

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 509**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/689 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.10.2014 PCT/EP2014/072227**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2015 WO15055768**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2014 E 14792764 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 3066210**

54 Título: **Detección de Streptococcus pneumoniae**

30 Prioridad:

17.10.2013 EP 13382411

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

06.05.2019

73 Titular/es:

**GENOMICA S.A.U. (100.0%)
Parque Empresarial Alvento Edificio B Calle Vía
de los Poblados, 1 - 1a planta
28033 Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**MORAGA QUINTANILLA, ANA ISABEL y
VILLAHERMOSA JAÉN, MARÍA LUISA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 711 509 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Detección de *Streptococcus pneumoniae*

5 **Antecedentes de la invención**

Streptococcus pneumoniae es el agente causal de sepsis, y sería conveniente ser capaces de detectar específicamente su presencia en la sangre. *Streptococcus pneumoniae* es también la principal causa de neumonía adquirida comunitaria. Es de gran importancia ser capaces de distinguir *Streptococcus pneumoniae* de entre otros miembros del grupo de Estreptococos, con el fin de determinar si cualquiera de los *Streptococcus* presentes en una muestra se corresponde actualmente con la especie patógena *Streptococcus pneumoniae* o con otras especies inoñas de *Streptococcus* que están presentes constitutivamente en el huésped, y que no producen una enfermedad.

15 Se han llevado a cabo muchos intentos con el fin de detectar *Streptococcus pneumoniae* y distinguirlo de otros miembros del grupo de Estreptococos (Wessels et al., J. Clin. Microbiol. April 2012 vol. 50 no. 4 1171-1177). Estos incluyen el ensayo de cultivos y ensayos bioquímicos y fenotípicos convencionales, tales como la morfología con tinción de Gram, la susceptibilidad a la optoquina, la morfología de colonias y la alfa hemólisis en agar sangre de oveja. Las técnicas adicionales que se han utilizado incluyen: MALDI-TOF (espectrometría de masas con desorción ionización por láser asistida por matriz con tiempo de vuelo), análisis de secuencia de varios genes, y análisis molecular que incluye un ensayo de PCR en tiempo real. La mayoría de estas técnicas, sin embargo, no permite discriminar *Streptococcus pneumoniae* de otros miembros del grupo de Estreptococos, debido a la alta similitud de secuencia entre las diferentes especies. Otras técnicas incluyen métodos moleculares basados en la amplificación de la región del gen *rpoB* para la detección de bacterias del género *Streptococcus*. Dos ejemplos particulares de esta estrategia se proporcionan en los documentos EP 1558637 y EP 1694861.

20 El documento EP 1558637 utiliza fragmentos de 724 pb del gen *rpoB* (representado en la SEQ ID N.º 12 del documento WO 2004/041841), para la detección de bacterias del género *Streptococcus* que puede estar presente en una muestra. Dicha detección puede tener lugar mediante la amplificación del fragmento indicado. Sin embargo, no se ha proporcionado una sonda en particular para la detección específica de diferentes especies del género *Streptococcus*.

25 En el documento EP1694861 se amplifica un fragmento del gen *rpoB* con un par de cebadores que son comunes a todas las especies del género *Streptococcus*. Se obtiene de esta manera un producto de amplificación, independientemente de la especie en particular que puede estar presente en la muestra, como en el documento EP 1558637 anterior. En el presente caso, se proporcionan sondas, que tienen la intención de la detección específica de *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes* (Tabla 3 del documento WO 2005/059156 correspondiente). Las mínimas diferencias de secuencia entre algunas de las sondas, sin embargo, puede ser difícil que dichas sondas puedan ser útiles actualmente para una detección específica de las dos especies de *Streptococcus* diferentes a las que se dirigen (por ejemplo, las sondas de la SEQ ID N.º 4 y SEQ ID N.º 5, se corresponden con el *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae*, respectivamente, solo se diferencian en dos nucleótidos). No se proporcionan sondas adicionales correspondientes a otras especies del género *Streptococcus*.

30 En vista de la información anterior, existe la necesidad de proporcionar métodos eficaces basados en hibridación de sondas para la detección específica de *Streptococcus pneumoniae* vs otras especies del género *Streptococcus*. En otras palabras, el altamente deseable proporcionar un método que permita la detección diferencial del *Streptococcus pneumoniae* presente en la muestra, es decir la detección específica de *Streptococcus pneumoniae* distinguida de otras especies del género *Streptococcus*.

Sumario de la invención

35 El problema que se tiene que resolver por la presente invención es la provisión de un método para la detección de un *Streptococcus pneumoniae* presente en una muestra, que permite distinguir específicamente el *Streptococcus pneumoniae* de otras especies del género *Streptococcus*.

40 La solución se basa en el uso simultáneo que utiliza las sondas que comprenden o consisten en las SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2 (véase la Tabla 1 posterior) para detectar la presencia de *Streptococcus pneumoniae* en una muestra. En una realización, la sonda consiste en la SEQ ID N.º 1 o SEQ ID N.º 2.

