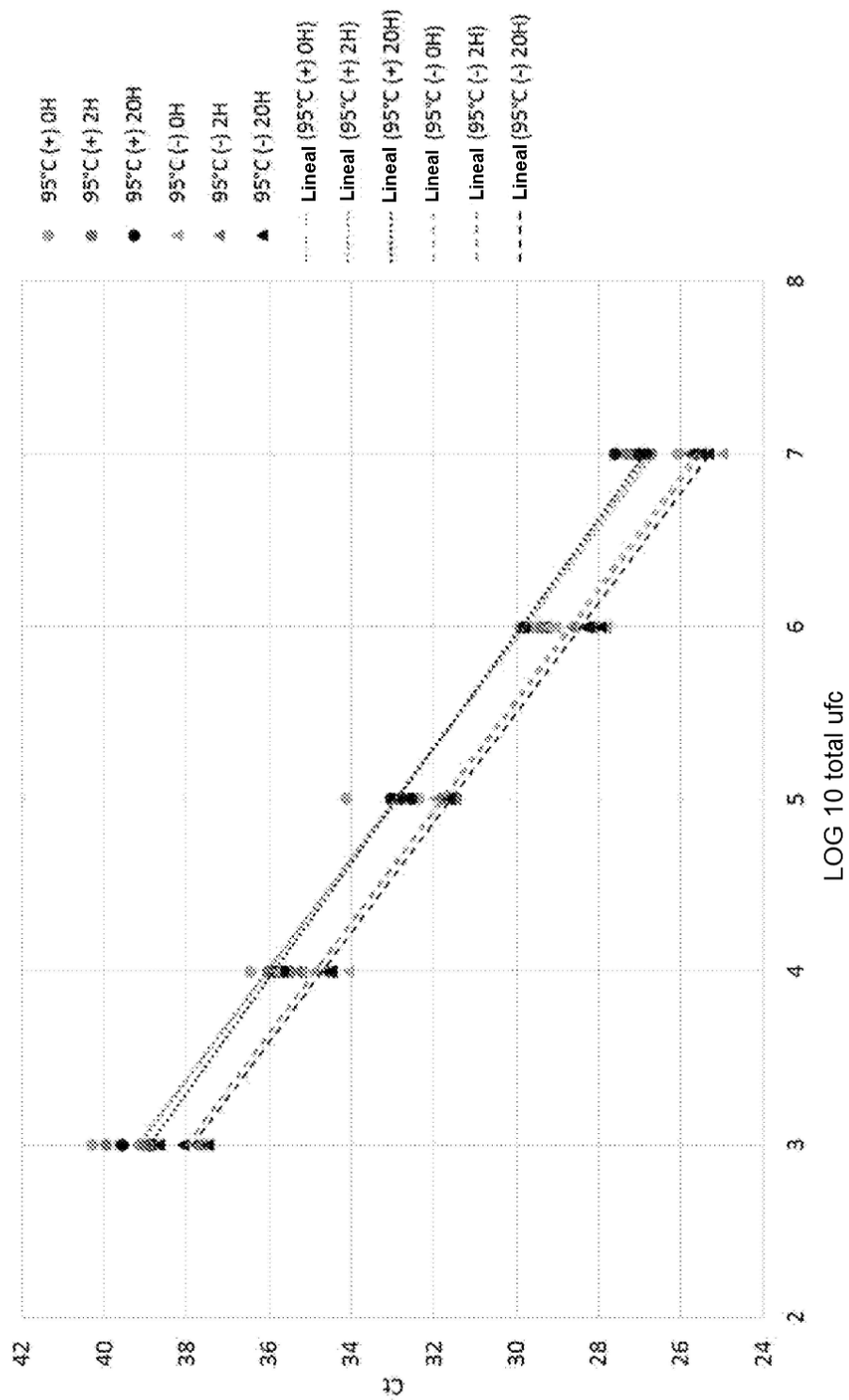


Fig. 10

