

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 806**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/22 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)
C12Q 1/25 (2006.01)
C12Q 1/42 (2006.01)
C12Q 1/48 (2006.01)
C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2011 E 17194583 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019 EP 3284831**

54 Título: **Métodos para medir actividad enzimática, útiles para determinar la viabilidad celular en muestras no purificadas**

30 Prioridad:

16.04.2010 US 324939 P
16.04.2010 US 324949 P
19.04.2010 US 325413 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.02.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

O'HARA, SHAWN MARK y
ZWEITZIG, DANIEL R

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 739 806 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

Métodos para medir actividad enzimática, útiles para determinar la viabilidad celular en muestras no purificadas

Referencia cruzada a las solicitudes relacionadas

Esta solicitud es una solicitud no provisional que reivindica prioridad, en parte, de la Solicitud Provisional de EE. UU No. 61/324,939, presentada el 16 de abril 2010, la Solicitud Provisional de EE. UU No. 61/324,949, presentada el 16 de abril 2010 y la Solicitud Provisional de EE. UU No. 61/325,413, presentada el 19 de abril 2010.

Campo de la invención

La presente invención se relaciona generalmente con el campo de la detección de microorganismos, y más particularmente a la detección de bacterias. También se divulgan métodos mejorados para la detección de microorganismos que son altamente sensibles, es aplicable a muestras no-purificadas y tiene numerosas aplicaciones, junto con kits de ensayos, que dependen de la presencia de ligasa y/o de fosfatasa como indicadores de la viabilidad bacteriana. La solicitud se relaciona específicamente a un kit de ensayo para el uso en el método de detección de la actividad de la polimerasa como indicador de la presencia de microorganismo en una muestra comprendiendo: (a) un sustrato de ADN no ligable que consta de una hebra sentido de oligonucleótidos y una hebra antisentido de oligonucleótidos, en la que las dos hebras se sobrepone para formar una región de doble hebra y una porción de hebra sencilla de la hebra antisentido de oligonucleótidos funciona como una plantilla mientras que la hebra sentido de oligonucleótidos de la región de doble hebra funciona como cebador para crear un producto de extensión en presencia de la actividad de la polimerasa, (b) un cebador reverso que hibridiza específicamente con el producto de extensión creado en presencia de la actividad de la polimerasa (c) un cebador de avance que hibridiza específicamente con el producto de la amplificación del cebador reverso, en el que el cebador de avance y el reverso son una molécula separada del sustrato de ADN no ligable.

Antecedentes de la invención

Medir la presencia y los niveles de ciertas moléculas que están asociadas con la viabilidad celular es importante en una serie de contextos. Por ejemplo, medir los niveles de ATP es útil en células de mamífero para el análisis del crecimiento y con propósitos toxicológicos.

Aproximaciones de cultivo pueden ser utilizadas para detectar pequeñas cantidades de bacterias, pero tales técnicas requieren de varios días para poder ser completadas, específicamente cuando se intenta detectar pequeñas cantidades de bacterias y cuando se intenta detectar a microorganismos de lento crecimiento.

Alternativamente, se pueden realizar pruebas basándose en la medición de la presencia de una molécula que puede vincularse a la presencia en la muestra de una célula u organismo contaminante. La molécula más comúnmente detectada es el Adenosín Trifosfato (ATP). También se ha propuesto la detección de ADN y de ARN, aunque la correlación entre la presencia de ADN y ARN y la viabilidad no está clara debido a la persistencia variable de ácidos nucleicos en células después de la muerte (Keer & Birch, *Journal of Microbiological Methods* 53 (2003) 175-183). Se ha propuesto la detección de adenilato cinasa 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, in *Bioluminescence and Chemiluminescence Progress and Current Applications*. Edited by: Stanley RA, Kricka LJ. John Wiley and Sons; 2002 y WO 96/02665). Un método empleado rutinariamente para determinar los niveles de ATP involucra el uso de bioluminiscencia. El método utiliza la dependencia de ATP de la reacción en la cual la luciferasa que emite luz es capaz de catalizar la oxidación de la luciferina. El método puede utilizarse para medir ATP a concentraciones relativamente bajas. Los kits útiles para la detección de ATP que utilizan bioluminiscencia están disponibles comercialmente con Roche, New Horizons Diagnostics Corp, Celsis, etcétera. Sin embargo, existen un número de problemas respecto a la detección de la bioluminiscencia. Por ejemplo, la detección de ATP microbiano en presencia de ATP de fuentes no microbianas puede ser un problema. Este problema se ha resuelto hasta cierto punto gracias al uso de filtros que pueden separar a las fuentes de ATP entre las bacterianas y las no bacterianas, proporcionando así una señal más precisa.

En consecuencia, se puede observar que existen un número de problemas con respecto a la detección microbiana convencional. Con la finalidad de abordar estos problemas, se ha propuesto la detección de ligasas, tal y como se describe en la solicitud de patente WO/1996/002665, publicada el 1 de febrero, 1996, ahí se da a conocer un método para determinar la presencia y/o la cantidad de microorganismos y/o el material intracelular presente en una muestra caracterizada en que la cantidad de adenilato cinasa en la muestra está estimada por la mezcla con adenosín difosfato (ADP), determinando la cantidad de adenosín trifosfato (ATP) producido por la muestra de este ADP, relacionando así la cantidad de ATP producido con la presencia/o cantidad de adenilato cinasa y con los microorganismos y/o su material intracelular, en donde la conversión de ADP a ATP se lleva a cabo en presencia de iones de magnesio a una concentración molar suficiente para permitir la conversión máxima de ADP a ATP. La cantidad de magnesio presente es preferiblemente tal que hay suficiente para proveer un mol de magnesio a un mol de ADP, es tal que todas las moléculas de ADP pueden estar asociadas con al menos un ion de magnesio.

En la solicitud de patente WO/2009/007719, publicada el 15 de enero del 2009, titulada: DETECTION OF MICRO-ORGANISMS BASED ON THEIR NAD-DEPENDENT DNA LIGASE ACTIVITY ligases, in particular NAD- dependent ligases, se divulgan como un indicador útil de la presencia de microorganismos (viables) en una muestra. Las ligasas son enzimas que catalizan la ligación de moléculas de ácidos nucleicos. La ligación requiere ya sea ATP o NAD+ como cofactores dependientes de la ligasa en cuestión. En esta divulgación, el uso de la actividad ligasa dependiente de NAD se utiliza como un indicador de la presencia de microorganismos (viables) en una muestra. El vínculo entre la actividad ligasa dependiente de NAD y la viabilidad es central para la invención divulgada en esta solicitud, (Korycka-Machala et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, AUG. 2007, p 2888-2897), dado que permite que la actividad de esta enzima sea utilizada como indicador de células microbianas viables, en particular las células de origen bacteriano, en la muestra. Sin embargo, en los experimentos que condujeron al desarrollo de la presente invención, se encontró que las técnicas y enseñanzas descritas en esta solicitud de patente publicada WO/2009/007719 no podían ser aplicadas a la determinación de microorganismos viables en muestras no purificadas, como por ejemplo lisados microbianos crudos o hemocultivos, por lo tanto, constituyendo un gran inconveniente para la tecnología como se describe en esta referencia. Sin embargo, se ha descubierto que estas metodologías también tienen problemas. Por ejemplo, se ha encontrado que en general, el diseño del ensayo convencional de ligasa sustrato y la señal resultante detectada del mismo, como se divulga en la referencia de solicitud de patente mencionada anteriormente, no es específica a la ligasa cuando se aplica a su tipo de muestra previsto (lisados crudos celulares derivados de sangre). EP 0 385 410 A2 divulga oligonucleótidos de doble hebra apropiados para detectar la actividad de la polimerasa. Y son estos problemas los que la presente invención busca abordar y superar.

20 Sumario de la Invención

En contraste con los métodos convencionales descritos anteriormente, en un aspecto, la presente invención está dirigida a la detección de enzimas como polimerasas, en realizaciones preferidas serán las polimerasas de ADN o de ARN los indicadores útiles de la presencia de microorganismos o microbios (viables) en una muestra, en particular una muestra que es, por ejemplo, un lisado microbiano crudo o hemocultivos o sangre sin purificar. La asociación descubierta de acuerdo con la presente invención entre la enzima, por ejemplo, la polimerasa, la actividad y la viabilidad de los microorganismos o microbios, permite la detección de la actividad de estas enzimas para ser utilizadas como un indicador viable de células microbianas, en partículas a las células de origen bacteriano, que hay en la muestra.

También se describen métodos para detectar a una polimerasa de ADN o de ARN como indicador de la presencia de un microorganismo en una muestra. Tal método puede comprender:

(a) poniendo en contacto la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para la actividad de la polimerasa en la muestra,

(b) incubando a la muestra así contactada en condiciones apropiadas para la actividad de la polimerasa; y

(c) determinando la presencia (y/o la cantidad) de la molécula de ácido nucleico resultante de la acción de la polimerasa de los microorganismos en la molécula sustrato para indicar la presencia del microorganismo.

Se proporcionan reactivos útiles en los métodos descritos anteriormente, y kits de ensayo que comprenden dichos reactivos útiles para la realización de los métodos.

Además, se describen mejoras en los métodos, composiciones y kits descritos en la solicitud de patente publicada WO/2009/007719, publicada el 15 de enero del 2009 titulada DETECTION OF MICRO-ORGANISMS BASED ON THEIR NAD-DEPENDENT DNA LIGASE ACTIVITY, que publicó la identificación de ligasas, en particular ligasas dependientes de NAD, como un indicador útil de la presencia de microorganismos o microbios (viables).

La presente divulgación proporciona en consecuencia mejoramientos a los métodos y composiciones y kits basados en ello como se describe en WP/2009/007719, de la detección de una enzima seleccionada de un grupo que consiste en ligasas dependientes de NAD, o fosfatasa, o una mezcla de los precedentes, como un indicador de la presencia de un microorganismo en la muestra, los métodos mejorados comprenden:

(a) poniendo en contacto la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para la actividad de la enzima en la muestra, mientras que no permite señales de interferencia de la ADN polimerasa,

(b) incubando a la muestra puesta en contacto bajo las condiciones apropiadas para la actividad de la enzima; y

(c) determinando la presencia (y/o la cantidad) de la molécula de ácido nucleico modificada enzimáticamente, que es resultante de la acción de la enzima seleccionada o una mezcla en el sustrato de la molécula de ácido nucleico para indicar la presencia del microorganismo.

Así, serán apreciadas las mejoras a los métodos, al ser útiles para identificar a todos los microorganismos en los que tales enzimas o mezclas de las mismas está expresadas (o han sido expresadas).

