

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 449 665**

21 Número de solicitud: 201231456

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

19.09.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

20.03.2014

88 Fecha de publicación diferida del informe sobre el estado de la técnica:

26.03.2014

Fecha de la concesión:

10.07.2014

45 Fecha de publicación de la concesión:

17.07.2014

73 Titular/es:

**SERVIZO GALEGO DE SAÚDE-CONSELLERIA DE
SANIDADE, XUNTA DE GALICIA (50.0%)
Edificio Administrativo de San Lázaro s/n
15703 Santiago de Compostela (A Coruña) ES y
FUNDACIÓN DO COMPLEXO HOSPITALARIO
UNIVERSITARIO A CORUÑA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BOU ARÉVALO, Germán;
FERNÁNDEZ GONZÁLEZ, Ana y
TÓMAS CARMONA , Maria Del Mar**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

54 Título: **Procedimiento para el diagnóstico clínico de una enfermedad infecciosa basada en el empleo de la PCR cuantitativa, oligonucleótidos marcados de 8 a 9 nucleótidos de longitud y la UNG del Bacalao del Atlántico (Gadus morhua).**

ES 2 449 665 B2

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 449 665**

21 Número de solicitud: 201231456

57 Resumen:

La presente invención proporciona un procedimiento, útil para su uso en un laboratorio de microbiología clínica, que permite la determinación de la presencia o ausencia de un microorganismo en una muestra Biológica de un sujeto con un alto grado de fiabilidad utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) realizada de forma cuantitativa en tiempo real. Dicho procedimiento comprende los siguientes pasos:

a. Llevar a cabo un tratamiento de la mezcla de reacción que se utilizará para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) realizada de forma cuantitativa en tiempo real con la Uracil-ADN-Glicosilasa procedente del Bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) de SEQ ID No 3 o con una variante de la misma; y

b. Determinar la presencia o ausencia del microorganismo en la muestra biológica, tras tratamiento de la mezcla de reacción según el apartado a), a través de la determinación de la presencia o ausencia de amplicones procedentes de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) realizada de forma cuantitativa en tiempo real; donde dicha reacción en cadena de la polimerasa (PCR) emplea ADN, ADN complementario (ADNc) ó ADN de hebra simple obtenido por retrotranscripción de ácido ribonucleico (ARN) de la muestra biológica, al menos un par de cebadores específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado, una ADN polimerasa termoestable y una sonda marcada fluorescentemente, donde dicha sonda marcada fluorescentemente consiste en un oligonucleótido con una longitud de 8 a 9 nucleótidos marcado con un fluoróforo, preferiblemente dicha sonda presenta una longitud de 8 nucleótidos.

ES 2 449 665 B2

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para el diagnóstico clínico de una enfermedad infecciosa basada en el empleo de la PCR cuantitativa, oligonucleótidos marcados de 8 a 9 nucleótidos de longitud y la UNG del Bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*).**5 Campo de la técnica**

La presente invención se refiere al campo del diagnóstico clínico. Más concretamente al diagnóstico clínico mediante la utilización de la técnica de la PCR en tiempo real con sondas marcadas fluorescentemente constituidas por oligonucleótidos con una longitud entre 8 y 9 nucleótidos.

Antecedentes de la invención

10 La siguiente discusión de los antecedentes de la invención se proporciona simplemente para ayudar al lector a comprender la invención y no se reconoce que describa o constituya técnica anterior de la presente invención.

Hoy en día el diagnóstico mediante técnicas moleculares ha cambiado la práctica clínica en relación a las enfermedades infecciosas. En este sentido, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la técnica molecular más desarrollada actualmente y tiene un amplio abanico de posibilidades, entre las que se incluyen la detección de diversos patógenos, la individualización de nuevos agentes infecciosos o el seguimiento de la prevalencia de diversas enfermedades infecciosas en la población. Así, la PCR cuantitativa o en tiempo real se está aplicando hoy en día en tres grandes campos clínicos:

1. En el diagnóstico clínico o etiológico, donde la PCR es muy útil sobre todo en ausencia de métodos de diagnóstico alternativos o cuando éstos son muy complejos, para mejorar la eficacia diagnóstica complementando métodos convencionales o si se requiere un diagnóstico rápido y precoz del agente etiológico que permita iniciar el tratamiento específico lo antes posible.
2. En el control del tratamiento, donde la PCR se utiliza tanto para la selección de los pacientes que deben ser tratados como para, una vez iniciado el tratamiento, comprobar su eficacia, para lo cual es importante disponer de métodos cuantitativos.
3. En la caracterización genética del microorganismo (genotipificación) e identificación de mutaciones determinantes de resistencias a fármacos o de virulencia.

Así, la utilización de la técnica de la PCR en tiempo real en los laboratorios de Microbiología Clínica supone un avance muy significativo en el campo del diagnóstico clínico, el control del tratamiento así como en la genotipificación. Adicionalmente, ésta técnica se vería notablemente mejorada con la utilización de sondas (en inglés "probes") cortas, es decir sondas marcadas fluorescentemente con una longitud de 8 a 9 nucleótidos (nt). Esto es debido por un parte a su gran variabilidad y por otra al hecho en sí que la utilización de la PCR a tiempo real utilizando sondas cortas presenta la necesidad de utilizar un rango de tamaño específico de los transcritos (de aquí en adelante amplicones) amplificados.