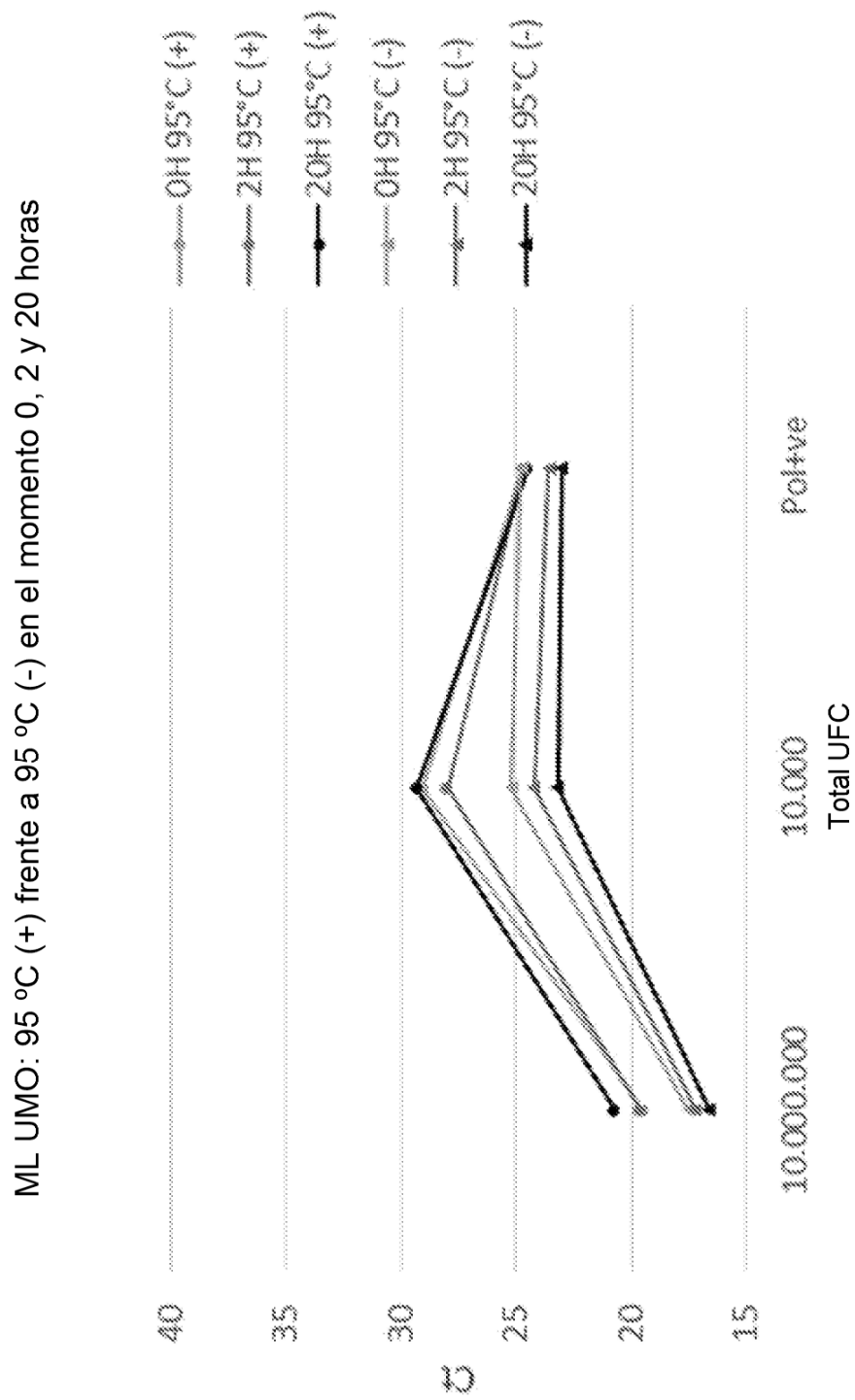


Fig. 11A