Como se indicó anteriormente, el primer paso en el método comprende poner en contacto a la muestra con la molécula de ácidos nucleicos que actúan como sustrato para la actividad enzimática en la muestra, mientras que no permiten señales de interferencia de la ADN polimerasa. Por lo tanto, hay que apreciar que cualquier molécula ligable apropiada que puede detectarse de manera específica una vez que se haya ligado, puede utilizarse en los métodos de la invención.

Descripción breve de las figuras

La Figura 1, dibujos A hasta el D muestran diagramas de plantilla y representaciones gráficas de los resultados producidos por los experimentos realizados de acuerdo con la presente invención como se describe en la presente.

La Figura 2, dibujos A hasta el D son representaciones gráficas muestran que sustratos no ligables favorables a polimerasa son sensibles y específicos en lisados celulares crudos derivados de microbios.

La Figura 3 es una representación gráfica que muestra que sustratos no ligables favorables son sensibles y específicos en lisados celulares crudos derivados de hemocultivos sembrados con microbios. Descripción detallada de la invención

Así, de la descripción anterior se puede apreciar que los métodos son útiles para identificar a todos los microorganismos en los que una enzima, tal como una polimerasa apropiada, es expresada (o lo ha sido). En ciertas realizaciones, los métodos se aplican a la detección de los microorganismos y así puede ser considerado como un método para la detección de microorganismos viables en una muestra. En particular, en un ejemplo preferido, los métodos pueden ser útiles para identificar a bacterias o microorganismos en los que el gen de la polimerasa de ácidos nucleicos y su proteína traducida, la polimerasa, son esenciales para la viabilidad. Sin embargo, los microorganismos, como las bacterias, recientemente convertidas en no viables (por ejemplo, a través del tratamiento con un antibacteriano) pueden retener la actividad detectable de la polimerasa hasta que la enzima se degrade.

En el desarrollo de la presente invención, se descubrió un cambio de paradigma en la preparación de muestras de componentes bioquímicos celulares funcionales dado que la presente invención permitió que los ensayos se realizaran directamente en las muestras de células lisadas suavemente, sin las costosas complicaciones agregadas por los protocolos de aislamiento tradicionales, y a menudo extremos, basados en la desnaturalización. Por lo tanto, se ha encontrado que la presente invención permite la detección de organismos viables en muestras tales como lisados clínicos crudos, que incluyen, sin limitación, fracciones celulares de sangre completa y/o hemocultivos, y además de grandes volúmenes de las mismas, que son típicamente 10-20 ml, preferiblemente en el rango de 0.1-100 ml. La invención es particularmente útil para la detección de todos los microorganismos asociados con la septicemia, y para aquellos asociados con condiciones que incluyen, pero no se limitan a bacteriemia, fungicemia y condiciones asociadas a parásitos. Se encontró de manera inesperada que, de acuerdo con la presente invención, la detección de tales organismos puede ser lograda en muestras no purificadas como las descritas anteriormente, esto, en contraste con las enseñanzas convencionales de la técnica, en las que la inhibición de la polimerasa, al igual que la presencia de proteinasas de interferencia y nucleasas, representan una barrera para tales métodos de ensayo cuando se realizan en muestras no purificadas.

Como se describió anteriormente, las ligasas, en particular las ligasas dependientes de NAD, se han descrito como un indicador putativo de la presencia de microorganismos (viables) en una muestra. Sin embargo, en contraste, la presente divulgación proporciona a otras enzimas útiles derivadas de células microbianas, además de las ligasas, que pueden utilizarse de forma similar para unir su actividad de células viables a un generador de señal altamente sensible, como la técnica de PCR y similares. Esta característica permite diferenciar potencialmente bacterias de hongos. En un ejemplo de la realización de la invención, lo siguiente puede ser utilizado en este sentido:

- a. Cinasas con PO_4 que pueden utilizarse para permitir a la ligasa detener a la polimerasa.
- b. Los fosfatos pueden utilizarse para remover a PO_4 y habilitar a las polimerasas
- c. Polimerasas de ADN y ARN pueden utilizarse para extender el sustrato y permitir las amplificaciones tradicionales río abajo por PCR o por amplificaciones isotérmicas.
- d. Las amplificaciones isotérmicas se puede ejecutar fuera de las actividades de la enzima endonucleasa
- e. Ribosomas
- f. Mecanismos de miARN
- g. Girasa
- h. Helicasa
- i. Exonucleasas, 5'-3', 3'-5', es decir que remueven grupos de bloqueo como PO_4 , TaqMan, etcétera
- j. Endonucleasas

k. Proteasas

l. ADNasas

m. ARNasas

n. UDGLicosilasas

5 o. Enzimas de reparación

En una realización preferida de la presente invención, se ha descubierto que la medición de la actividad de la ADN polimerasa, de acuerdo con la invención, permite la determinación de la viabilidad celular de los lisados crudos microbianos. Esto se puede verificar utilizando sustratos de oligonucleótidos más selectivos modificados en combinación con "hot starts" que son selectivos (y bien conocidos en la técnica) y controlan las actividades RT, 37 y 10 60C.

En una realización de la invención, la invención tiene aplicación con el cribado de productos sanguíneos, especialmente de plaquetas dado que, en esta solicitud, cualquier crecimiento microbiano es causa para desechar el producto, y cualquier diferenciación entre bacteria y hongo no es necesaria. En una realización adicional de la invención, se pueden emplear las fosfatasa y probablemente son un excelente candidato de enzima para permitir la actividad de la polimerasa dado que remueven a la fosfatasa ya sea 5' o 3' dejando un -OH y esto podría permitir a cualquier polimerasa mediante la eliminación de una Taq 5' diseñada incluida, o una ligasa (remover a 3'). Adicionalmente las fosfatasa son robustas y podrían ayudar a diferenciar entre levaduras y bacterias vía la optimización del pH. Por lo tanto, se apreciará que cualquier enzima apropiada que permitirá a la polimerasa como se contempla en las enseñanzas de la presente, puede ser útil en la práctica de la presente invención.

En la práctica de la presente invención, la detección de microorganismos puede incluir a microorganismos recientemente viables, hasta el punto donde la ADN polimerasa ha sido degradada, según sea apropiado. Si se requiere de hacer la distinción entre microorganismos viables y microorganismos recientemente viables, un simple curso de tiempo o comparación de la actividad de la polimerasa entre dos o más puntos, bajo condiciones apropiadas, debería ser suficiente para determinar si la actividad de la polimerasa aumenta, persiste o disminuye a lo largo del tiempo. En una realización preferida, si se encuentra que la actividad de la polimerasa persiste o se aumenta a lo largo de un periodo de tiempo extendido o en (a) un punto (o puntos) temporal más tarde (comparado con la medición inicial), esto podría indicar que los microorganismos son viables. Si la actividad de la polimerasa disminuye en (a) un punto (o puntos) temporal más tarde, esto podría indicar que la actividad detectada corresponde a microorganismos recientemente viables. Este enfoque de medición del curso de tiempo puede ser especialmente útil cuando se aplica hacia la prueba de susceptibilidad a antibióticos (PSA) así como la determinación de otras terapias apropiadas. Los métodos de detección se discuten en detalle en la presente. En realizaciones preferidas específicas de la invención, los microorganismos como bacterias, como se describen en la presente y los métodos de la invención pueden aplicarse de manera más general (Wilkinson et al., Molecular Microbiology (2001) 40(6), 1241-1248). Las bacterias podrían ser también, por ejemplo, bacterias mesófilicas y/o termófilicas.

Una "muestra" en el contexto de la presente invención se define para incluir cualquier muestra en la que sea deseable probar la presencia de un microorganismo, en particular una bacteria. Por lo tanto, la muestra puede consistir en un lisado microbiano crudo proporcionado clínicamente, o puede comprender una muestra clínica de sangre o hemocultivo, o comprender una muestra apropiada, por ejemplo, para un sistema de ensayo *in vitro*. Las muestras también pueden comprender muestras de bebidas o de comida o preparaciones de las mismas, o productos farmacéuticos o cosméticos tales como productos de cuidado personal incluyendo champús, acondicionadores, humectantes, etcétera, todos los cuales son probados para contaminación microbiana como parte de la rutina. La muestra puede comprender tejido o células y puede comprender esputo o una muestra de plaquetas. Adicionalmente, los métodos y kits de la invención pueden ser utilizados para monitorizar la contaminación de superficies, como por ejemplo lugares donde se prepara la comida. En una realización preferida, se indica la contaminación por presencia de la actividad de la polimerasa. La contaminación puede ser de cualquier fuente microbiana, en particular, una contaminación bacteriana. Además, la invención es también útil en la monitorización de condiciones ambientales como suministros de agua, aguas residuales, ambientes marinos y etcétera. La invención también es útil para monitorizar el crecimiento bacteriano en procesos fermentativos y en muestras de aire donde el contenido bacteriano y de esporas puede evaluarse como hospitales, instalaciones industriales y en aplicaciones de biodefensa.

Los métodos se basan en el hecho de que si hay uno o más microorganismos (viables), en particular bacterias, presentes en la muestra, la actividad enzimática, preferiblemente la actividad de la ADN polimerasa va a estar presente. La enzima puede así, bajo condiciones apropiadas, catalizar la reacción para generar una nueva molécula de ácido nucleico que es detectable (en un proceso subsiguiente). La nueva molécula de ácido nucleico puede ser detectada por cualquier método apropiado, como se describe en la presente, permitiendo por lo tanto la determinación de la presencia de microorganismos en la muestra que está bajo prueba.

Así, si el microorganismo no está presente en la muestra no habrá actividad enzimática (por ejemplo, de la polimerasa) en la muestra y así la nueva molécula de ácido nucleico no podrá ser generada.

Los métodos proveen ventajas técnicas significativas, esto debido en gran parte al hecho de que la nueva molécula de ácido nucleico se genera como parte del método. En los métodos, la molécula de ácido nucleico sin reaccionar no va a contribuir a la señal, y como resultado no se van a producir señales de falso positivo cuando se realice la metodología.

5 Adicionalmente, los métodos son muy sensibles, y pueden proveer la detección de la enzima (por ejemplo, la polimerasa) presente en la muestra hasta el nivel de femtogramos y posiblemente hasta niveles de attogramos. La sensibilidad está derivada del hecho de que cada célula bacteriana contiene cientos de moléculas enzimáticas y por lo tanto puede catalizar múltiples eventos bajo las condiciones apropiadas. A diferencia de las aproximaciones directas por PCR, las cuales deben dirigirse a una o más copias de un gen por célula o el uso de pasos adicionales o reactivos para detectar ARN mensajero o ribosomal, la aproximación descrita en la presente dirige la detección de múltiples copias de la enzima por célula en un formato de ensayo simple.

Como se establece en la presente, el primer paso en el método comprende poner en contacto a la muestra con la molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para la enzima, por ejemplo, la actividad de la polimerasa en la muestra.