35 Así, es importante matizar que dichos amplicones deben poseer un tamaño entre 60 y 120 nucleótidos para que de esta forma se incremente la eficiencia de la amplificación y se reduzca el tiempo de reacción. La razón para ello es porque los fragmentos pequeños se desnaturalizan más fácilmente que aquellos fragmentos más grandes (> 120 nucleótidos) a una temperatura de 95° y exigen de un menor

tiempo de reacción. De esta forma es conocido en el estado de la técnica que la eficiencia de amplificación es menor cuanto mayor sea el tamaño del amplicon. Por lo tanto, se recomienda la amplificación de transcritos que presenten un tamaño entre 50 y 150 nucleótidos, mas concretamente entre 60 y 120 nucleótidos, aún más concretamente entre 70 y 110 nucleótidos cuando se utilizan sondas cortas. De hecho, la utilización de sondas cortas (8-9 nucleótidos), amplifican en su mayoría fragmentos comprendidos entre 70 y 110 nucleótidos siguiendo indicaciones del software Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net/>) utilizando los ajustes optimizados de forma predeterminada, presentando la temperatura de fusión de ambos cebadores ajustada a 59-61 ° C y la longitud del cebador fijada en 18-27 nucleótidos. Además, la utilización de dicha longitud de amplicones (70-110 nucleótidos) permite una adecuada eficiencia de amplificación aumentando la sensibilidad del diagnóstico etiológico en muestras clínicas.

Sin embargo, el empleo de esta longitud de amplicon y sondas cortas presenta una importante limitación, los falsos positivos producidos como resultado de la contaminación resultante de las amplificaciones realizadas previamente en los laboratorios de Microbiología clínica (en inglés “carry over”). Así, se ha de tener en cuenta que más de un 90% de los amplicones que detectan las sondas cortas se encuentran en un rango entre 70-110 nucleótidos, y que su total eliminación como posibles contaminantes resulta imprescindible para garantizar la seguridad de trabajar con este sistema en los laboratorios de Microbiología Clínica. No obstante, la total eliminación de dichos amplicones en un rango entre 70-110 nucleótidos resulta sumamente complicado en un laboratorio de Microbiología Clínica.

Así, hay que tener en cuenta que la limitación del uso de material o la separación física de unidades de trabajo en los laboratorios de Microbiología Clínica no garantiza la total eliminación de los contaminantes (en ingles “carry over contamination”). Entre otras cosas, porque de hecho, dichos contaminantes se transmiten principalmente por el propio personal técnico del laboratorio y porque estos contaminantes pueden permanecer en muchas superficies largos períodos de tiempo cuando no son sistemáticamente identificados y descontaminados después de cada contacto potencial con los productos de PCR, lo cual en la clínica diaria resulta complicado de llevar a cabo.

Adicionalmente, hay que tener en cuenta que los contaminantes de ADN localizados en los equipos y pipetas son de difícil descontaminación con UV (radiación ultravioleta) presumiblemente debido a que es menos eficaz con el ADN seco y que esta técnica no es ni siquiera eficaz en aquellos amplicones de pequeño tamaño, por ejemplo de 73 nucleótidos. Además, no es posible establecer un protocolo de eliminación de amplificaciones de ADN contaminantes de pequeño tamaño (73 nucleótidos) para PCR cuantitativas o en tiempo real, ya que requiere aplicación de luz UV durante 10 min a corta distancia solo del Buffer que forma parte de la mezcla de reacción, no siendo aplicable ni a oligonucleótidos, ni a la Taq polimerasa, ni a los cebadores.

Por todo ello, encontrar una solución rápida y sencilla que permita la adecuada eliminación de estos amplicones de pequeño tamaño (que como anteriormente hemos comentado son los que permiten una mayor eficiencia de amplificación, y por tanto sensibilidad diagnóstica) permitiría el diagnóstico con gran sensibilidad y especificidad de numerosas enfermedades infecciosas , trabajando con la técnica de PCR a tiempo real con sondas cortas en los laboratorios de Microbiología Clínica.

Breve description de la invención

Por lo tanto, la presente invención resuelve las limitaciones existentes a la hora de trabajar con la técnica de la PCR a tiempo real con sondas cortas y amplicones de pequeño tamaño en el campo del diagnóstico clínico. Para ello, en un primer aspecto de la presente invención proponemos un procedimiento, útil para su uso en un laboratorio de Microbiología Clínica, que permite la determinación de la presencia o ausencia de un microorganismo en una muestra Biológica de un sujeto con un alto grado de fiabilidad utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) realizada de forma cuantitativa en tiempo real. Dicho procedimiento comprende los siguientes pasos:

- a. Llevar a cabo un tratamiento de la mezcla de reacción que se utilizará para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) realizada de forma cuantitativa en tiempo real con la Uracil-ADN-Glicosilasa procedente del Bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) de SEQ ID No 3 o con una variante de la misma; y
- b. Determinar la presencia o ausencia del microorganismo en la muestra Biológica, tras tratamiento de la mezcla de reacción según el apartado a), a través de la determinación de la presencia o ausencia de amplicones procedentes de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) realizada de forma cuantitativa en tiempo real;

donde dicha reacción en cadena de la polimerasa (PCR) emplea ADN, ADN complementario (ADNc) ó ADN de hebra simple obtenido por retrotranscripción de ácido ribonucleico (ARN) de la muestra Biológica, al menos un par de cebadores específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado, una ADN polimerasa termoestable y una sonda marcada fluorescentemente, donde dicha sonda marcada fluorescentemente consiste en un oligonucleótido con una longitud de 8 a 9 nucleótidos marcado con un fluoróforo, preferiblemente dicha sonda presenta una longitud de 8 nucleótidos.