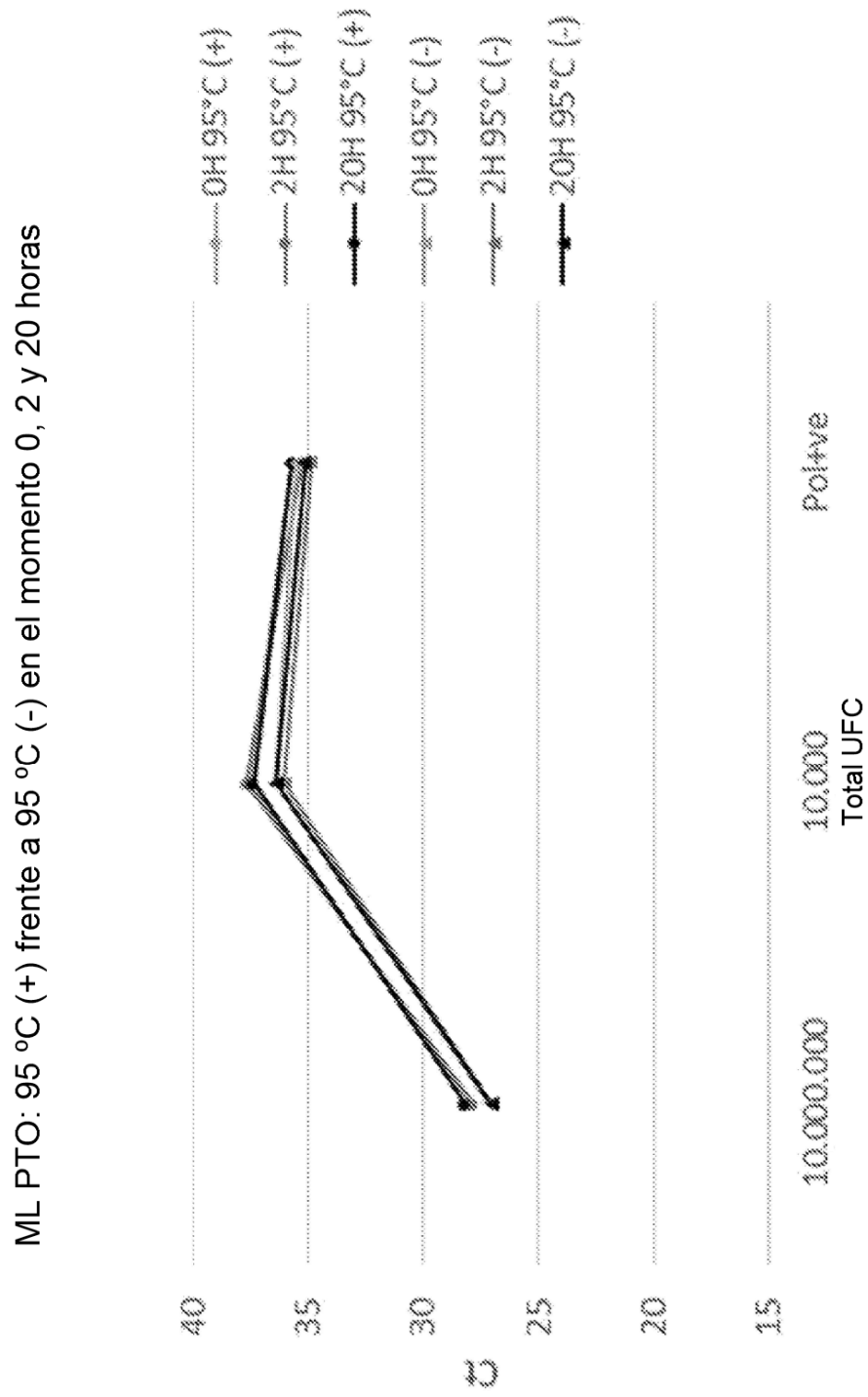


Fig. 11B