15 Las moléculas de ácidos nucleicos apropiadas para el uso en la invención se describen con más detalle a continuación. Las moléculas de ácidos nucleicos pueden incorporar, según sea apropiado, análogos de nucleótidos sintéticos o podrían ser basados, por ejemplo, en ARN o ADN, o mezclas de las mismas. Podrían estar marcadas, utilizando una etiqueta fluorescente, o un par FRET, en ciertas realizaciones para facilitar la detección. Los métodos de detección apropiados se describen en la presente.

20 Un "ácido nucleico" está definido en la presente para incluir a cualquier análogo de ácido nucleico natural o sintético que sea capaz de generar una molécula detectable de ácido nucleico por acción de la polimerasa. Las moléculas apropiadas de ácidos nucleicos pueden estar compuestas de, por ejemplo, moléculas de ADN de doble hebra o de hebra sencilla y de ARN de doble hebra o de hebra sencilla

Aunque el sustrato de ácidos nucleicos puede comprender una molécula de ADN de doble hebra de extremos romos, en una realización de la invención, el sustrato de ácidos nucleicos para la polimerasa comprende dos moléculas de ADN de doble hebra con un saliente complementario y grupos 5' fosfato en los extremos para unirse. En una realización específica, el saliente complementario es de entre 2 y 10, como de 3 a 5 pares de bases. En una realización alternativa, el sustrato de ácidos nucleicos comprende una molécula de ADN como una muesca que contiene fosfato 5'. Las moléculas de ácidos nucleicos sintetizadas están disponibles comercialmente y se pueden hacer a la medida con un grupo 5' fosfato unido. Esto tiene la ventaja técnica de que el 100% de las moléculas de ácidos nucleicos utilizadas en los métodos de la invención estarán marcadas con un grupo 5' fosfato.

En realizaciones específicamente preferidas de la invención, si la polimerasa esta presente en la muestra, esta va a realizar la catálisis y se formará una molécula de ácido nucleico nueva (incorporando una secuencia nueva) la cual puede ser detectada en un proceso subsecuente, como se detalla en la presente (como, por ejemplo, PCR).

35 Así el sustrato de ácidos nucleicos puede, de hecho, comprender dos o más moléculas de ácidos nucleicos según sea apropiado. Esto aplica generalmente a los kits de la invención.

En ciertas realizaciones, el sustrato de ácidos nucleicos comprende a dos moléculas de ácidos nucleicos de doble hebra con un saliente complementario de hebra sencilla.

40 Debe ser apreciado que los métodos novedosos pueden utilizarse para diferenciar a la ligasa de la polimerasa al tomar una muestra que se sospeche contiene ambos y probar para ambos de forma paralela, para ligasa y polimerasa, en reacciones separadas, posteriormente substrae las señales, y así de hecho determinar los niveles reales de ligasa que se encuentran en la muestra. Esto se puede representar con la siguiente ecuación:

[señal de la polimerasa – señal de la ligasa (polimerasa + ligasa) = señal real de la ligasa]

45 También debe apreciarse que en cualquier ejemplo la acción de las polimerasas en los ácidos nucleicos es bien conocida en la técnica, y así se puede ver que muchos tipos distintos de sustratos de ácidos nucleicos pueden ser seleccionados para el uso y van a tener las ventajas de la utilización en los métodos novedosos que se describen en la presente. Preferiblemente, el sustrato de ácidos nucleicos se presenta en exceso, particularmente en un exceso molar grande sobre la polimerasa en la muestra. Esta es una importante distinción técnica de los métodos técnicos anteriores. Dado que se detecta una molécula de ácidos nucleicos polimerizada nueva, solamente la presencia de esta molécula en la muestra es esencial para que los métodos de detección funcionen de forma efectiva. Por lo tanto, no es perjudicial para los métodos si otras moléculas de ácidos nucleicos están presentes en la muestra, por ejemplo, de bacterias a detectar o de fuentes de mamíferos u hongos que pueden encontrarse en la muestra que, por ejemplo, se va a analizar.

55 La presente se puede describir más completamente con referencia a los siguientes ejemplos de trabajos experimentales realizados de acuerdo con la invención. Adicionalmente, mientras que algunas de las realizaciones

preferidas de la presente invención se han descrito y ejemplificado específicamente anteriormente, no se pretende que la invención esté limitada a tales realizaciones.

Ejemplo 1.

Descubrimiento de un mecanismo independiente a la ligasa:

5 Tres sustratos distintos de ADN (A) se incubaron con ligasa de *E. coli* o sin ligasa y se sometieron a un PCR que contiene cebadores de PCR específicos de sustrato de ADN ligasa de longitud completa en presencia/ausencia de UNG. El PCR fue monitorizado a través de SYBR verde (qPCR) y las reacciones resultantes se sometieron a un análisis por gel (B). Tres sustratos distintos de ADN (A) se incubaron con ligasa de *E. coli* o sin ligasa y se sometieron a un PCR que contiene cebadores para la detección de la extensión-S1 en presencia/ausencia de UNG. El PCR fue
10 monitorizado a través de sonda *Zeus* disponible comercialmente (qPCR) (*Zeus Scientific, Inc., Raritan, NJ*) y las reacciones resultantes se sometieron a un análisis por gel (C). Las cantidades decrecientes de sustrato de ADN no ligable (S1/AS) se incubaron con tres ADN polimerasas disponibles comercialmente y se sometieron a un análisis por sonda *Zeus* qPCR. Los resultados de estos experimentos se ilustran de forma gráfica en la Figura 1.

15 Ejemplo 2. Se encontró que sustratos no ligables favorables para la polimerasa son sensibles y específicos en lisados crudos celulares derivados de microbios:

Las cantidades decrecientes de microbios se lisaron en perlas y se incubaron con ADN sustrato (solamente S1/AS) en presencia del tampón de la ADN polimerasa y dNTP's a 37°C durante 30 minutos. (A). Los lisados se sometieron a un análisis por sonda *Zeus* qPCR que contenía cebadores para la detección de la extensión-S1. Los resultados se muestran gráficamente en la Figura 2.

20 Ejemplo 3.

Se encontró que sustratos no ligables favorables para la polimerasa son sensibles y específicos en hemocultivos sembrados con microbios derivados de lisados celulares crudos:

25 Las cantidades decrecientes de microbios fueron sembradas en 10 ml de hemocultivo. Los microbios fueron subsecuentemente recuperados, sometidos a lisis en perlas e incubados con un sustrato de ADN (solamente S1/AS) en presencia del tampón de la ADN polimerasa y dNTP's a 37°C durante 30 minutos. (A). Los lisados se sometieron a un análisis por sonda *Zeus* qPCR que contenía cebadores para la detección de la extensión-S1. Los resultados se muestran gráficamente en la Figura 3.

30 Por lo tanto, en aún otro aspecto, la presente divulgación mejora a la invención descrita y reivindicada en WO/2009/007719. Se ha descubierto que el sustrato putativo específico para la ADN ligasa de acuerdo con la divulgación descrita en WO/2009/007719 produce señales robustas ya sea de ADN polimerasa o de ADN ligasa purificadas, de tal manera que los métodos establecidos en el mismo no representan específicamente a la ADN ligasa cuando se aplica al tipo de muestra destinada como, por ejemplo, las muestras de septicemia. Por ejemplo, en el desarrollo de la presente invención, las muestras de septicemia preparadas utilizando los métodos de preparación de
35 muestras impartidos por WO/2009/007719 fueron introducidos en los protocolos del ensayo como se enseña en este, en forma de lisados celulares microbianos crudos que tienen una abundancia muy alta de polimerasas. Las ADN polimerasas son abundantes en las células vivas. Se encontró que los ensayos, como se divulga en WO/2009/007719, son incapaces de discriminar entre las señales derivadas de ADN polimerasa o de ADN ligasa, cuando se introducen muestras purificadas de no ligasas, que desde el punto de vista práctico incluyen a todas las entradas de muestras clínicas, dado que asilar a la ligasa no es un procedimiento práctico ni rutinario, como se divulga en esta referencia,
40 cuando se intenta obtener resultados de muestras clínicas. Más bien, se encontró que los experimentos realizados, de acuerdo con lo que se enseña en esta referencia, producían una señal en el ensayo que estaba contaminada por la ADN polimerasa, y no una señal específica de ADN ligasa, que es claramente el resultado deseado de acuerdo con esta referencia.

45 Los hallazgos descritos anteriormente son contrarios a la habilidad de un sistema, producido de acuerdo con las enseñanzas descritas en WO/2009/007719, para detectar de manera específica la ADN ligasa de células viables. Además, excluye la capacidad prevista del ensayo descrito en esta referencia para diferenciar a las ligasas bacterianas dependientes de NAD de las ligasas fúngicas dependientes de ATP, dado que las polimerasas activas son comunes en todas las células viables y no se pueden diferenciar a las ligasas que haya en el sistema del ensayo. Entonces, habiendo identificado este problema tan crítico, que claramente no fue anticipado ni por esta referencia ni por otra técnica conocida, la presente invención provee mejoras que permiten detectar señales específicas de ligasa en
50 muestras no purificadas de ligasa, como por ejemplo, lisados microbianos, al proporcionar sustratos de ADN sustitutos y alternativos, como por ejemplo, lisados microbianos crudos, al proporcionar sustratos de ADN sustitutos y alternativos, como se describe en la presente, que no permiten señales de interferencia de las ADN polimerasas que van a ser detectadas.

55 Por lo tanto, la presente divulgación proporciona métodos mejorados, composiciones y kits, basados en esta, para la detección de una enzima seleccionada del grupo compuesto por ligasas dependientes de NAD, o fosfatasa, o una

mezcla de las mismas, como un indicador de la presencia de microorganismos en una muestra, los métodos comprenden:

(a) poniendo en contacto a la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para la actividad de la enzima en la muestra, mientras que no permite señales de interferencia de la ADN polimerasa,

5 (b) incubando a la muestra puesta en contacto bajo las condiciones apropiadas para la actividad de la enzima; y

(c) determinando la presencia (y/o la cantidad) de la molécula de ácido nucleico modificada enzimáticamente resultante de la acción de la enzima seleccionada o una mezcla en el sustrato de la molécula de ácido nucleico para indicar la presencia del microorganismo.

10 Así, los métodos mejorados son útiles para la identificación de todos los microorganismos en los que se expresen (o se hayan expresado) ligasas dependientes de NAD, o fosfatasa, o una mezcla de las mismas.

El primer paso en el método mejorado aquí descrito comprende poner en contacto la muestra con una molécula de ácido nucleico que actúa como sustrato para la actividad de la enzima en la muestra, mientras que no permite señales de interferencia de la ADN polimerasa. Cualquier enzima modificada apropiada, o ligable puede detectarse específicamente, y una vez ligada puede utilizarse en los métodos.