En una realización preferida de la invención, dicha reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplifica amplicones con una longitud entre 60 y 120 nucleótidos, más preferentemente amplicones que presenten una longitud entre 70 y 110 nucleótidos, más preferentemente amplicones que presenten una longitud entre 75 y 110 nucleótidos.

En otra realización preferida de la invención, la sonda marcada fluorescentemente es una sonda Taqman.

En otra realización de la presente invención, el sujeto es un humano.

En aún otra realización de la presente invención, el microorganismo es un microorganismo que provoca patología infecciosa (patógeno). Preferentemente, dicho microorganismo infeccioso se selecciona de la lista que consiste en *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*, *Virus de la Varicela Zoster*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella holmensis*, el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, *Haemophilus influenzae* o *Streptococcus pneumoniae*.

Un segundo aspecto de la presente invención, se refiere a un procedimiento para diagnosticar una patología causada por un microorganismo en base a la presencia o ausencia de dicho microorganismo en una muestra biológica de un sujeto, que comprende:

- a. Toma de muestra biológica de un sujeto;
- 5 b. Preparar una mezcla de reacción que permita determinar la presencia o ausencia del microorganismo en la muestra biológica a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) realizada de forma cuantitativa en tiempo real;
- 10 c. Llevar a cabo un tratamiento de la mezcla de reacción que se utilizará para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) realizada de forma cuantitativa en tiempo real con Uracil-ADN-Glicosilasa procedente del Bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) o con una variante de la misma; y
- 15 d. Determinar la presencia o ausencia del microorganismo en la muestra biológica, tras tratamiento de la mezcla de reacción según el apartado c), a través de la determinación de la presencia o ausencia de amplicones procedentes de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) realizada de forma cuantitativa en tiempo real;

donde dicha reacción en cadena de la polimerasa (PCR) emplea ADN, ADN complementario (ADNc) ó ADN de hebra simple obtenido por retrotranscripción de ácido ribonucleico (ARN), de la muestra biológica, al menos un par de cebadores específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado, una ADN polimerasa termoestable y una sonda marcada fluorescentemente, donde dicha sonda marcada fluorescentemente consiste en un oligonucleótido con una longitud de 8 a 9 nucleótidos marcado con un fluoróforo, preferiblemente 8 nucleótidos; y

En una realización preferida de este segundo aspecto de la invención, dicha reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplifica amplicones con una longitud entre 50 y 120 nucleótidos, más preferentemente amplicones que presenten una longitud entre 70 y 110 nucleótidos, más preferentemente amplicones que presenten una longitud entre 75 y 110 nucleótidos.

En otra realización preferida de este segundo aspecto de la invención, la sonda marcada fluorescentemente es una sonda Taqman.

En otra realización de este segundo aspecto, el sujeto es un humano.

En aún otra realización del segundo aspecto, el microorganismo es un microorganismo que provoca patología infecciosa (patógeno). Preferentemente, dicho microorganismo infeccioso se selecciona de la lista que consiste en *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*, *Virus de la Varicela Zoster*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella holmensis*, el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, *Haemophilus influenzae* o *Streptococcus pneumoniae*.

En aún otra realización del segundo aspecto, el procedimiento de la invención se puede utilizar para diagnosticar enfermedades tales como la tosferina o la meningitis bacteriana.

Un tercer aspecto de la presente invención, se refiere a un kit adecuado para la determinación de la presencia o ausencia de un microorganismo de acuerdo con cualquiera de los aspectos precedentes, que comprende al menos los siguientes elementos:

- 5
- a. La Uracil-ADN-Glicosilasa procedente del Bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) de SEQ ID No 3 o una variante de la misma; y
 - b. Sonda/s marcada/s fluorescentemente con una longitud de 8 a 9 nucleótidos, preferiblemente de 8 nucleótidos.

En una realización preferida del tercer aspecto de la invención, el microorganismo a identificar y la sonda se seleccionan de cualquiera de la siguiente lista:

- 10
- a. *Bordetella pertussis* y la sonda marcada con un fluoróforo de SEQ ID No 4;
 - b. *Bordetella holmensis* y la sonda marcada con un fluoróforo de SEQ ID No 5;
 - c. Complejo *Mycobacterium tuberculosis* y la sonda marcada con un fluoróforo de SEQ ID No 6;
 - d. *Streptococcus pneumoniae* y la sonda marcada con un fluoróforo de ID No 7;
 - 15 e. *Neisseria meningitidis* y la sonda marcada con un fluoróforo de ID No 8;
 - f. *Listeria monocytogenes* y la sonda marcada con un fluoróforo de ID No 9; o
 - g. *Streptococcus agalactiae* y la sonda marcada con un fluoróforo de ID No 10.

Un cuarto aspecto de la invención, se refiere a un kit adecuado para el diagnóstico de la tosferina, que comprende al menos los siguientes elementos:

- 20
- a. La Uracil-ADN-Glicosilasa procedente del Bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) de SEQ ID No 3 o una variante de la misma; y
 - b. Las sondas marcadas con un fluoróforo de SEQ ID No 4 y SEQ ID No 5.