45 Como se ha indicado anteriormente, existe una alta similitud de secuencia entre las diferentes especies del género *Streptococcus*; esta circunstancia constituye una pesada carga cuando se intenta detectar el *Streptococcus pneumoniae* y distinguirlo específicamente de otras especies de *Streptococcus*, mediante la hibridación con sondas. Las sondas de SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2 y, por lo tanto, los distintos aspectos de la invención permiten detectar eficazmente el *Streptococcus pneumoniae* y distinguir el *Streptococcus pneumoniae* de, al menos, las siguientes especies del género *Streptococcus*. *Streptococcus* (*S.*) *constellatus*, *S. anginosus*, *S. mitis*, *S. gallolyticus*, *S. dysgalactiae*, *S. pyogenes*, *S. suis*, *S. intermedius*, *S. sanguinis*, *S. oralis* y *S. parasanguinis*.

65

- En consecuencia, con distintos aspectos de la invención, se lleva a cabo la detección simultánea mediante la hibridación con las dos sondas que se definen en las SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2 para la detección específica de *Streptococcus pneumoniae*. Solo cuando el ADN presente en una muestra se corresponde con el *Streptococcus pneumoniae*, tiene lugar la unión de ambas sondas. En los casos en los que ninguna o solo una de las sondas de SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2 se unen al ADN presente en una muestra, este ADN no se corresponde con el *Streptococcus pneumoniae*, sino con otra especie del género *Streptococcus*. La única excepción es el caso en el que una muestra contenga ADN de *Streptococcus mitis*, en cuyo caso el ADN de la muestra se une a la sonda de SEQ ID N.º 1 teniendo lugar también la unión al ADN de la sonda de SEQ ID N.º 2 hasta un cierto nivel, pero con mucha menor extensión que a la sonda de SEQ ID N.º 1 (véase el Ejemplo 2, posteriormente). Se entiende que una “extensión mucho menor” significa un nivel de unión de un 20 % o menor que el que se consigue con la SEQ ID N.º 1.

Tabla 1.

SEQ ID N°	Nombre de la sonda	5'-3' Secuencia	Mt	pb	%GC
1	StpnRPO-S.90-AR	GATGGAACCTTTGCTGAGAAGATT	68	24	41,7
2	StpnRPO-S.107-AR	TATACTGTAGCTCAGGCTAACTC	66	23	43,5
3	StpnRPO-S.5-AR	AAACAGGTGTTGTCACGAACGAA	66	23	43,5
4	StpnRPO-S.6-AR	GCTCAGGCTAACTCTCGTCTGA	68	22	54,5
5	StpnRPO-S.106-AR	GAACCTTTGCTGAGAAGATT	56	20	40

- 15 Las sondas que se definen en las SEQ ID N.º 3, SEQ ID N.º 4 y SEQ ID N.º 5 de la Tabla 1 también se unen a los ácidos nucleicos de *Streptococcus pneumoniae*. Sin embargo, han probado no ser específicas, ya que también se unen arbitrariamente a los ácidos nucleicos de otras especies del género *Streptococcus*, sin seguir ninguna clase de patrón predecible.
- 20 Los inventores no tienen conocimiento de que haya nada que sea puntero en el estado de la técnica ni en las secuencias de las sondas para explicar por qué la hibridación simultánea con las sondas de SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2 da lugar a la detección del *Streptococcus pneumoniae*, de una manera que permitiría distinguirlo de una manera específica de entre las otras especies del género *Streptococcus*. No se ha encontrado explicación si es por la temperatura de fusión, número de nucleótidos, % de GC (Tabla 1), o en el número de nucleótidos por lo que estas sondas diferencian la secuencia del *Streptococcus pneumoniae* de tipo silvestre (Tabla 2).
- 25

Tabla 2. Número de nucleótidos por los que las sondas de SEQ ID N.º 1 a 5 diferencian la secuencia de *Streptococcus pneumoniae* de tipo silvestre y las secuencias de otras especies del género *Streptococcus*:

	SEQ ID N° 1	SEQ ID N° 2	SEQ ID N° 3	SEQ ID N° 4	SEQ ID N° 5
<i>S. constellatus</i>	10	7	4	7	9
<i>S. anginosus</i>	8-9	6-7	4-5	8	8-9
<i>S. mitis</i>	3	3	2	3	3
<i>S. gallolyticus</i>	5-6	3-4	5-6	5-6	5-6
<i>S. dysgalactiae</i>	6	6	8	8	6
<i>S. pyogenes</i>	6	6	8-9	7-8	6
<i>S. suis</i>	11	7	9	9	8
<i>S. intermedius</i>	7	8	8	8	6
<i>S. sanguinis</i>	9-10	4-5	5-6	4-5	7-9
<i>S. oralis</i>	3-10	3-6	3-4	3-7	3-8
<i>S. parasanguinis</i>	8-9	4	4	5	7-8
<i>S. pneumoniae</i>	0	0	0	0	0

- 30 Se han detectado a veces diferentes variantes de la secuencia de ciertas especies. Esta es la razón por la que a veces el número de nucleótidos por los que una cierta sonda diferencia la secuencia de ciertas especies de *Streptococcus* varía entre dos valores.