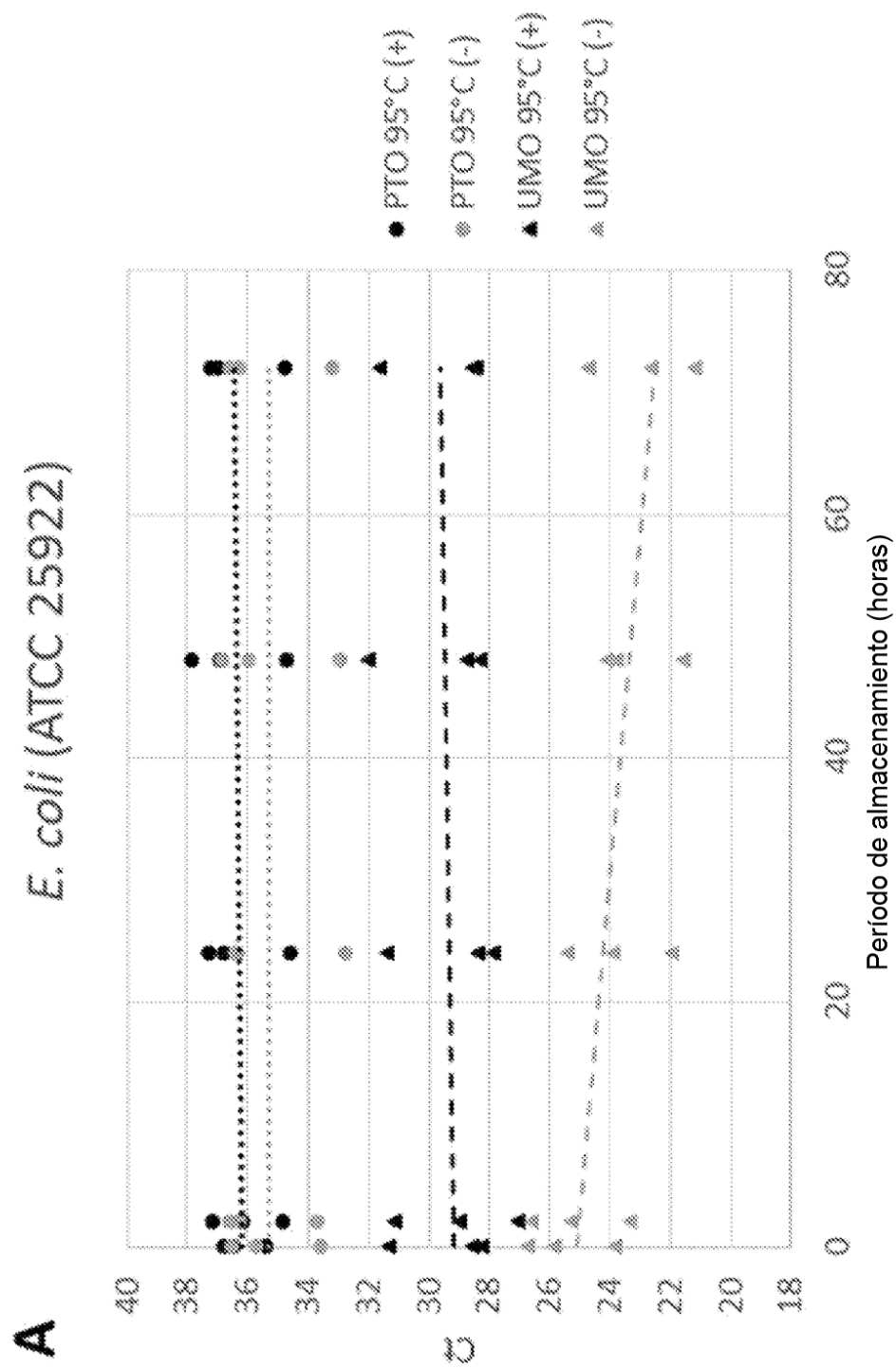


Fig. 12A