15 Las moléculas sustrato de ácidos nucleicos para el uso en los métodos, y la inclusión en los kits, debe de ser de una secuencia y estructural tales que la ligasa dependiente de NAD pueda actuar sobre la molécula para producir una molécula de ácidos nucleicos (nueva) que esté modificada por una enzima o que haya sido ligada, y que sea detectable, y que no permita señales de interferencia de la ADN polimerasa. Debe apreciarse que durante el desarrollo de la presente invención, fue de notar que la eliminación de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de un fondo derivado de la Taq-ADN polimerasa, no era una solución viable a la falta de especificidad del sustrato que se había encontrado en el diseño actual descrito en WO/2009/007719, dado que se había determinado que era un problema separado del sistema de detección y que debería de ser tratado por separado y que por lo tanto está fuera del alcance de la presente divulgación.

20 Por consiguiente, en el caso presente de los experimentos que condujeron a la presente invención, se estableció específicamente como un objetivo bloquear toda la actividad de la ADN polimerasa con un aditivo inhibidor que no interfiere con la ligasa. Para poder lograr esto, se observó que las ADN polimerasas tienen funciones enzimáticas muy bien documentadas que necesitan ser neutralizadas/controladas:

(a) actividad de ADN polimerasa 5'-3'

(b) actividad exonucleasa 3'-5'

30 (c) actividad exonucleasa 5'-3'

(d) actividad inherente de esterasa

35 Se han determinado de acuerdo con la presente invención a las moléculas sustrato de ácidos nucleicos apropiadas para el uso en los métodos novedosos, las cuales son apropiadas para la sustitución de aquellas moléculas sustrato descritas como las utilizadas en WO/2009/007719, que pueden incluir, pero no se limitan, a lo mencionado a continuación:

1. Nucleótidos modificados que inhiben cualquier actividad de la polimerasa

2. Dideoxynucleótidos ddCTP, ddGTP que detienen a la polimerasa en la adición de primera base y secuestran - neutralizan su actividad mientras que la ligasa disfruta de reacciones productivas utilizando dATP.

3. Dideoxioligonucleótidos que previenen la extensión del oligonucleótido AS

40 4. Los oligonucleótidos S1 que inhiben a la polimerasa, modifican a las bases incorporadas para bloquear su actividad en este sustrato de ADN

5. Anticuerpos específicos para la ADN polimerasa que inhiben esta actividad- estos son bien conocidos en la técnica del PCR

6. Complejos inhibidores del oligonucleótido de aptámero

45 7. Estrategias de hibridación de sustrato de ADN que eliminan la detección de sustratos extendidos por la polimerasa en amplificaciones río abajo como, por ejemplo, PCR por acortamiento AS en el extremo 5' combinado con un "hot start" verdadero, dicho término es bien conocido en la técnica

8. Estrategias de hibridación de sustrato de ADN que evitan que la polimerasa se pueda unir y que extiendan por acortamiento AS en el extremo 3' pero que no afectan a la ligasa.

9. Tasas cinéticas relativas combinadas con extensión de la polimerasa en favor de la ligasa
10. La competencia de pre-PCR S1 3'dideoxi (largo completo, o un 13mero que es complementario el extremo 3' de AS)
11. Competencia de fosfatos 3' S1 pre-PCR
- 5 12. Remoción completa de AS utilizando condiciones óptimas UNG (enzima estándar UNG)
13. Remoción completa de AS utilizando UNG Termoestable (NEB). Permitirá el tratamiento de UNG con calor eliminando ligasa/polimerasa contaminante, PCR mm debe tener dTTP
14. Hacer un AS que tenga deoxiuridina (remoción de UNG) y las bases restantes de ARN que permiten el co-tratamiento UNG/Rnasa previo al PCR
- 10 15. Necesidad de obtener AS 3'
16. Acortamiento del extremo 3' de AS para reducir el acoplamiento de Taq en altas temperaturas (es decir 65 grados)
17. AD unido covalentemente a un soporte solido durante el paso de ligación/extensión
18. Complemento reverso 3'-dideoxi (largo completo, o quizá un 13mero que es el complementario a la extensión de S1 Pol)
- 15 19. Para reducir el fondo – las estrategias “*hot start*”, que son bien conocidas en la técnica – se eliminan al 100% los oligonucleótidos no deseados y la hibridación de oligonucleótidos extendidos
- a. Físico verdadero – no es fácil de hacer dado que todos los materiales de contacto deben estar a la temperatura de 90°C, y nunca deben caer debajo del umbral de temperatura de 65°C, el problema es que el proceso de transferencia ocasiona una caída en la temperatura, la cual debe evitarse
- 20 b. *Hot starts* no enzimáticos, por ejemplo, una caída de 2 mM de MgCl de los cebadores (0.1 mM de EDTA funcionando como una protección), dNTPs u otros componentes esenciales
- c. cebador químico *Hot start*
- Aunque se ha demostrado que las mejoras de la presente divulgación pueden ser realizados por la sustitución de moléculas sustrato de ácidos nucleicos apropiadas descritas en la presente para aquellas descritas en WO/2009/007719, debe apreciarse que la presente divulgación no debe de limitarse a los ejemplos específicos descritos en la presente. De hecho, varias modificaciones además de las descritas en la presente serán evidentes para aquellos expertos en la técnica de la descripción anterior.
- 25 Será apreciado por aquellos expertos en la técnica que los amplios principios fundamentales y las enseñanzas de la presente invención son capaces de ser aplicados para optimizar a todas las variantes de lisados desnaturalizados habilitados crudos (molino de perlas y ultrasónico) sonda-directa/análisis de PCR-SYBR de varias muestras biológicas de tejidos (incluyendo, pero no limitado a, sangre, fluido sanguíneo, y tejidos blandos) para no solamente microorganismos o microbios, como se describió anteriormente, sino también para varios patógenos, como cualquier bacteria, hongo, virus, parásito, etcétera.
- 30 Aunque se han descrito referencias específicas al PCR en la presente, debe además apreciarse que las mejoras no se limitan a la técnica de PCR o a metodologías similares.
- 35 Los ensayos de amplificación contemplados para el uso en la presente divulgación incluyen, pero no están limitados a, otras técnicas bien conocidas basadas en ácidos nucleicos como los ensayos de amplificación de ADN, ensayos de PCR que incorporan polimerasas termoestables, y métodos de amplificación isotérmicos. Debe apreciarse que un experto en la técnica puede concebir varios métodos de amplificación apropiados que serán útiles en la práctica de la presente divulgación y que, por lo tanto, la divulgación no pretende estar limitada de esta manera.
- 40 También debe apreciarse que la presente divulgación tiene aplicaciones en todos y cada uno de los métodos, procedimientos y procesos que involucran diagnóstico de ADN. Los ejemplos de tales aplicaciones incluyen, pero no están limitados a, alimentos, seguridad del agua, bioterrorismo, medicinas/medicamentos y/o cualquier cosa que involucre la detección de patógenos. En la industria de la comida, la presente divulgación se puede utilizar para monitorizar la eficiencia de los conservadores. El método de la invención tiene el potencial para ser aplicado a las células. Aunque se ejemplifican a las células bacterianas en el ejemplo, alguien con experiencia en la técnica podrá fácilmente ver que los métodos se pueden aplicar a muchos otros tipos celulares. La divulgación se puede utilizar para la identificación de sustancias que pueden romper a las membranas y/o matar células, por ejemplo, células bacterianas. Actualmente, la identificación de nuevos desinfectantes y/o antibióticos es una prioridad dado que los organismos con resistencias a múltiples fármacos han prosperado en las instituciones de salud y en los pacientes.
- 50

Será apreciado que los métodos en combinación con PCR cuantitativo como herramienta, pueden identificar de forma rápida y efectiva el impacto de un desinfectante y/o un antibiótico sin tener que gastar tiempo cultivando a las células y esperando su crecimiento. En algunas instancias, los organismos pueden tardar días o semanas en poder ser cultivados y, por lo tanto, puede tomar una cantidad significativa de tiempo el poder observar si la sustancia candidato es capaz de matar a las células como, por ejemplo, microorganismos. En otras instancias, ciertos microorganismos no van a poder crecer en los cultivos celulares, lo cual dificulta poder determinar si una sustancia fue efectiva, por lo tanto, aplicar los métodos novedosos puede ahorrar tiempo y recursos para la identificación de nuevos desinfectantes y/o antibióticos.

Una ventaja adicional de los métodos novedosos es su facilidad de uso. Por ejemplo, utilizando estos métodos, grandes cantidades de muestras pueden ser fácilmente probadas para la presencia de células viables, por ejemplo, bacterias. Por ejemplo, las muestras pueden ser probadas para la presencia de bacterias potencialmente vivas con membranas celulares intactas. En otro ejemplo, las muestras ambientales pueden ser probadas para la presencia de células viables, por ejemplo, bacterias. Estas muestras pueden ser, por ejemplo, colectadas del suelo o ser partes de plantas. Los métodos pueden además ser utilizados para pruebas de aguas residuales tratadas tanto antes como después de la liberación.

Los métodos pueden además utilizarse para probar muestras médicas, por ejemplo, muestras de heces, hemocultivos, muestras de tejido (también cortes), material de herida, orina, y muestras de tracto respiratorio, implantes y superficies de catéter.

Otro campo de aplicación de los métodos puede ser el control de productos alimenticios. En otros ejemplos, las muestras de alimentos se obtienen de leche o de productos lácteos (yogurt, queso, queso dulce, mantequilla, y suero de leche), agua potable, bebidas (limonadas, cerveza y jugos), productos de panadería o productos de carne. El método puede determinar si los preservativos en la comida o si el tratamiento antimicrobiano de la comida (como la pasteurización) han prevenido el crecimiento celular. Otro campo de aplicación del método es el análisis de productos farmacéuticos y productos cosméticos, por ejemplo, pomadas, cremas, tinturas, jugos, soluciones, gotas, etcétera.

Adicionalmente, los métodos pueden identificar miembros potencialmente viables de la comunidad microbiana para la realización de estudios ecológicos, la salud de suelos específicos para sistemas de agricultura y/o ecológicos. Tradicionalmente, la identificación de una comunidad bacteriana se ha realizado utilizando aproximaciones basadas en el crecimiento en cultivos o en el conteo en placas. Entre más colonias se cuentan, más bacterias se estima que hay en la muestra original. Sin embargo, los problemas surgen a veces de los largos periodos de incubación (en un intervalo de días) haciendo a este método inapropiado para resultados oportunos y eficaces. Estos inconvenientes están utilizando los métodos de la invención.