Los inventores han descubierto sorprendentemente que la incubación simultánea con las sondas que se definen por las SEQ ID N.º 1 y la SEQ ID N.º 2 permite detectar y distinguir específicamente el *Streptococcus pneumoniae* de otras especies del género *Streptococcus*. Por lo tanto, el uso simultáneo de las sondas de SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2 proporciona una solución al problema de la detección específica de *Streptococcus pneumoniae* en una muestra. Esto es de gran importancia para distinguir el *Streptococcus pneumoniae* de otros microorganismos; en particular, de las especies de *Streptococcus* inocuas presentes constitutivamente en el huésped y que no causan enfermedad, en particular, en el tracto respiratorio. Esto también es importante para la detección de la presencia de *Streptococcus pneumoniae* en la sangre como agente causante de sepsis.

Uno de los aspectos de la presente invención se corresponde por lo tanto con un método para la detección de *Streptococcus pneumoniae* en una muestra de ensayo, estando definido dicho método por la reivindicación 1.

Las realizaciones de distintos aspectos de la presente invención se definen por las reivindicaciones dependientes.

Un segundo aspecto de la presente invención se corresponde con un kit para la detección del *Streptococcus pneumoniae* en una muestra de ensayo, en el que dicho kit comprende un vaso de matriz o conjunto de vasos de matriz, que cada uno comprende una micromatriz en la que se proporcionan ambas sondas de SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2, y una mezcla de amplificación con cebadores de amplificación de PCR que dan lugar a la amplificación de productos que incluyen la región que se hibrida con las sondas de SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2.

Un tercer y cuarto aspectos de la presente invención se corresponden respectivamente con un conjunto de sondas que comprende las sondas de SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2, y una micromatriz que comprende este conjunto de sondas. También se describe un ácido nucleico aislado que consiste en la SEQ ID N.º 1 y una micromatriz que comprende la SEQ ID N.º 1. La secuencia de ácido nucleico aislado se puede marcar con un resto detectable. Adicionalmente se describe una secuencia de ácido nucleico que consiste en la SEQ ID N.º 2 y una micromatriz que comprende la SEQ ID N.º 2. La secuencia de ácido nucleico puede estar marcada con un resto detectable. También se desvela una composición que comprende la SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2.

Aspectos adicionales de la presente invención se corresponden con el uso del kit, micromatriz, secuencia de ácido nucleico aislado o conjunto de sondas de la invención para la detección *in vitro* de *Streptococcus pneumoniae*, y para el diagnóstico de una infección por *Streptococcus pneumoniae* en una muestra de un paciente. En particular, la infección es una infección séptica o respiratoria.

Un método para el diagnóstico de una infección por *Streptococcus pneumoniae* en un paciente comprende poner en contacto una muestra de dicho paciente con las sondas que se definen por la SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1.

La Figura 1 muestra la visualización de la hibridación de los productos de amplificación del Ejemplo 1 de la presente invención, previamente desnaturalizados, con una micromatriz que comprende las sondas de SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2 de la presente invención. Los "puntos" rodeados por rectángulos se corresponden con las posiciones de las sondas de SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2. De los dos "puntos" rodeados por cada rectángulo, el primer se corresponde con la SEQ ID N.º 1 y el segundo con la SEQ ID N.º 2. Los dos "puntos" fuera de los rectángulos que representan una señal, se corresponden con los Marcadores de Posición. La muestra del Ejemplo 1, que contiene *Streptococcus pneumoniae* presenta una señal positiva y de igual intensidad, en ambas posiciones que se corresponden con sondas de las SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2. Esto es debido a la unión específica de ambas de estas sondas del ADN amplificado y desnaturalizado de la muestra.

Figura 2.

La Figura 2 representa la visualización de la hibridación de los productos de amplificación del Ejemplo 2 de la presente invención, previamente desnaturalizados, con una micromatriz que comprende las sondas de SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2 de la presente invención. Los "puntos" rodeados por rectángulos se corresponden con las posiciones de las sondas de SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2. De los dos "puntos" rodeados por cada rectángulo, el primer se corresponde con la SEQ ID N.º 1 y el segundo con la SEQ ID N.º 2. Los dos "puntos" fuera de los rectángulos que representan una señal, se corresponden con los Marcadores de Posición. La muestra del Ejemplo 2, que contiene *Streptococcus mitis* presenta una señal positiva en la posición que se corresponde con la sonda de la SEQ ID N.º 1, una señal de mucha menor intensidad en la sonda de la SEQ ID N.º 2. La señal que aparece en la posición de la SEQ ID N.º 2 tiene una intensidad de menos del 20 % de la que aparece en la posición de la SEQ ID N.º 1.

Figura 3.