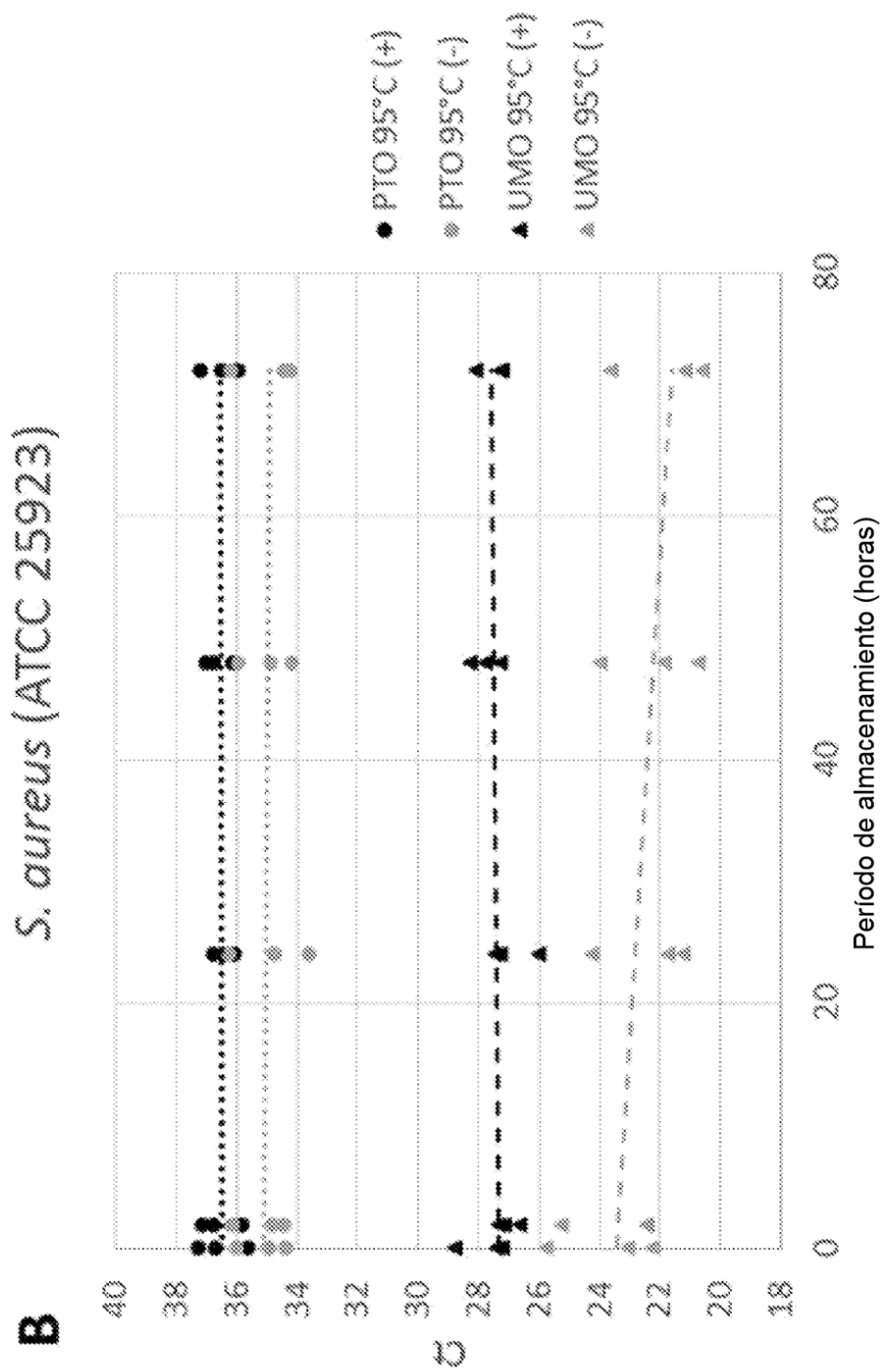


Fig. 12B