Un quinto aspecto de la presente invención, se refiere a un kit adecuado para el diagnóstico de la meningitis bacteriana, que comprende al menos los siguientes elementos:

- 25
- a. La Uracil-ADN-Glicosilasa procedente del Bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) de SEQ ID No 3 o una variante de la misma; y
 - b. Las sondas marcadas con un fluoróforo de SEQ ID No 8, SEQ ID No 9, SEQ ID No 7 y SEQ ID No 10.

- 30
- En una realización preferida del tercer, cuarto y quinto aspecto de la invención, el kit además comprende al menos uno de los siguientes elementos: un par de cebadores específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado y/o una ADN polimerasa termoestable.

En otra realización preferida del tercer, cuarto y quinto aspecto de la invención, el kit además comprende un control positivo, preferiblemente β -globina.

Descripción detallada de la invención

1. Definiciones

5 En el contexto de la presente invención se entiende por “**PCR cuantitativa en tiempo real**” una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ácido desoxirribonucleico (ADN). Para ello emplea, del mismo modo que la PCR convencional, un molde de ADN, al menos un par de cebadores específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado, y una ADN polimerasa termoestable; a dicha mezcla se
10 adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo que, en un termociclador que albergue sensores para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, permita medir la tasa de generación de uno o más productos específicos. Dicha medición, se realiza luego de cada ciclo de amplificación y es por esto que también se le denomina PCR en tiempo real (es decir, PCR inmediata, simultánea). En muchos casos el molde que se emplea para la PCR cuantitativa no es desde el principio
15 ADN, sino que puede ser ADN complementario (ADNc), de heBra simple, obtenido por retrotranscripción de ácido ribonucleico (ARN); en este caso, la técnica es una RT-PCR cuantitativa o en tiempo real, o RT-Q-PCR.

En el contexto de la presente invención se entiende por “sonda/s” aquellos oligonucleótidos marcados fluorescentemente utilizados en la PCR cuantitativa para detectar la aparición del producto deseado. El
20 fundamento de esta técnica se Basa en el empleo del FRET o transmisión de energía de resonancia, que es un mecanismo de transferencia de energía entre cromóforos. EL FRET se fundamenta en que la excitación de un cromóforo puede transferirse a otro cercano, generalmente cuando ambos se sitúan en la misma molécula, mediante un mecanismo acoplador dipolo-dipolo. En el caso de que los cromóforos sean fluorescentes (esto es, fluorocromos), el mecanismo subyacente continúa siendo el mismo: la
25 energía se transfiere, lo que desemboca en la aparición de fluorescencia.

En el contexto de la presente invención se entiende por “sonda/s Taqman” aquellas sondas empleadas en PCR a tiempo real que permiten medir la producción de productos de PCR mediante un sistema de sondas marcadas mediante dos fluorocromos. Su utilidad radica en que poseen un fluoróforo en su extremo 3' y una molécula en el 5' que Bloquea su emisión de fluorescencia (denominada en inglés
30 «quencher»); esta sonda marcada híbrida específicamente en la parte central del producto de PCR a obtener. De este modo, cuando se efectúa la PCR (con la sonda más el par de cebadores específicos), la sonda híbrida en el amplicon, pero, debido a la cercanía del fluoróforo al quencher, no se emite fluorescencia; cuando la polimerasa se topa con la sonda la hidroliza mediante su actividad exonucleasa 5'-3', lo cual provoca la separación del quencher del fluorocromo y, por tanto, la emisión de
35 fluorescencia. Fluorescencia que está relacionada con la cantidad de amplicon producido.

En el contexto de la presente invención se entiende por “sonda corta” aquellos oligonucleótidos marcados fluorescentemente utilizados en la PCR cuantitativa para detectar la aparición del producto deseado que presenten una longitud de 8 o 9 nucleótidos, preferiblemente de 8 nucleótidos.

En el contexto de la presente invención se entiende por “amplicon/es” un fragmento de ADN (ácido desoxirribonucleico) amplificado y detectado por PCR a tiempo real. También son conocidos como productos de PCR.

5 En el contexto de la presente invención se entiende por “eficiencia de amplificación” la capacidad de la reacción de duplicar el número de copias de las cadenas de ADN en cada ciclo. (Bustin, S.A. & Nolan, T. 2004. Analysis of mRNA Expression by Real-Time PCR. In: Real-Time PCR; An Essential Guide. K.J. Edwards et al., editors. Horizon Bioscience. Wymondham, p. 125-184). Las eficiencias de la PCR en tiempo real se calculan a partir de las pendientes de la curva estándar (incluidas en el software) obtenidas después de realizar diluciones seriadas con las reacciones de la PCR en tiempo real (Pfaffl, 2004) de acuerdo a la
10 siguiente fórmula: $E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$.

En el contexto de la presente invención se entiende por C_p (Punto de cruce/Umbral del Ciclo o “crossing point” en inglés) para cada muestra, el número de ciclos necesarios para interceptar el valor umbral (la señal alcanza un determinado nivel de fluorescencia) se llama “ciclo umbral” o “threshold cycle” (C_t). El C_t es inversamente proporcional al número de copias iniciales del ADN muestra.