La Figura 3 muestra la visualización de la hibridación de los productos de amplificación del Ejemplo 3 de la presente invención, previamente desnaturalizados, con una micromatriz que comprende las sondas de SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2 de la presente invención. Los "puntos" rodeados por rectángulos se corresponden con las posiciones de las sondas de SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2. De los dos "puntos" rodeados por cada rectángulo, el primer se corresponde con la SEQ ID N.º 1 y el segundo con la SEQ ID N.º 2. Los dos "puntos" fuera de los rectángulos que representan una señal, se corresponden con los Marcadores de Posición. La muestra del

Ejemplo 3, que contiene *Streptococcus oralis* presenta una señal positiva solo en la posición correspondiente a la sonda de la SEQ ID N.º 2, y no presenta señal en la posición de la sonda de la SEQ ID N.º 1.

Figura 4.

5 La Figura 4 muestra la visualización de la hibridación de los productos de amplificación del Ejemplo 4 de la presente invención, previamente desnaturalizados, con una micromatriz que comprende las sondas de SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2 de la presente invención. Los “puntos” rodeados por rectángulos se corresponden con las posiciones de las sondas de SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2. De los dos “puntos” rodeados por cada rectángulo, el primer se corresponde con la SEQ ID N.º 1 y el segundo con la SEQ ID N.º 2. Los dos “puntos” fuera de los rectángulos que representan una señal, se corresponden con los Marcadores de Posición. La muestra del
10 Ejemplo 4, que contiene *Streptococcus dysgalactiae* no presenta ningún tipo de señal en las posiciones de las sondas de la SEQ ID N.º 1 ni de la SEQ ID N.º 2.

Descripción detallada de la invención

15 En los siguientes párrafos, se definen diferentes aspectos de la presente invención con más detalle. Cada aspecto así definido se puede combinar con cualquiera otro aspecto o aspectos a menos de que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica que se indique como preferida o especialmente ventajosa se puede combinar con cualquier otra característica o características preferidas o ventajosas.

20 Un primer aspecto de la presente invención se corresponde con un método para la detección de *Streptococcus pneumoniae* en una muestra de ensayo, estando definido el método en la reivindicación 1.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un kit para la detección de *Streptococcus pneumoniae* en una muestra de ensayo, en el que dicho kit comprende un vaso de matriz o conjunto de vasos de matriz, cada uno que comprende una micromatriz en el que se proporcionan ambas sondas de SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2, y una mezcla de amplificación con cebadores de amplificación por PCR que dan lugar a productos de la amplificación que incluyen la región que se hibrida con las sondas de SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2.
25

El tercer y cuarto aspectos de la presente invención, respectivamente, se corresponden con un conjunto de sondas que comprenden las sondas de SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2 y a una micromatriz que comprende este conjunto de sondas. Otros aspectos se refieren a una secuencia de ácido nucleico que consiste en la SEQ ID N.º 1. Otro aspecto se refiere a una secuencia de ácido nucleico que consisten en la SEQ ID N.º 2.
30

Aspectos adicionales de la presente invención se corresponden con el uso del método, kit, micromatriz, secuencia de ácido nucleico o conjunto de sondas de la invención para la detección de *Streptococcus pneumoniae* en un paciente. En particular, la infección es una infección séptica o respiratoria.
35

Un método para el diagnóstico de una infección por *Streptococcus pneumoniae* en un paciente comprende poner en contacto la muestra de dicho paciente con sondas como se definen por las SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2. El método puede comprender una etapa de amplificación como se explica adicionalmente después. Si ambas sondas se hibridan con el ADN presente en la muestra, entonces el paciente se diagnostica de una infección por *Streptococcus pneumoniae*. El método se lleva a cabo preferentemente *in vitro* o *ex vivo*.
40

También se desvela un ensayo para la detección de *Streptococcus pneumoniae* en una muestra de ensayo, comprendiendo el método la puesta en contacto de la muestra con las sondas de las SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2.
45

Definiciones

La expresión “sondas de/como se definen por las SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2” como se utiliza en el presente documento se refiere a ambas secuencias de nucleótidos que se representa como las SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2, pero también a los equivalentes obvios de las mismas, tales como sus secuencias complementarias o las secuencias que tienen una capacidad de unión equivalente a las de la SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2 o de sus secuencias complementarias (por ejemplo, secuencias que se diferencian de las SEQ ID N.º 1 y 2 o de sus secuencias complementarias por 1 mutación en las mismas).
50
55

“Cebador”, “cebador de amplificación” o “cebador de amplificación por PCR” como se utilizan en el presente documento “cebador de una reacción de amplificación de ácido nucleico”. Una “extensión de unión mucho menor” como se utiliza en el presente documento se entiende que significa un nivel de unión del 20 % o menos que el de una referencia. La unión del ADN que se va a ensayar y cualquiera de las sondas tiene lugar mediante hibridación.
60

En realizaciones preferidas, las sondas se proporcionan en una micromatriz, por ejemplo, inmovilizadas en un soporte sólido. Una micromatriz es una colección de puntos de oligonucleótido microscópicos. Una micromatriz de ADN (también conocida como chip genético, chip de ADN, o biochip) es una colección de puntos de ADN microscópicos unidos a una superficie sólida. Las sondas se sintetizan y entonces se unen mediante modificación de superficie a una superficie sólida mediante enlace covalente de una matriz química (mediante epoxi-silano, amino-silano, lisina, poliacrilamida u otros). Las superficies sólidas se conocen en la técnica e incluyen perlas
65

microscópicas.