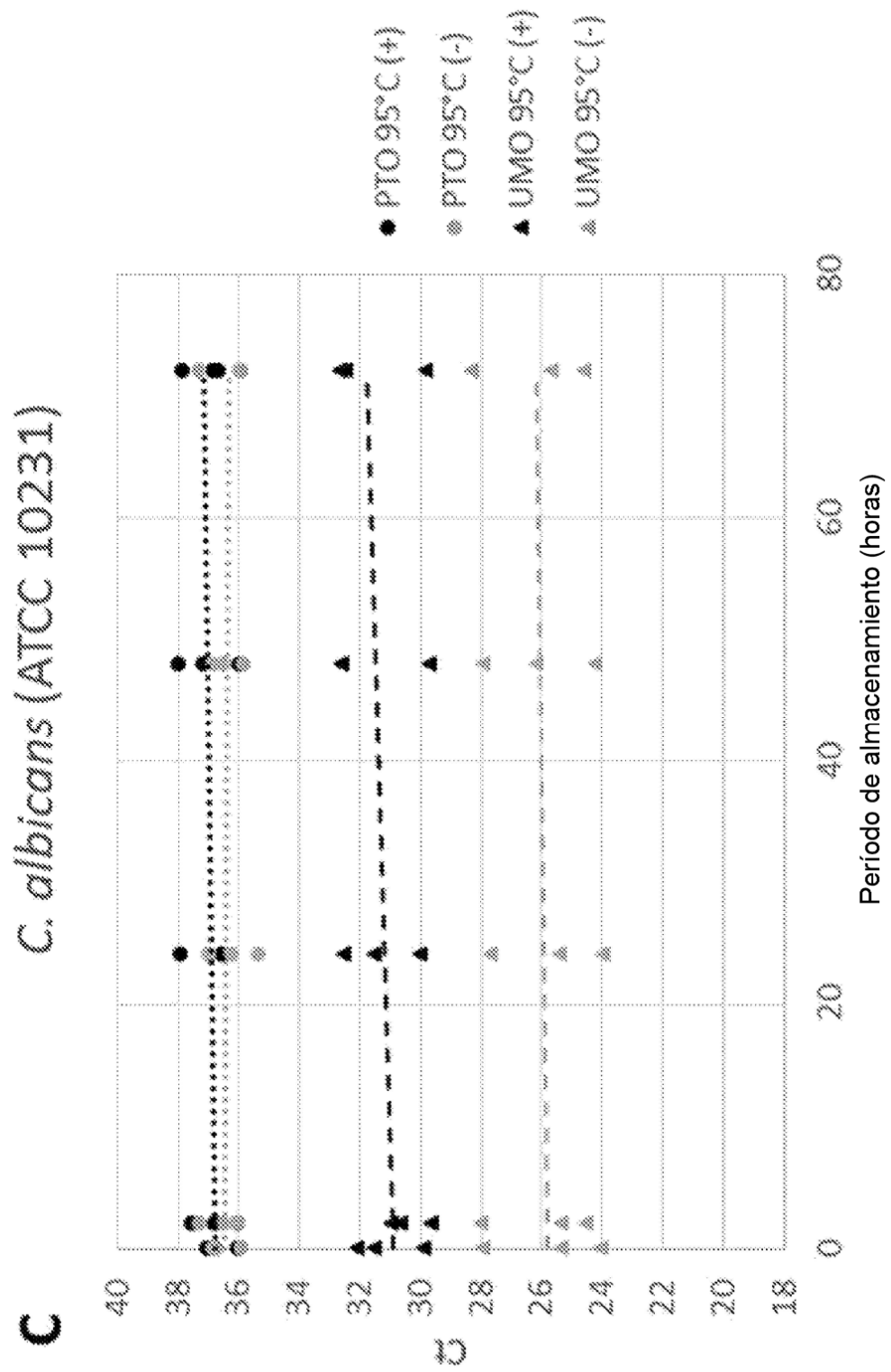


Fig. 12C