15 En el contexto de la presente invención se entiende por UNG procedente de *Thermotoga maritima* MSB8, la Uracil-ADN- Glicosilasa con NCBI Reference Sequence: NP_228321.1, cuya secuencia aminoacídica es SEQ ID No 1:

MYTREELMEIVSERVKKCTACPLHLNRTNVVVGEGNLDTRIVFVGEGPGEEDKTGRPFVGRAGMLLTELRESGIRRED
VYICNVVKKRPPNNRTPTPEEQAACGHFLLAQIEIINPDVIVALGATLSFFVDGKKVSITKVRGNPIDWLGGKKVIPTFHP
20 SYLLNRNSNELRRIVLEDIEKAKSFIKKEG

En el contexto de la presente invención se entiende por UNG procedente de la cepa K12 de la bacteria *E.coli*, la Uracil-ADN- Glicosilasa con la secuencia aminoacídica SEQ ID No 2:

MANELTWHDDVLAEEKQQPYFLNTLQTVASERQSGVTIYPPQKDVFNAFRFTELGDVKVVLGQDPYHGPQAHGLAFS
VRPGIAIPPSLLNMYKELENTIPGFTRPNHGYLESWARQGVLLNLTVLRAGQAHSHASLGWETFTDKVISLINQHREG
25 VVFLWGSQAQKKGAIIDKQRHHVLKAPHSPLSAHRGFFGCNHFVLANQWLEQRGETPIDWMPVLPASEE

En el contexto de la presente invención se entiende por UNG procedente del Bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*), la Uracil-ADN-Glicosilasa con la secuencia aminoacídica SEQ ID No 3:

MEFFGESWKKHLSGEFGKPYFIKLMGFVAEERKHYTVYPPPHQVFTWTQMCDIKDVKVVLGQDPYHGPNQAHGLCF
SVQRPVPPPPSLVNIYKELSTDIEDFVHPGHGDLGSWAKQGVLLNVLTVRAHQANSHKERGWEEQFTDAVVSWLNQ
30 NSNGLVFLWGSYAQKKGSAIDRKRRHHVLQTAHPSPLSVYRGFFGCRHFSKTNELLQKSGKKPIDWKEL

Se hace notar que en el contexto de la presente invención se entiende por variantes de la UNG procedente del Bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) aquellas UNGs con una identidad de secuencia del 95% o más, el 96% o más, el 97% o más, el 98% o más, el 99% o más con la SEQ ID No 3.

Descripción de la invención

Los inventores de la presente invención, analizaron 20 muestras clínicas humanas de distinto origen con el fin de analizar la presencia o ausencia del microorganismo *Bordetella pertussis* en dichas muestras. Para ello se llevó a cabo el procedimiento detallado en el ejemplo 1 utilizando PCR en tiempo real con una eficiencia de amplificación de 2. Los resultados se muestran en la tabla I abajo:

5 Tabla I

Número de muestra	Resultado PCR a tiempo real <i>Bordetella pertussis</i>	Ciclo positivo <i>Bordetella pertussis</i>	Control Negativo (Agua estéril)	Servicio Clínico	Tipo de Muestra
1	Positivo	18,07	Negativo	Lactantes	Aspirado nasofaríngeo
2	Positivo	12,63	Negativo	UCI pediátrica	Aspirado traqueal
3	Negativo		Negativo	Lactantes	Aspirado Bronquial
4	Negativo		Negativo	Lactantes	Aspirado nasofaríngeo
5	Positivo	25,37	Negativo	UCI pediátrica	Lavado Bronquial
6	Positivo	21,79	Negativo	Lactantes	Aspirado nasofaríngeo
7	Positivo	21,86	Negativo	UCI pediátrica	Aspirado nasofaríngeo
8	Negativo		Negativo	Lactantes	Aspirado nasofaríngeo
9	Negativo		Negativo	Lactantes	Aspirado nasofaríngeo
10	Negativo		Negativo	Pediatría	Aspirado nasofaríngeo
11	Positivo	23,35	39,37	Pediatría	Aspirado nasofaríngeo
12	Negativo	35,73	39,37	Pediatría	Aspirado nasofaríngeo
13	Negativo	38,82	39,37	Pediatría	Aspirado nasofaríngeo
14	Positivo débil	31,67/36,2	36,2/Negativo	Pediatría	Aspirado nasofaríngeo
15	Negativo	30,12	32,71	Lactantes	Aspirado nasofaríngeo
16	Negativo			Centro Cerceda	Aspirado nasofaríngeo
17	Positivo	23,17	40	Lactantes	Aspirado Bronquial
18	Positivo	23,98	37,38	Pediatría	Aspirado Bronquial
19	Negativo	31	31	Lactantes	Aspirado nasofaríngeo
20	Positivo	19	33	UCI pediátrica	Aspirado nasofaríngeo

Se hace notar que el resultado se entiende positivo si la amplificación presenta un Cp (Punto de cruce/Umbra del Ciclo o “crossing point” en inglés) inferior a 35. El resultado es dudoso si la amplificación presenta un Cp entre el ciclo 35 y 40 y el resultado es negativo si existe amplificación en un ciclo posterior a 40.