Por lo tanto, en particular, las sondas de la presente invención pueden estar inmovilizadas en un soporte sólido. Este soporte sólido puede ser en fondo de un vaso de matriz o un soporte sólido diferente unido en el fondo de un vaso de matriz. Esto significa que la superficie de la micromatriz puede ser el fondo plano del vaso de matriz. De manera alternativa, la superficie de la micromatriz puede ser un soporte sólido unido en el fondo del vaso de matriz. Las sondas de la presente invención se pueden incluir en un vaso de matriz individual o en un conjunto de vasos de matriz.

Se describen en el presente documento y de acuerdo con la invención, sondas contenidas en una micromatriz, que se pueden colocar en un portaobjetos o estar contenidas en un vaso de reacciones, que entonces se llama un vaso de matriz. Los vasos de matriz pueden tener diferentes formatos de presentación, que incluyen vasos de matriz individuales, tales como pocillos o tubos, o conjuntos de vasos de matriz dispuestos en tiras de pocillos o de tubos, o placas planas. Habitualmente, las placas consisten en conjuntos de tiras de vasos de matriz. Por lo tanto, la micromatriz de la presente invención puede estar contenida en un vaso de matriz individual. De manera alternativa, dos o más micromatrices pueden estar contenidas en una tira de vasos. En una realización preferida la tira de vasos está constituida por 8 vasos. Además, tres o más vasos de matriz pueden estar dispuestos en un conjunto de tiras de vasos. En otra realización preferida, el conjunto de tiras de vasos es una placa de microtitulación. En otra realización preferida más, la placa de microtitulación está constituida por 96 vasos de matriz.

Las sondas de la presente invención se pueden obtener por diferentes métodos, tales como síntesis química (por ejemplo, por el método del fosfotriéster convencional); o técnicas de modificación genética, por ejemplo, por clonación molecular de plásmidos recombinantes en los que se han insertado las correspondientes secuencias de nucleótidos y que se pueden obtener más tarde por digestión con nucleasas.

De acuerdo con los métodos y el kit de la presente invención, la muestra de ensayo puede amplificarse antes de ponerse en contacto con las sondas de SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2. Este debería ser el caso, en el que cualquiera de los componentes conocidos por el experto que sean necesarios para la amplificación de ácido nucleico y, en particular para la amplificación por PCR, también pueden estar presentes en la mezcla de amplificación. Por lo tanto, también pueden estar presentes los cebadores de amplificación por PCR, los trifosfatos de nucleótidos apropiados, tales como dATP, dCTP, dGTP, dTTP, y una enzima adecuada para la polimerización en la mezcla de los reactivos de amplificación. Se puede utilizar cualquier enzima para la polimerización conveniente. En particular la ADN polimerasa HotStarTaq del kit QIAGEN Multiplex PCR, funciona particularmente bien. Esta ADN polimerasa es una forma modificada de la ADN polimerasa Taq que no tiene actividad polimerasa a temperatura ambiente, y que se activa mediante una incubación de 15 minutos a 95 °C. También se puede utilizar preferentemente cualquier otra enzima con estas características conocida en el estado de la técnica.

Se pueden utilizar condiciones de ciclado térmico convencionales para llevar a cabo la amplificación de acuerdo con la presente invención. Algunas condiciones especialmente preferidas son:

NÚMERO DE CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
1 ciclo	95 °C	15'
40-45 ciclos	95 °C	15-30"
	55-59 °C	15-60"
	68-72 °C	45-60"
1 ciclo	68-72 °C	10'
1 ciclo	4 °C	Para siempre

Algunos cebadores especialmente preferidos para la amplificación por PCR que comprenden cualquiera de las secuencias del grupo formado por la SEQ ID N.º 6 y SEQ ID N.º 7 se presentan en la Tabla 3 posterior. Más preferentemente, los cebadores de amplificación por PCR consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N.º 6 y SEQ ID N.º 7.

Tabla 3

SEQ ID N°	Nombre del cebador	5'-3' Secuencia
6	Stpn5	TCTGAGTTGTCTMACAARCG
7	Stpn6r	GAATACATGCGYTCGCAACRGC
M=A/C; R=A/G; Y=C/T		

No es esencial que los cebadores de amplificación sean los de las SEQ ID N.º 6 y SEQ ID N.º 7. Se pueden utilizar alternativamente otros pares de cebadores de amplificación que dan lugar a productos de amplificación que incluyen la región que se hibrida con las sondas SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2.