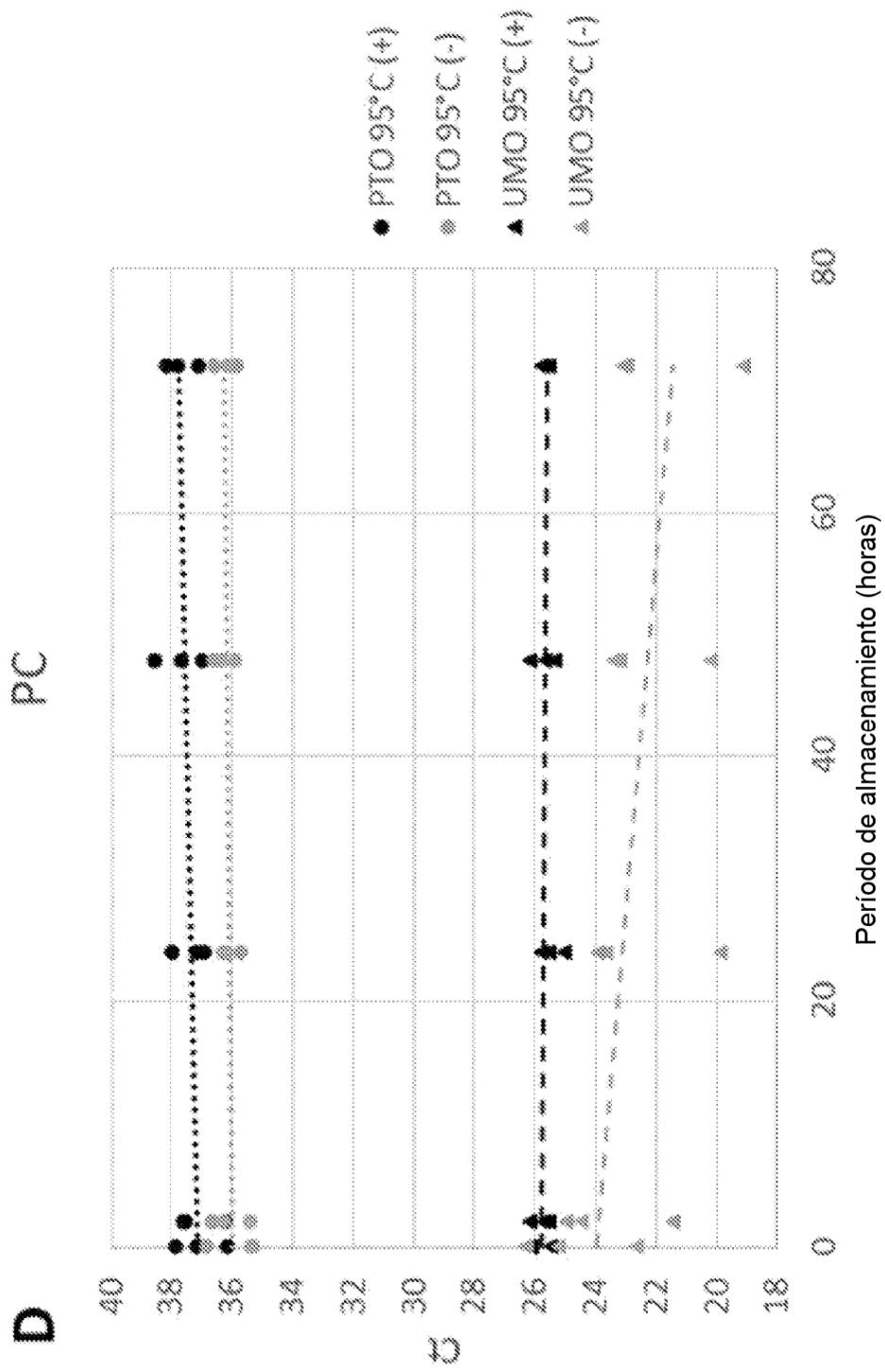


Fig. 12D