Los resultados de la tabla I muestran como a partir de la muestra numero 11, el control negativo (agua estéril utilizada en la mezcla de PCR a tiempo real) deja de ser negativo lo cual afecta claramente la fiabilidad del diagnóstico ya que se trata claramente de muestras contaminadas con amplicones

pequeños. Es más, muestras negativas tal y como las muestras 15 y 19 resultan ser claramente falsos positivos.

Estos resultados demuestran lo ya comentado con anterioridad, es decir, que en el diagnóstico clínico o etiológico, la causa más frecuente de falsos positivos es la contaminación, cuya fuente más común son las amplificaciones resultantes de las PCR realizadas previamente en el laboratorio. Este problema se ve exacerbado en el diagnóstico clínico utilizando sondas cortas y amplicones de pequeño tamaño lo que reduce significativamente la fiabilidad de este tipo de diagnóstico llegando a la conclusión que la utilización de sondas cortas en este tipo de diagnóstico clínico presenta una fiabilidad reducida.

Con el propósito de eliminar esta problemática e incrementar la fiabilidad del diagnóstico clínico los inventores estudiaron la posibilidad de realizar una descontaminación previa a la amplificación de posibles amplicones presentes en la muestra, para ello, utilizaron UNGs.

La Uracil-ADN-Glicosilasa (UNG) es una enzima reparadora del DNA que se encuentra en una amplia variedad de especies. Existen UNGs humanas (Lanes O, Leiros I, Smalas AO, Willassen NP. Identification, cloning, and expression of uracil-DNA glycosylase from Atlantic cod (*Gadus morhua*): characterization and homology modeling of the cold-active catalytic domain. *Extremophiles*. 2002 Feb;6(1):73-86.), animales y bacterianas . Entre las bacterianas destacamos además de la procedente del *E.coli* utilizada para esta invención, las UNGs de *B.subtilis*, *M.luteus* y *B. stearothermophilus*. La función normal de esta enzima es eliminar los residuos de uracilo (desoxiuracilo) . En 1990, se publicó un método que utilizaba la UNG para inactivar los productos de amplificación por PCR. Durante la amplificación, los TTPs son sustituidos por dUTPs que sirven como sustrato para la Taq polimerasa en lugar de los TTPs, por lo que los productos de amplificación contienen residuos de desoxiuracilo; esto sirve para distinguir químicamente los productos de PCR del template original, ya que sólo los productos sintetizados contendrán desoxiuracilo. Si en la mezcla de reacción existen productos de PCR con dUTP como contaminantes, la adición de UNG a la mezcla provocará la eliminación de los mismos del DNA y el producto de reacción es entonces susceptible de hidrólisis alcalina a elevadas temperaturas.

La UNG se añade a la mezcla de reacción antes de la amplificación; durante una corta incubación previa a la amplificación, los productos de PCR inespecíficos con dUTP que puedan haberse formado son rotos por la UNG, inactivándolos como templates, por lo que en los ciclos iniciales de PCR, la síntesis de DNA ocurre exclusivamente sobre el template original que se encuentra a salvo de la acción de la UNG.

Los descubridores de la presente invención procedieron a analizar el efecto de una de las muchas variedades de UNG conocidas, en concreto la Uracil-ADN-Glicosilasa procedente del *Gadus morhua*, sobre muestras clínicas tal y como se muestra en el ejemplo 2. Dicha Uracil-DNA--Glicosilasa procedente del Bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) fue capaz de producir una descontaminación total de la muestra. Se hace notar que, en este caso, los contaminantes estaban constituidos por amplicones con un tamaño superior a 120 nucleótidos, concretamente 127 nucleótidos. Así, destacar que en este caso la eficiencia de amplificación de la PCR a tiempo real para este tamaño de amplicon y por tanto la sensibilidad para la detección del mismo en la muestra clínica disminuye.

Debido a esta disminución en la sensibilidad ya que las sondas cortas empleadas en la presente invención exigen de un tamaño de amplicon entre 50 y 120 nucleótidos, más preferiblemente entre 70 y

110 nucleótidos, para conseguir una eficiencia de amplificación de 2, se modificaron las condiciones de reacción. De esta forma, se procedieron a analizar 5 muestras clínicas humanas de distinto origen, contaminadas con amplicones de diferentes tamaños procedentes de PCR a tiempo real de DNA de diferentes microorganismos que producen diversas patologías infecciosas. Estos eran *N. meningitidis* (amplicon de 65 nucleótidos), *S. agalactiae* (amplicon de 67 nucleótidos), *Listeria monocytogenes* (amplicon de 76 nucleótidos), *Virus de la Varicela Zoster-VVZ* (85 nucleótidos) y *Bordetella pertussis* (106 nucleótidos). Para ello se llevó a cabo el procedimiento detallado en el ejemplo 3 utilizando PCR en tiempo real con una eficiencia de amplificación de 2, con y sin un pre-tratamiento previo con 1U Uracil-ADN-Glicosilasa procedente del Bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*). Los resultados se muestran en la tabla II abajo.