La presente invención es compatible con la presencia de cebadores de amplificación para otros microorganismos en la misma mezcla de reacción. Además, también es compatible con la inclusión de pares de cebadores de

amplificación de, al menos, un control interno, y un control de extracción.

Después del proceso de amplificación, preferentemente, el producto de amplificación obtenido se transforma en una ADN de cadena sencilla antes de la hibridación con la sonda correspondiente. El ADN de cadena sencilla se obtiene más preferentemente mediante desnaturalización del producto de amplificación, más preferentemente, mediante

5

En los casos en los que la muestra que se va a ensayar no se amplifica antes de la incubación con las sondas, el ácido nucleico en la muestra se puede marcar por cualquier método de marcado de ADN conocido en la técnica.

10

También, se puede introducir un marcador en el producto de amplificación de ADN durante la amplificación para permitir la detección posterior, en particular un marcador que proporciona una señal se puede detectar por métodos colorimétricos, por métodos fluorescentes, o por cualquier método de marcación conocido en la técnica. El marcador puede ser un agente radioactivo, quimioluminiscente, luminiscente y fluorescente. En un aspecto preferido, el marcador que se utiliza en biotina. Sin embargo, se puede utilizar cualquier otra clase de marcador conocida en la técnica (por ejemplo, digoxigenina). En un aspecto preferido, al menos uno de los cebadores utilizados está marcado en el extremo 5' con biotina. Además, el marcado del ADN amplificado se puede conseguir alternativamente

15

añadiendo nucleótidos modificados que albergan un marcador (por ejemplo, biotinilado derivados de digoxigenina dUTP) a la mezcla de PCR. En ciertas realizaciones, se pueden utilizar marcadores radioactivos, así como fluoróforos.

20

Se pueden utilizar métodos alternativos conocidos por el experto, que pueden hacer posible la detección de la interacción entre cualquier producto de amplificación y su sonda correspondiente, incluyendo los métodos que implican el marcado de la sonda.

25

Los productos de la amplificación desnaturalizados se pueden incubar con las sondas inmovilizadas en una micromatriz, sea por ellos mismos o mezclados en una solución de hibridación que contienen sales y detergentes conocidos por el experto en la técnica para favorecer las interacciones entre las moléculas de ADN. Debido al marcado del ADN de la muestra, cualquiera de las moléculas de la muestra interactúa con las moléculas de sonda de la superficie en la micromatriz, un reactivo indicador se une al marcador y produce señales visibles que se pueden detectar por un dispositivo de detección. La interacción entre la sonda y las moléculas de la muestra se identifican por la localización de la señal en la superficie de la micromatriz. En el caso particular en el que los productos de amplificación se marcan con biotina, el agente indicador puede ser peroxidasa de rábano rusticano unida covalentemente con estreptavidina. Esta última se une específicamente a la biotina, y la peroxidasa desencadena la precipitación de sustratos como el de tetrametilbencidina (TMB) u o-dianisidina.

30

Se puede utilizar cualquier otro método de detección conocido en el estado de la técnica, tal como fluorescencia, para la detección de la interacción entre los productos de la amplificación y las sondas correspondientes.

35

Se puede utilizar igualmente cualquier otra reacción que dé como resultado un precipitado en los elementos de la matriz, y que se pueda utilizar para detectar la interacción entre la diana y las moléculas de la sonda.

En una realización preferida, la visualización de las interacciones entre las moléculas diana y sus sondas específicas o de control correspondientes, consiste en las siguientes etapas:

40

- Primero, la imagen de la micromatriz se captura utilizando un dispositivo óptico;
- Luego, se analiza la imagen;
- Finalmente, se proporciona un informe que contiene una interpretación del resultado.

45

Preferentemente, la imagen se analiza mediante el software apropiado. Se puede utilizar cualquier dispositivo adecuado para este procesamiento.

En una realización preferida, los tipos de muestras de ensayo que se pueden procesar con la presente invención son exudados nasofaríngeos, lavados nasofaríngeos, esputo, aspirados bronco-alveolares, y lavados bronquio-alveolares. Estos serían las muestras más adecuadas para las infecciones respiratorias. Las muestras adicionales que se procesan de acuerdo con el presente método y el kit son la sangre y muestras de cultivo en sangre, que son más adecuadas en el caso de pacientes con síntomas de sepsis. Cualquier otro fluido corporal, o tejido obtenido de un individuo también se puede someter al método o kit de la presente invención. El individuo es un ser humano.

50

La muestra de ensayo puede ser igualmente material genético extraído de la muestra original. La extracción de material genético se puede llevar a cabo por técnicas del estado de la técnica tanto automáticas como manuales.

55

En una realización más preferida, el sistema de extracción automático es el NucliSENS easyMAG de BioMerieux (documento EP1694813), que utiliza partículas magnéticas en combinación con la tecnología BOOM® de BioMerieux para el aislamiento universal del ácido nucleico total de un amplio intervalo de volúmenes y tipos de muestra. Se pueden utilizar igualmente otras técnicas de extracción automática.