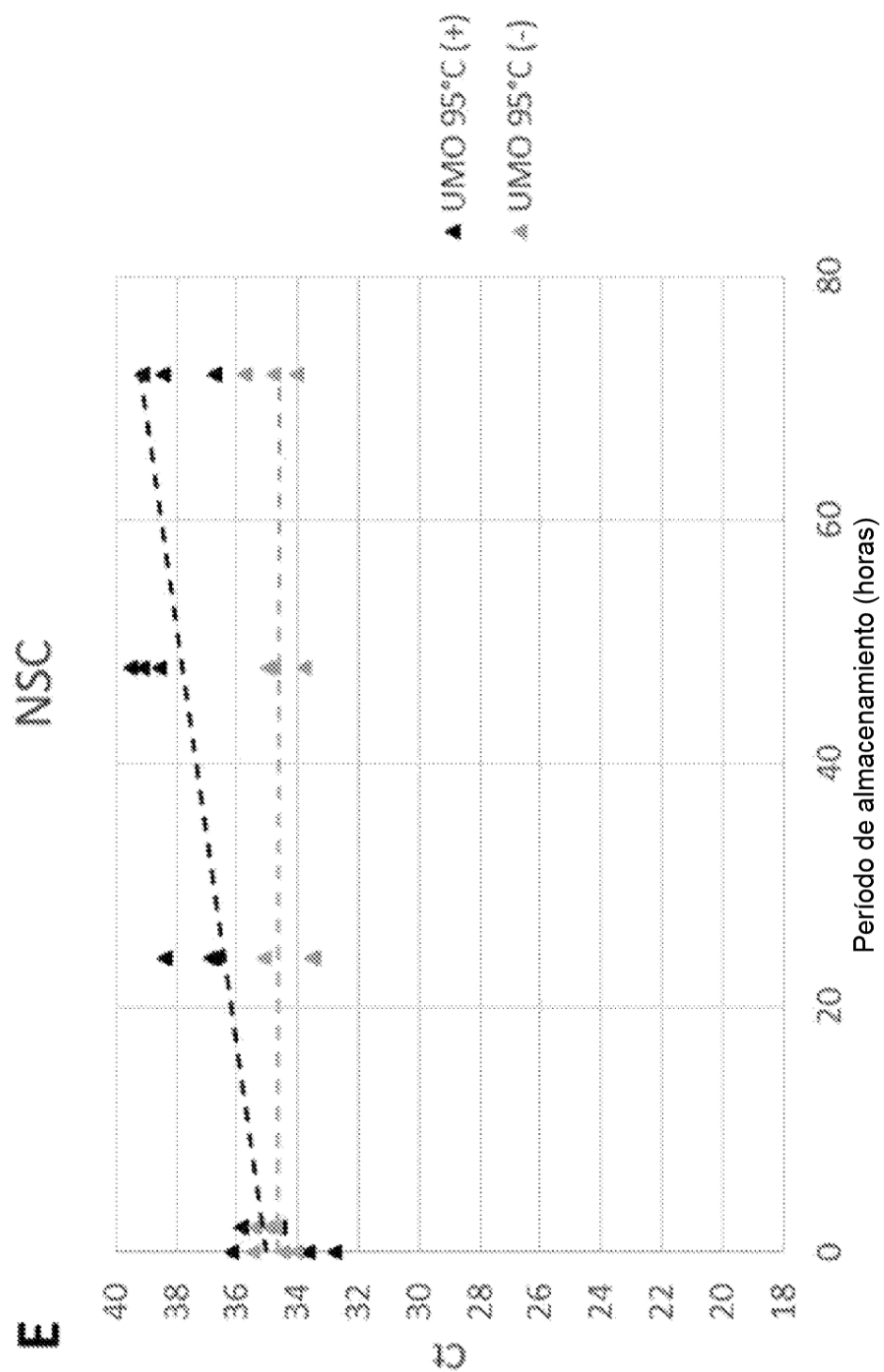


Fig. 12E