Los ejemplos no limitantes de bacterias que pueden ser sometidas al análisis utilizando los métodos, o para detectar viabilidad potencial en una muestra utilizando el método comprenden, por ejemplo, a *B. pertussis*, *Leptospira Pomona*, *S. paratyphi*, A y B, *C. diphtheriae*, *C. tetani*, *C. botulinum*, *c. perfringens*, *C. fesceri* y otras bacterias de la gangrena gaseosa, *B. anthracis*, *P. pestis*, *P. multocida*, *Neisseria meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *Hemophilus influenzae*, Actinomicetes (por ejemplo, Norcardia), Acetobacter, Bacillaceae (por ejemplo, *Bacillus anthracis*), Bacteroides (por ejemplo, *Bacteroides fragilis*), Blastomycosis, Bordetella, Borrelia (por ejemplo, *Borrelia burgdorferi*), Brucella, Campylobacter, Chlamydia, Coccidioides, Corynebacterium (por ejemplo, *Corynebacterium diphtheriae*), *E. coli* (por ejemplo, *E. coli* enterotoxigénica y *E. coli* enterohemorrágica), Enterobacter (por ejemplo, *Enterobacter aerogenes*), Enterobacteriaceae (Klebsiella, Salmonella (por ejemplo, *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *Serratia*, *Yersinia*, *Shigella*), Erysipelothrix, Haemophilus (por ejemplo, *Haemophilus influenza* tipo B), Helicobacter, Legionella (por ejemplo, *Legionella pneumophila*), Leptospira, Listeria (por ejemplo, *Listeria monocytogenes*), Mycoplasma, Mycobacterium (por ejemplo, *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium tuberculosis*), Vibrio (por ejemplo, *Vibrio cholerae*), Pasteurillaceae, Proteus, Pseudomonas (por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*), Rickettsiaceae, Espiroquetas (por ejemplo, *Treponema* spp., *Leptospira* spp.), *Shigella* spp., Meningococcus, Pneumococcus y todos los Streptococcus (por ejemplo, *Streptococcus pneumoniae* y los Steptococci de Grupos A₃, B y C), Ureaplasma, *Treponema pallidum*, *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella haemolytica*, *Corynebacterium diphtheriae toxoid*, *Meningococcal polisacárido*, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium tetani toxoid* y *Mycobacterium bovis*. Esta lista pretende ser únicamente ilustrativa y de ninguna manera pretende limitar a la invención para la detección de estos organismos bacterianos en particular.

Un ejemplo particularmente preferido utiliza PCR. Los procedimientos generales para la realización de PCR se enseñan en la Patente de EE. UU No. 4,683,195 (Mullis, et al.) y la Patente de EE. UU No. 4,683,202 (Mullis, et al.). Sin embargo, las condiciones óptimas de PCR utilizadas para cada reacción de amplificación son generalmente determinadas empíricamente o son estimadas con un software computacional empleado comúnmente por los artesanos del campo. Un número de parámetros van a influir en el éxito de una reacción. Entre ellos están la temperatura y el tiempo de apareamiento, el tiempo de extensión, Mg²⁺, pH, y la concentración relativa de los cebadores, plantillas y desoxirribonucleótidos. Generalmente, la plantilla de ácido nucleico es desnaturizado al calentar hasta al menos 95°C durante 1 a 10 minutos antes de la reacción de la polimerasa.

Se ejecutan aproximadamente 20 a 99 ciclos de amplificación utilizando la desnaturización a un intervalo de 90°C hasta 96°C por 0.05 a 1 minuto, el apareamiento a una temperatura en un intervalo de 48°C a 72°C por 0.05 a 2

minutos, una extensión de 68°C a 75°C por al menos 0.1 minuto con un ciclo final óptimo. En una realización, una reacción de PCR puede contener hasta 100 ng de plantilla de ácido nucleico, 20 µM de cebadores río arriba y río abajo, y 0.05 a 0.5 mM de dNTP de cada tipo, y 0.5 a 5 unidades de ADN polimerasa termoestable comercialmente disponible.

- 5 Una variación de PCR convencional es la reacción de transcripción reversa PCR (RT-PCR), en el que una transcriptasa reversa primero convierte a las moléculas de ARN en moléculas de hebra sencilla de ADNc, las cuales son posteriormente empleadas como la plantilla para la amplificación subsecuente en la reacción en cadena de la polimerasa.

- 10 El aislamiento de ARN es bien conocido en la técnica. En la realización de RT-PCR, la transcriptasa reversa es generalmente añadida a la muestra de la reacción después de que el ácido nucleico diana es desnaturalizado por calor. La reacción se mantiene entonces a una temperatura apropiada (por ejemplo, 30-45°C) por una cantidad suficiente de tiempo (10-60 minutos) para generar la plantilla de ADNc antes de que ocurran los ciclos programados de amplificación. Un experto ordinario en la técnica apreciará que, si se desea un resultado cuantitativo, deben tomarse precauciones para utilizar un método que mantenga o controle para las copias relativas del ácido nucleico amplificado.
- 15 Los métodos para la amplificación "cuantitativa" son bien conocidos para los expertos en la técnica. Por ejemplo, un PCR cuantitativo puede involucrar la co-amplificación simultánea de una cantidad conocida de una secuencia control utilizando a los mismos cebadores. Esto proporciona un estándar interno que se puede utilizar para calibrar a la reacción de PCR.

- 20 Otra alternativa de PCR es el PCR cuantitativo (qPCR). Un qPCR se puede correr por técnicas competitivas empleando un control homólogo interno que difiere en tamaño de la diana por una pequeña inserción o una deleción. Sin embargo, también se puede utilizar PCR no competitivo y PCR cinético cuantitativo. La combinación de tiempo real y la detección cinética de PCR junto con un control interno homólogo que puede ser detectado simultáneamente a lo largo de las secuencias diana puede ser ventajoso.

- 25 Los cebadores para PCR, RT-PCR y/o qPCR se seleccionan dentro de regiones o bacterias específicas que únicamente van a amplificar una región de ADN que es seleccionada para dicho organismo específico. Alternativamente, los cebadores se seleccionan para hibridar y amplificar una sección de ADN que es común para todos los organismos. La selección y la construcción de cebadores son bien conocidas en la técnica. En general, un cebador se localiza en cada extremo de la secuencia que va a ser amplificada. Normalmente, tales cebadores estarán normalmente entre 10 a 35 nucleótidos de longitud y tienen una longitud preferida entre 18 a 22 nucleótidos. La
- 30 secuencia más pequeña que puede amplificarse es de aproximadamente 50 nucleótidos de largo (por ejemplo, un cebador de avance y uno reverso, ambos de 20 nucleótidos de largo, cuya locación en las secuencias está separada por al menos 10 nucleótidos). Secuencias mucho más largas pueden ser amplificadas. Un cebador se denomina, el "cebador adelantado" y se localiza a la izquierda de la región que va a ser amplificada. El cebador adelantado es idéntico en secuencia a una región en la hebra superior del ADN (cuando un ADN de doble hebra se representa
- 35 mediante la convención donde la hebra superior muestra tener una polaridad en la dirección 5' a 3'). La secuencia del cebador adelantado es tal que este hibridiza con la hebra del ADN con la que es complementaria a la hebra superior de ADN. El otro cebador se denomina, el "cebador reverso" y se localiza en el extremo derecho de la región que va a ser amplificada. La secuencia del cebador reverso es tal que es complementaria en secuencia, es decir, es el complemento reverso de una secuencia en una región en la hebra superior del ADN. Los cebadores del PCR deben
- 40 elegirse sujetos a un número de condiciones. Los cebadores del PCR deben ser lo suficientemente largos (preferiblemente 10 a 30 nucleótidos de largo) para minimizar la hibridación a no más de una región en la plantilla. Los cebadores con corridas largas de una sola base deben de evitarse, en la medida de lo posible. Los cebadores deben, preferiblemente, tener un contenido G+C en un porcentaje de entre el 40 y el 60%. Si es posible, el contenido porcentual de G+C en el extremo 3' del cebador debe ser mayor que el contenido porcentual de G+C en el extremo 5'
- 45 del cebador. Los cebadores no deben de contener secuencias que puedan hibridar con otra secuencia dentro del cebador (es decir, palíndromos). Dos cebadores utilizados en la misma reacción de PCR no deben de hibridar entre ellos. Aunque los cebadores para PCR se eligen preferiblemente sujetos a las recomendaciones mencionadas anteriormente, no es necesario que los cebadores cumplan con estas condiciones. Otros cebadores podrían funcionar, pero tienen menos probabilidades de producir buenos resultados.

- 50 Los cebadores para PCR que se pueden utilizar para amplificar ADN dentro de una secuencia dada se pueden elegir utilizando uno de los varios programas computacionales que están disponibles. Tales programas escogen cebadores que son óptimos para la amplificación de una determinada secuencia (es decir, tales programas escogen cebadores sujetos a las condiciones mencionadas anteriormente, además de otras condiciones que maximizan la funcionalidad de los cebadores para PCR). Un programa computacional es Genetics Computer Group (GCG que recientemente se
- 55 convirtió en Accelrys) que es un paquete de análisis que tiene una rutina para la selección de cebadores para PCR.

Los cebadores de oligonucleótidos y las sondas que se discuten a continuación se pueden realizar en un número de maneras. Una manera de hacer estos oligonucleótidos es sintetizarlos utilizando un sintetizador disponible comercialmente. Existe una variedad de tales sintetizadores que son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Los ácidos nucleicos también pueden ser detectados por métodos de hibridación. En estos métodos, los ácidos nucleicos marcados se pueden añadir a un sustrato que contiene sondas de ácidos nucleicos marcados o no marcados.

5 Alternativamente, los ácidos nucleicos marcados o no marcados se pueden añadir a un sustrato que contiene sondas de ácidos nucleicos marcados. Los métodos de hibridación se describen en, por ejemplo, Micro Array Analysis, Marc Schena, John Wiley and Sons, Hoboken N.J. 2003.