60

El experto también es consciente de técnicas y métodos para el procesamiento manual de muestras para la extracción de ácidos nucleicos; y se puede utilizar cualquiera de dichos métodos adecuados.

En un ejemplo en particular, los ácidos nucleicos se extraen de la muestra que se va a ensayar. Preferentemente, el volumen inicial está en el intervalo de desde 200 µl a 1 ml. Después de la etapa de extracción, se resuspende un precipitado en un volumen de desde 25 µl a 80 µl de agua libre de RNasa. En una realización particular, 5 µl de los 25 a 80 µl que comprende el material genético extraído de la muestra de ensayo, se añaden a un vaso que contiene

65

los reactivos de amplificación, en un volumen final de 50 µl.

“y/o” cuando se utiliza en el presente documento se tiene que tomar como la divulgación específica de cada una de las características o componentes especificados con o sin el otro en cada combinación a menos de que se dicte otra cosa. Por ejemplo, “A, B, y/o C” se toma como la divulgación de cada uno de (i) A, (ii) B, (iii) C, (iv) A y B, (v) B y C, o (vi) A y B y C, como si cada uno se expusiera individualmente en el presente documento.

Como se utiliza en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “uno”, “una” y “el” incluyen las referencias en plural a menos de que el contexto dicte claramente otra cosa.

Los ejemplos que se proporcionan posteriormente simplemente ilustran la presente invención y de ninguna manera limitan el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo 1:

Se obtuvo una muestra de sangre de cultivo positivo al *Streptococcus pneumoniae*, y se extrajo el ADN de esta mediante el kit NucliSENS easyMAG de BioMerieux. El volumen inicial del cultivo de sangre que se utilizó era de 1 ml, mientras que el volumen final después de la elución era de 80 µl.

A continuación, se tomaron 5 µl del volumen eluido y se sometieron a la amplificación con los siguientes reactivos en la muestra:

Reactivos de amplificación	Concentración final en el tubo de PCR (µM)
Tampón Q 5x	1X
2X QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	1X
Cebador de SEQ ID N° 6	0,8-2
Cebador de SEQ ID N° 7, marcado con biotina	0,8-2
H ₂ O	Hasta un volumen final de 45 µl

NÚMERO DE CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
1 ciclo	95 °C	15'
40 ciclos	95 °C	15"
	55 °C	15"
	68 °C	45"
1 ciclo	68 °C	10'
1 ciclo	4 °C	Para siempre

Los productos de amplificación se desnaturalizaron mediante incubación a 95 °C durante 10 minutos. Después de esto se incubaron 5 µl del producto de la PCR desnaturalizado, en presencia de una solución de hibridación convencional, con una micromatriz que comprende las sondas de SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2 inmovilizadas en posiciones conocidas.

Después de una serie de etapas de lavado y bloqueo convencionales, se tomó una imagen con la visualización del resultado final que se muestra en la Figura 1.

Ejemplo 2

Se obtuvo una muestra de un cultivo de sangre positivo a *Streptococcus mitis*, y se sometió al mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 1 para *Streptococcus pneumoniae*. La visualización del resultado final se presenta en la Figura 2.

Ejemplo 3

Se obtuvo una muestra de un cultivo de sangre positivo a *Streptococcus oralis*, y se sometió al mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 1 para *Streptococcus pneumoniae*. La visualización del resultado final se presenta en la Figura 3.