Tabla II

Tamaño del amplicon (nucleótidos)	Patógeno (gen)	Amplificación de contaminantes 1/10.000	Amplificación de contaminantes UNG <i>Gadus morhua</i> 1U
65	<i>N. meningitidis</i> (sod)	5	26,27
67	<i>S. agalactiae</i> (sip)	8,25	28,74
76	<i>Listeria monocytogenes</i> (hly)	8,03	Negativo
85	VVZ (glicoproteína G)	5	Aprox. 35
106	<i>Bordetella pertussis</i> (ptxA)	12,15	Negativo

A la luz de los resultados mostrados, se puede llegar a la conclusión que la Uracil-ADN-Glicosilasa procedente del Bacalao del Atlántico es altamente eficaz en la descontaminación de amplicones pequeños, especialmente en aquellos que presenten un tamaño entre 70 y 110 nucleótidos. Teniendo en cuenta, como ya hemos comentado anteriormente, que la utilización de la técnica de la PCR en tiempo real con sondas constituidas por oligonucleótidos con una longitud entre 8 y 9 nucleótidos exige de la utilización de amplicones de tamaño entre 60 y 120 nucleótidos, donde además aproximadamente un 90% de dichos amplicones presentan un tamaño entre 70 y 110 nucleótidos, se confirma que la utilización de la Uracil-ADN-Glicosilasa procedente del Bacalao del Atlántico como herramienta de descontaminación previa al diagnóstico clínico o etiológico utilizando la técnica de la PCR en tiempo real con sondas cortas resulta imprescindible.

Con el objeto de comprobar si se producía el mismo efecto descontaminante con otras variedades de UNGs, los investigadores de la presente invención procedieron a analizar el efecto de la UNG procedente de *Thermotoga maritima* MSB8 sobre una muestra clínica, tal y como se detalla en el ejemplo 2. Dicha UNG fue capaz de producir una descontaminación total de la muestra. Tal y como sucedía en el caso previo, se hace notar que los contaminantes estaban constituidos por amplicones con un tamaño superior a 120 nucleótidos, concretamente los amplicones presentaban una longitud de 127 nucleótidos.

Por esta razón y debido a que las sondas cortas empleadas en la presente invención exigen de un tamaño de amplicon entre 60 y 120 nucleótidos para conseguir una eficiencia de amplificación de 2, más preferiblemente entre 70 y 110 nucleótidos, se modificaron las condiciones de reacción. De esta forma, como en el experimento anterior, se procedieron a analizar 5 muestras clínicas humanas de distinto

origen para analizar la presencia o ausencia de cinco tipos distintos de microorganismos infecciosos. Estos eran *N. meningitidis*, *S. agalactiae*, *Listeria monocytogenes*, *Virus de Varicela Zoster* y *Bordetella pertussis*. Para ello se llevó a cabo el procedimiento detallado en el ejemplo 3 utilizando PCR en tiempo real con una eficiencia de amplificación de 2 con y sin una descontaminación previa con la UNG procedente de *Thermotoga maritima* MSB8. Los resultados se muestran en la tabla III.

Tabla III

Tamaño del amplicon (nucleótidos)	Patógeno (gen)	Amplificación de contaminantes 1/10.000	Amplificación de contaminantes UNG MSB8 1U
65	<i>N. meningitidis</i> (sod)	8,94	25,18
67	<i>S. agalactiae</i> (sip)	8,03	30,36
76	<i>Listeria monocytogenes</i> (hly)	8,86	33,14
85	VVZ (glicoproteína G)	<5 (sin diluir)	18,01
106	<i>Bordetella pertussis</i> (ptxA)	12,70	32,92

Sorprendentemente la utilización de la UNG procedente de *Thermotoga maritima* MSB8 no eliminaba de forma suficiente los contaminantes cuando éstos estaban constituidos por amplicones de un tamaño que oscilaba entre 60 y 120 nucleótidos. De hecho, todos los valores mencionados en dicha tabla son interpretables como falsos positivos.

A la vista de los anteriores resultados, los investigadores de la presente invención repitieron los anteriores experimentos con otra UNG procedente de la cepa K12 de la Bacteria *E.coli* 1U. En este sentido, los investigadores procedieron a analizar el efecto de la UNG procedente de la Bacteria *E.coli* 1U sobre una muestra clínica tal y como se muestra en el ejemplo 2. Dicha UNG fue capaz de producir una descontaminación total de la muestra. Se hace notar que, como en los anteriores casos, los contaminantes estaban constituidos por amplicones con un tamaño superior a 120 nucleótidos, concretamente los amplicones presentaban una longitud de 127 nucleótidos.

Tal y como sucedió en el resto de los casos, debido a la necesidad de reducir el tamaño del amplicon se procedieron a analizar 5 muestras clínicas humanas de distinto origen para analizar la presencia o ausencia de cinco tipos distintos de microorganismos infecciosos. Estos eran *N. meningitidis*, *S. agalactiae*, *Listeria monocytogenes*, *Virus de la Varicela Zoster* y *Bordetella pertussis*. Para ello se llevó a cabo el procedimiento detallado en el ejemplo 3 utilizando PCR en tiempo real con una eficiencia de amplificación superior a 2 con y sin una descontaminación previa de amplicones con un tamaño que oscila entre 60 y 110 nucleótidos con la UNG procedente de la bacteria *E.coli* 1U. Los resultados se muestran en la tabla IV.