10 Los métodos para la detección de ácidos nucleicos pueden incluir el uso de un marcador. Por ejemplo, los marcadores radiactivos se pueden detectar utilizando películas fotográficas o fosfoimagen (para la detección y cuantificación de la incorporación de fosfato radiactivo). Los marcadores fluorescentes se pueden detectar y cuantificar utilizando un fosfodetector para detectar la luz emitida (véase la Patente de EE.UU No. 5,143,854 para un aparato ejemplar). Los marcadores enzimáticos típicamente se detectan al proporcionarle un sustrato a la enzima y midiendo el producto de la reacción producido por acción de la enzima sobre el sustrato. Los marcadores colorimétricos se detectan simplemente visualizando la etiqueta de color. En un ejemplo, las moléculas de ácidos nucleicos amplificadas se visualizan por la tinción directa de los productos amplificados utilizando un colorante intercalante. Como es aparente para los expertos en la técnica, colorantes ejemplares incluyen, pero no se limitan a, SYBR verde, SYBR azul, DAPI, yoduro de propidio y bromuro de etidio. La cantidad de colorantes luminiscentes intercalados en las moléculas de ADN amplificadas es directamente proporcional a la cantidad de productos amplificados, los cuales pueden ser convenientemente cuantificados utilizando métodos de detección convencionales de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una variación de tal aproximación es la electroforesis en gel de los productos amplificados seguido de la tinción y la visualización del colorante intercalante seleccionado. Alternativamente, la hibridación de sondas de oligonucleótidos marcadas (por ejemplo, sondas fluorescentes como la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) y sondas colorimétricas) se puede utilizar para detectar la amplificación. Donde sea deseado, la amplificación específica de las secuencias representativas en el genoma de la entidad biológica que esta siendo probada, se pueden verificar por secuenciación o demostrando que los productos amplificados tienen el tamaño predicho, exhiben el patrón predicho de digestión de restricción, o hibridan a las secuencias nucleotídicas clonadas correctas.

30 La presente invención también comprende kits. Por ejemplo, el kit puede comprender un sustrato que contiene una molécula de ácido nucleico para la actividad de la enzima seleccionada o una mezcla en la muestra (mientras que no permite señales de interferencia de la ADN polimerasa), medio de incubación para poder incubar a la muestra y al sustrato bajo condiciones apropiadas para la actividad de la enzima, y medios para determinar específicamente la presencia (y/o la cantidad) de moléculas de ácidos nucleicos resultantes de la acción de la enzima seleccionada o una mezcla de una molécula sustrato de ácido nucleico (como un indicador de la presencia del microorganismo). Tal kit puede también comprender a otros reactivos apropiados para realizar los métodos novedosos de la presente invención, para el cribado de fluidos corporales normales estériles para la presencia de ausencia de microorganismos en estos y para proporcionar un diagnóstico, información pronóstica del manejo del paciente, así como cebadores útiles para amplificar moléculas de ácidos nucleicos que sean correspondientes para organismos en general o específicamente, tampones y reactivos para aislar ADN, y reactivos para realizar PCR. El kit puede además incluir oligonucleótidos marcados para ser detectados, y que puedan hibridar a una secuencia de ácidos nucleicos que codifiquen para un péptido correspondiente al organismo de interés. El kit también puede contener una muestra control o una serie de muestras control que pueden ser probadas y comparadas con una muestra de prueba contenida. Cada componente del kit puede estar dentro de un contenedor individual y todos los varios contenedores pueden encontrarse dentro de un solo paquete, junto con instrucciones para interpretar los resultados de los ensayos realizados utilizando el kit.

45 También debe ser apreciado que los métodos comprenden además realizar un análisis completo o parcial del genoma del microorganismo y/o un análisis de secuencias del transcriptoma utilizando los principios y enseñanzas que se proporcionaron en la presente, y en donde el análisis completo o parcial del genoma del microorganismo y/o el análisis de las secuencias del transcriptoma se pueden realizar simultáneamente, en concierto, o en paralelo utilizando una preparación de muestra única como se describe en la presente. También debe apreciarse que los métodos novedosos de la invención, descritos en la presente, pueden proporcionar la medida de diagnóstico y la detección de agentes con actividad antimicrobiana y/o antipolimerasa, útiles en el manejo de pacientes.

55 La descripción detallada que antecede se ha proporcionado solamente para claridad de comprensión y no se deben inferir limitaciones innecesarias, por lo que la modificación será obvia para los expertos en el tema. No es una admisión que nada de la información proporcionada en la presente sea un aspecto relevante de las invenciones actualmente reivindicadas, o que cualquier publicación a la que se haga referencia específica o implícitamente sea una técnica anterior.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que el que se entiende comúnmente por los de habilidades ordinarias en el tema, a los que pertenece esta invención.

60 Mientras que la invención se ha descrito en conexión con realizaciones específicas de la misma, se entenderá que es capaz de modificaciones adicionales y esta solicitud pretende cubrir cualquiera de las variaciones, usos, o

adaptaciones de la invención siguiendo, en general, los principios de la invención e incluyendo tales desviaciones de la presente divulgación según se establece dentro de la práctica conocida o habitual dentro de la técnica a la que se refiere la invención y como pueden aplicarse a las características esenciales antes expuestas y como se menciona a continuación, en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

5

REIVINDICACIONES

1. Un kit de ensayo para uso en un método para la detección de la actividad de la polimerasa como un indicador de la presencia de un microorganismo en una muestra que comprende:
- 5 (a) un sustrato de ADN no ligable que consta de una hebra de oligonucleótido en sentido y una hebra de oligonucleótido antisentido, en la que las dos hebras se superponen para formar una región de doble hebra y una porción de hebra sencilla del oligonucleótido antisentido que actúa como una plantilla son la hebra de oligonucleótido en sentido de la región de doble hebra funcionando como un cebador para crear un producto de extensión en presencia de la actividad de la polimerasa;
- 10 (b) un cebador reverso que hibrida específicamente con el producto de la extensión creada por la actividad de la polimerasa
- (c) un cebador de avance que hibrida específicamente con el producto de amplificación creada por el primer reverso, en el que cada uno del cebador, de avance o reverso, es una molécula separada del sustrato de ADN no ligable.
2. El kit de la reivindicación 1 que comprende, además:
- 15 (d) reactivos de lisis celular diferencial que permiten que únicamente la polimerasa derivada de microorganismos viables para modificar el sustrato específico de polimerasa.
3. El kit de ensayo de las reivindicaciones 1 o la reivindicación 2, en el que el microorganismo que va a ser detectado es un microorganismo viable en la muestra.
4. El kit de ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el microorganismo que va a ser detectado es un microorganismo intacto en la muestra.
- 20 5. El kit de ensayo de la reivindicación 4, en el que el microorganismo intacto que va a ser detectado es uno en el que el gen de la polimerasa de ácidos nucleicos y su proteína polimerasa activa traducida es esencial para la viabilidad del microorganismo.
6. El kit de ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la muestra en la que el microorganismo va a ser detectado es un fluido corporal normalmente estéril.
- 25 7. El kit de ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la muestra en la que el microorganismo va a ser detectado es preparada de lisados crudos celulares o fracciones de células purificadas.
8. El kit de ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la muestra en la que el microorganismo va a ser detectado comprende a una muestra de hemocultivo o de sangre.
- 30 9. El kit de ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el sustrato de la polimerasa está inmovilizado.
10. El kit de ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la polimerasa es bien sea un ADN o ARN polimerasa.
11. El kit de ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además una sonda para PCR cuantitativo para monitorizar PCR.
- 35 12. El kit de ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende además una muestra de control o una serie de muestras control que pueden ser ensayadas y comparadas con una muestra de prueba.