Ejemplo 4

Se obtuvo una muestra de un cultivo de sangre positivo a *Streptococcus dysgalactiae*, y se sometió al mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 1 para *Streptococcus*.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de *Streptococcus pneumoniae* en una muestra de ensayo, comprendiendo el método:
 - someter la muestra a una amplificación por PCR dando lugar a productos de la amplificación que incluyen una región que se hibrida con las sondas de las SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2, en donde se introduce un marcador detectable en los productos de amplificación;
 - transformar cualquiera de los productos de amplificación de la PCR en un ADN de cadena sencilla;
 - poner en contacto cualquier ADN de cadena sencilla con ambas sondas de las SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2, estando proporcionadas dichas sondas en una micromatriz; y
 - detectar una señal proporcionada por el marcador detectable de cualquier ADN de cadena sencilla que se ha hibridado con las sondas, en donde:
 - las señales positivas de igual intensidad en ambas posiciones de la micromatriz correspondientes a las sondas de las SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2 son indicativas de la presencia de *Streptococcus pneumoniae* en la muestra;
 - una señal positiva en la posición correspondiente a la sonda de la SEQ ID N.º 1, y una señal en la posición correspondiente a la sonda de SEQ ID N.º 2 que tiene una intensidad de menos del 20 % de la correspondiente a la sonda de SEQ ID N.º 1, es indicativa de la presencia de *Streptococcus mitis* en la muestra; y
 - una señal positiva en la posición correspondiente a solo una sonda, o sin señal en ninguna de las posiciones correspondientes a las sondas de SEQ ID N.º 1 y 2, es indicativa de la presencia de otras especies del género *Streptococcus*.
2. El método de la reivindicación 1, en el que se utilizan dos secuencias de ácido nucleico que comprenden respectivamente las SEQ ID N.º 6 y SEQ ID N.º 7 como cebadores de la amplificación por PCR.
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en el que las sondas de SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2 están incluidas en un vaso de matriz individual, o en un conjunto de vasos de matriz.
4. Un kit para la detección de *Streptococcus pneumoniae* en una muestra de ensayo, en donde dicho kit comprende un vaso de matriz o un conjunto de vasos de matriz, comprendiendo cada uno una micromatriz en las que se proporcionan ambas sondas de SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2, y una mezcla de amplificación, que comprende cebadores de amplificación por PCR y un marcador detectable, para la producción de productos de amplificación marcados que incluyen la región que se hibrida con las sondas de las SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2.
5. El kit de la reivindicación 4, en donde dicho kit comprende adicionalmente reactivos para su uso en la visualización de la hibridación de ácidos nucleicos con las sondas de la micromatriz.
6. El kit de la reivindicación 4 o la reivindicación 5 en el que la mezcla de amplificación comprende dos secuencias de ácido nucleico que comprenden respectivamente las SEQ ID N.º 6 y SEQ ID N.º 7, como cebadores de amplificación por PCR.
7. Un conjunto de sondas que comprende las sondas de SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2.
8. Una micromatriz que comprende el conjunto de sondas que se definen en la reivindicación 7.
9. Uso del kit de las reivindicaciones 4 a 6, el conjunto de sondas de la reivindicación 7 o la micromatriz de la reivindicación 8 para la detección *in vitro* de *Streptococcus pneumoniae*.
10. Uso del kit de las reivindicaciones 4 a 6, el conjunto de sondas de la reivindicación 7 o la micromatriz de la reivindicación 8 para el diagnóstico de una infección por *Streptococcus pneumoniae* en una muestra de un paciente.
11. Uso de la reivindicación 10 en el que la infección es una infección séptica o respiratoria.

Figura 1. *Streptococcus pneumoniae*

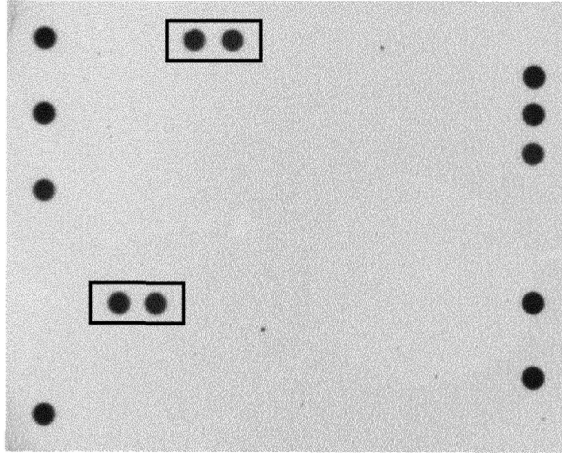


Figura 2. *Streptococcus mitis*.

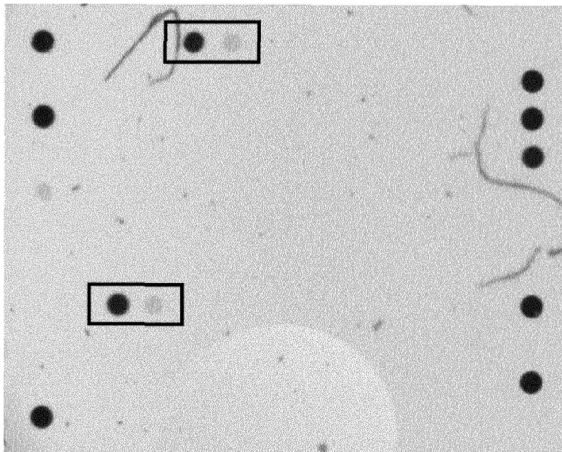


Figura 3. *Streptococcus oralis*

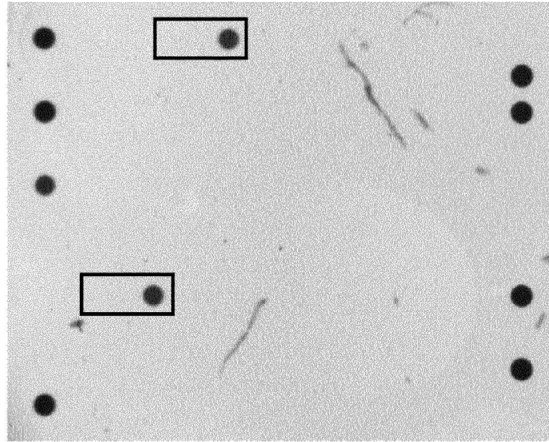


Figura 4. *Streptococcus dysgalactiae*