Diagrama de Plantillas

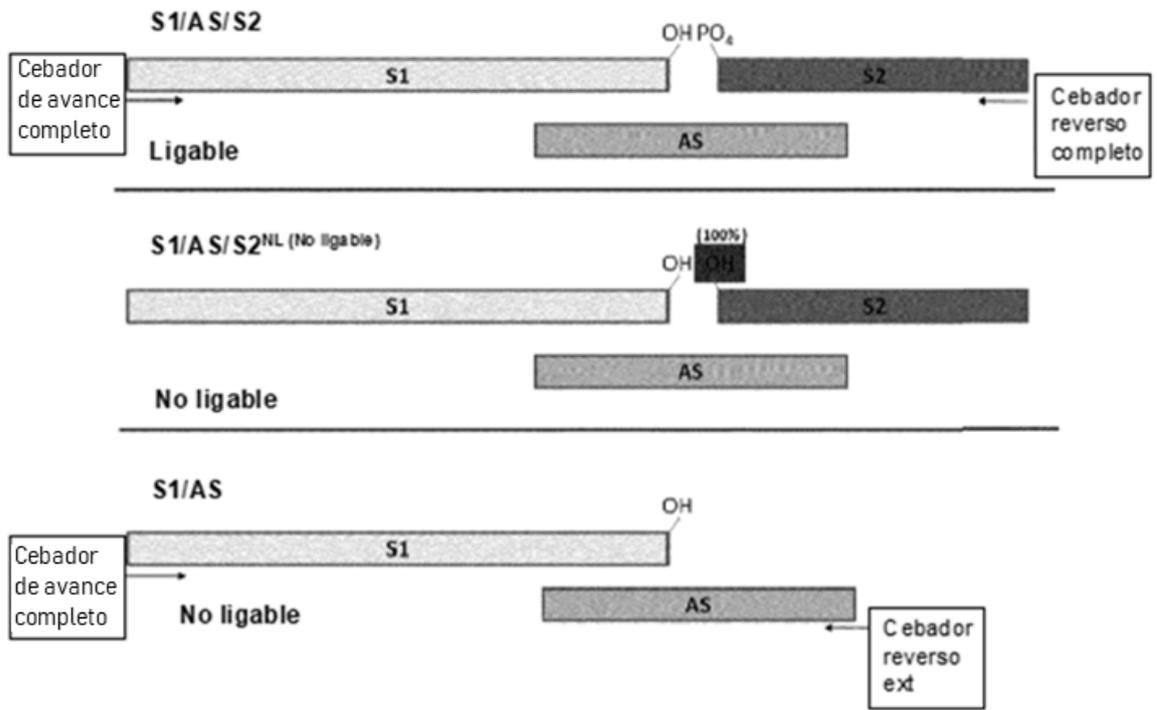


Figura 1A

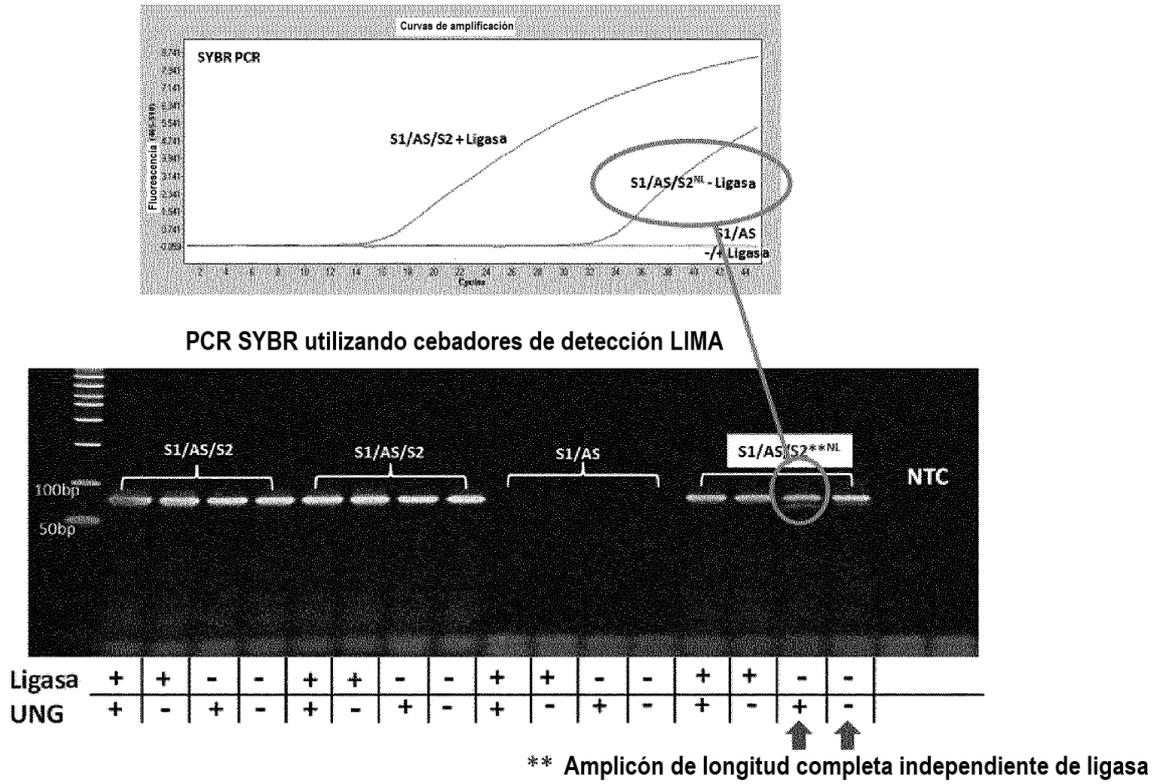
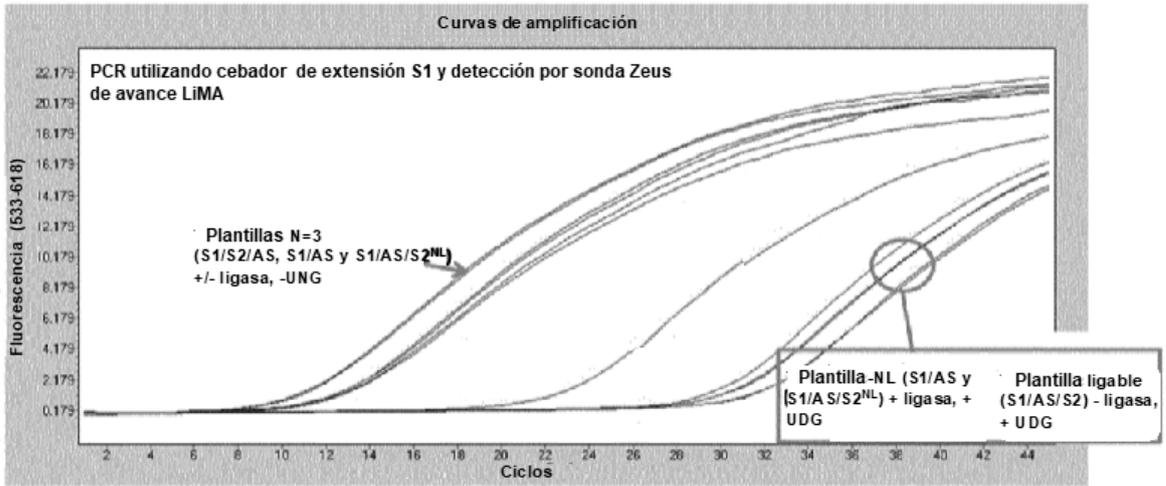


Figura 1B



Análisis en gel de las curvas anteriores:

PCR usando cebador reverse de extensión S1 y avance LIMA

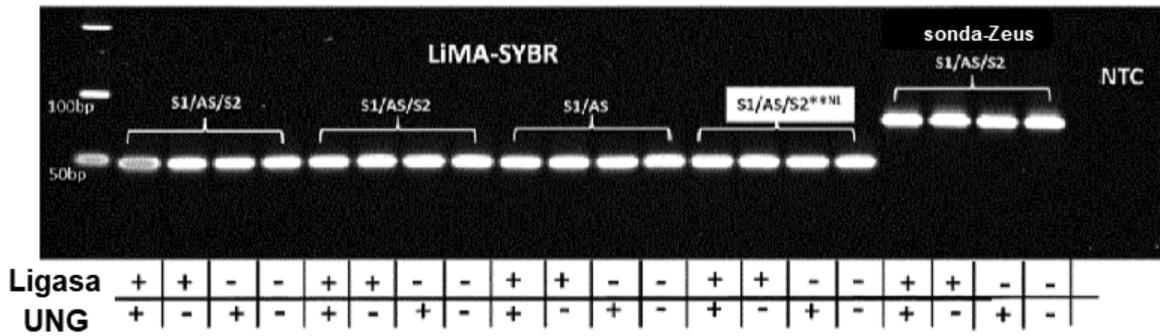


Figura 1C

Detección de extensión S1 utilizando 3 ADN polimerasas comerciales diferentes

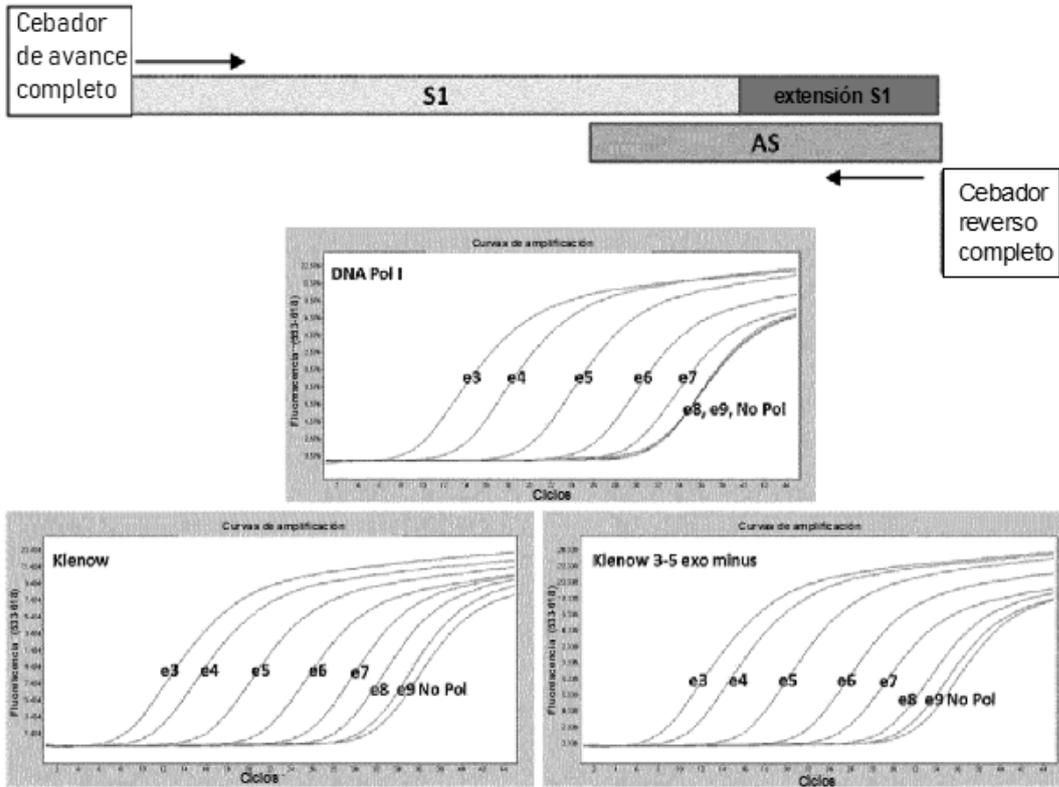


Figura 1D

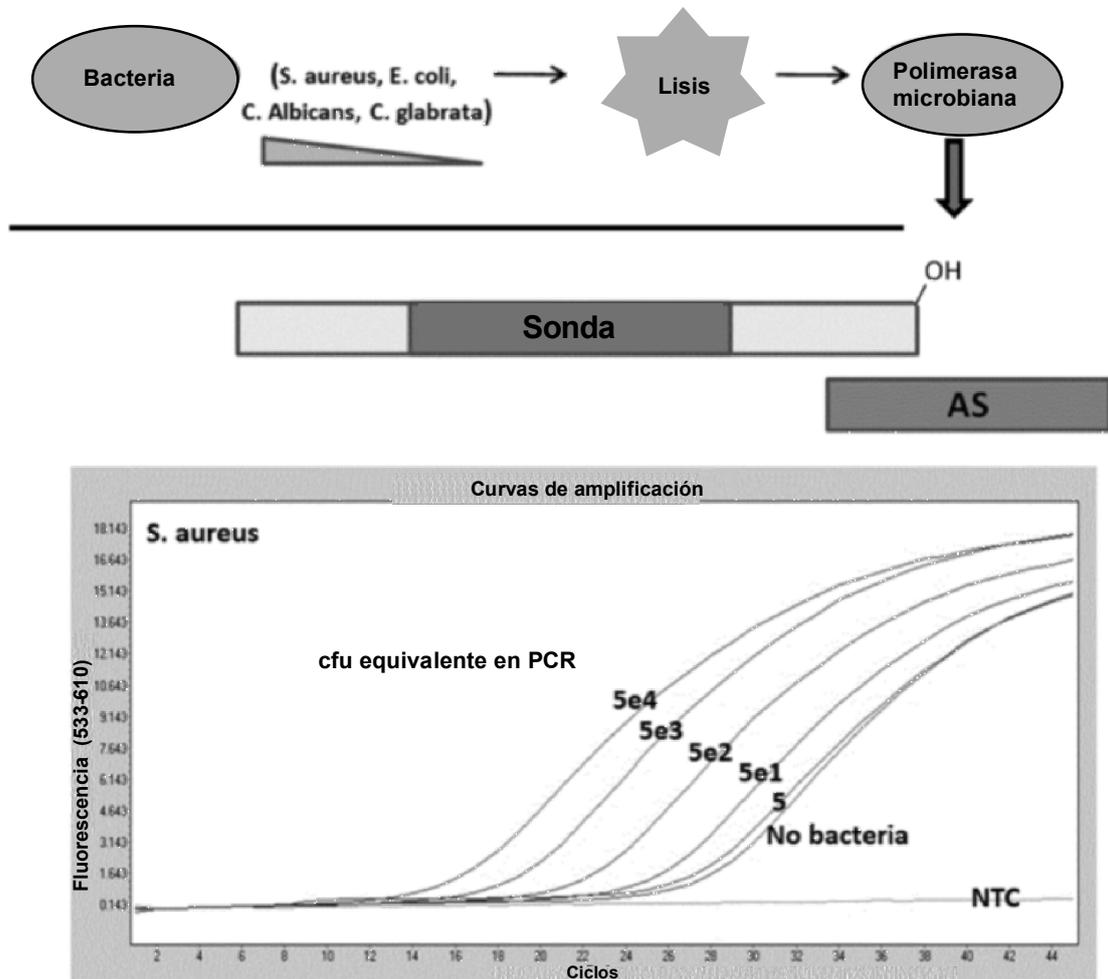


Figura 2A

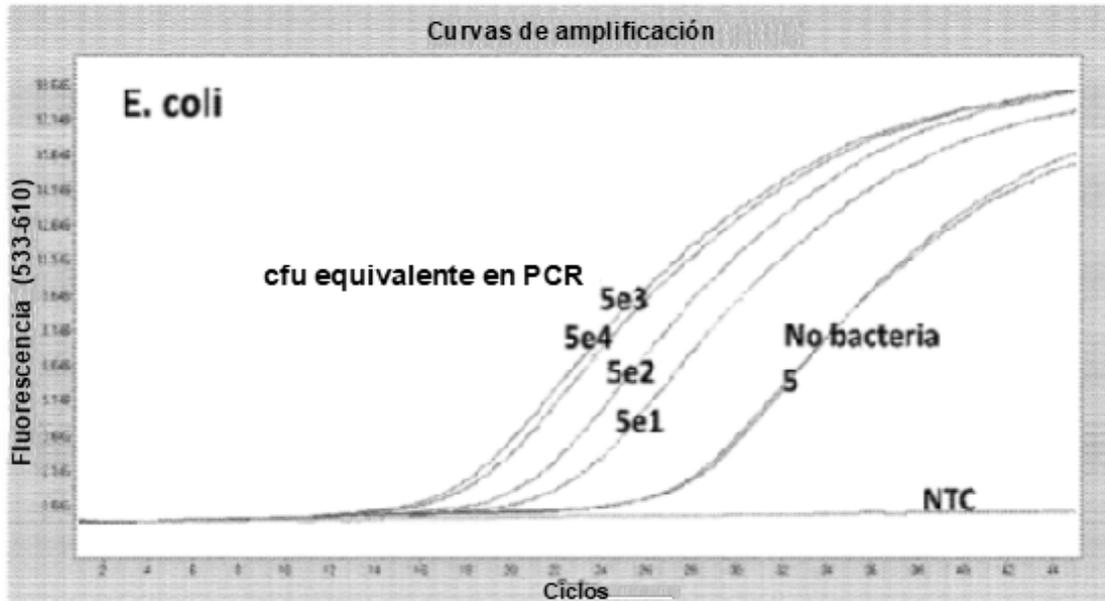


Figura 2B

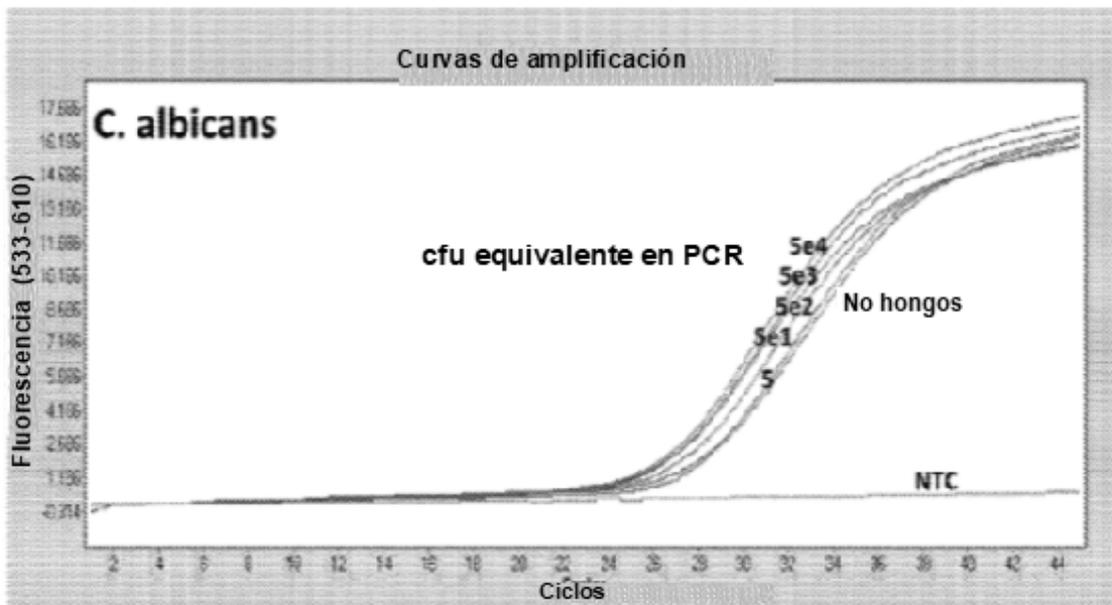


Figura 2C

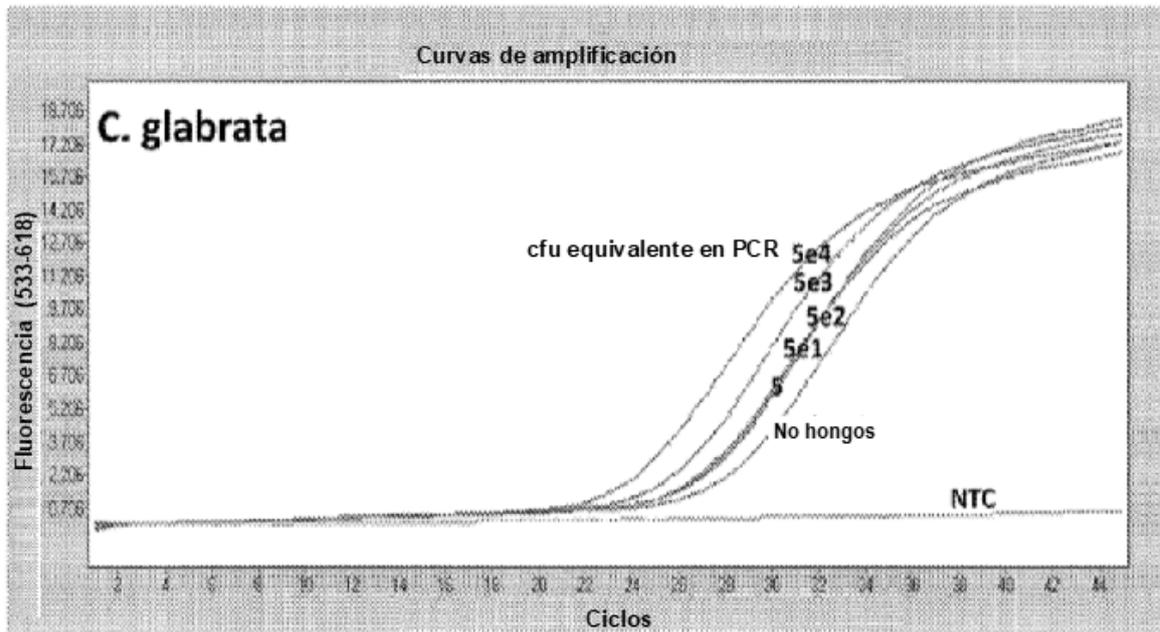


Figura 2D

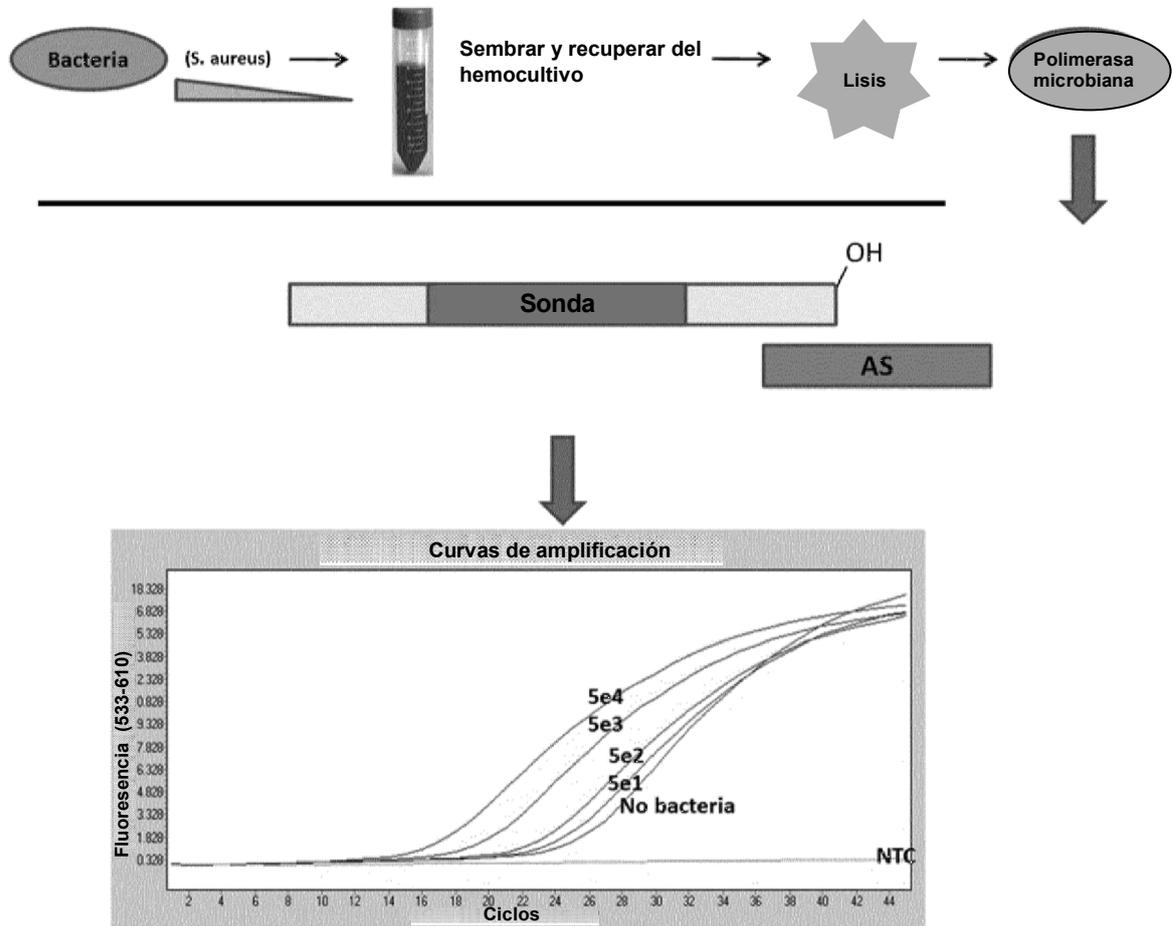


Figura 3