Tabla IV

Tamaño del amplicon	Patógeno (gen)	Amplificación de contaminantes 1/10.000	Amplificación de contaminantes UNG <i>E.coli</i> 1U
65	<i>N. meningitidis (sod)</i>	5	24,71
67	<i>S. agalactiae (sip)</i>	8,25	25,59
76	<i>Listeria monocytogenes (hly)</i>	8,03	Negativo
85	VVZ (<i>glicoproteína G</i>)	5	30,12
106	<i>Bordetella pertussis (ptxA)</i>	12,15	29,38

De nuevo, sorprendentemente la utilización de la UNG procedente de la bacteria *E.coli* 1U no eliminaba de forma suficiente los contaminantes cuando éstos estaban constituidos por amplicones de un tamaño que oscilaba entre 60 y 120 nucleótidos. De hecho, todos los valores facilitados, a excepción de uno, son interpretables como falsos positivos.

Así, si comparamos los resultados producidos entre la Uracil-ADN- Glicosilasa procedente de la bacteria *E.coli* y la UNG procedente del Bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) podemos comprobar como la UNG procedente del Bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) produce un nivel de descontaminación significativamente mas elevado, tal y como se ilustra en el tabla V abajo.

Tabla V

Tamaño del amplicon (nucleótidos)	Patógeno (gen)	Amplificación de contaminantes 1/10.000	Amplificación de contaminantes UNG <i>Gadus morhua</i> 1 U	Amplificación de contaminantes UNG <i>E.coli</i> 1 U	Diferencias de ciclos
65	<i>N.meningitidis(sod)</i>	5	26.27	24.71	1.56
67	<i>S.agalactiae(sip)</i>	8.25	28.74	25.59	3.15
76	<i>Listeria monocytogenes(hly)</i>	8.03	Neg	Neg	-
85	VVZ(<i>glycoprotein G</i>)	5	Aprox. 35	30.12	4.88
106	<i>Bordetella pertussis(ptxA)</i>	12.15	Neg	29.38	15.62

Además con el objeto de verificar que la UNG procedente del Bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) produce un nivel de descontaminación muy significativo de aquellos amplicones procedentes de reacciones previas de PCR que presenten un tamaño entre 60 y 120 nucleótidos, mas preferentemente entre 70 y 110 nucleótidos, se ampliaron el número de experimentos utilizando un mayor numero de amplicones, sondas cortas y muestras estudiadas. En este sentido, ver tabla VI abajo.

Tabla VI

Tamaño del amplicon	Patógeno (gen)	Cebadores(5'-3')	Sonda corta
94 nt	B-globina	D- CCTTTGGTTCTAAAATGACTATGTGA R- GCTTGTGACTAATCAAACATATAGCAG	TTCCTCTG 5
86nt	<i>Complejo MycoBacterium tuBerculoso(whi)</i>	D-GGACTCATCGATGTTCTTCCA R-GCCGACACATTTCTTGG	GACGGCGA
74 nt	<i>N.meningitidis(sod)</i>	D-TGGTTTCCACATCCATGAAA R-CGCCTAAACCAGCTGTCAA	CTGTGAGC
76 nt	<i>Listeria monocytogenes(hly)</i>	D-TCTGCATTCAATAAAGAAAATTCAA R-TTGGCGTCTTAGGACTTGC	ACCACCAG
94 nt	<i>Streptococcus pneumoniae(wzg)</i>	D- ACGCAACTGACGAGTGTGAC R- AATCGGTATTCTGACTTGACTTGA	CTGGGACT
91nt	<i>S.agalactiae(sip)</i>	D-AATATGGCAGCAAATAACATTTCA R-TCCAAGTATTAGCAGGTCCATAAA	TGGCAACA
106 nt	<i>Bordetella pertussis(ptxA)</i>	D-GGTCCATATACGGTCTCTATGACG R-CAGAAAGTTTCGCGATAAATGA	CGGGGTTC
84 nt	<i>Bordetella holmensii(recA)</i>	D-ATGGACGACAAAACCAGCA R- GCCAAACTGCTTTTCGATCT	GGCCCTGG

De nuevo sorprendentemente, se volvió a concluir que el nivel de descontaminación era suficientemente significativo para que no se produjesen falsos positivos en el rango de amplicones entre 70 y 110 nucleótidos.

25 De esta forma, se concluye que la utilización de la UNG procedente del Bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) previamente al diagnóstico clínico o etiológico utilizando la técnica de la PCR en tiempo real con sondas cortas, resuelve el problema de la baja fiabilidad de ésta. Esto es así porque esta UNG es la única enzima capaz de eliminar suficientemente aquellos amplicones procedentes de reacciones previas de PCR que presenten un tamaño entre 60 y 120 nucleótidos, mas preferentemente entre 70 y 110 nucleótidos, aún más preferentemente entre 75 y 110 nucleótidos.

Por lo tanto, la presente invención resuelve las limitaciones existentes a la hora de trabajar con la técnica de la PCR a tiempo real con sondas cortas y amplicones de pequeño tamaño en el campo del diagnóstico clínico. Para ello, en un primer aspecto de la presente invención proponemos un procedimiento, útil para su uso en un laboratorio de Microbiología clínica, que permite la determinación de la presencia o ausencia de un microorganismo en una muestra biológica de un sujeto con un alto grado de fiabilidad utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) realizada de forma cuantitativa en tiempo real. Dicho procedimiento comprende los siguientes pasos:

- a. Llevar a cabo un tratamiento de la mezcla de reacción que se utilizará para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) realizada de forma cuantitativa en tiempo real con Uracil-ADN-Glicosilasa procedente del Bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) de SEQ ID No 3 o con una variante de la misma; y
- b. Determinar la presencia o ausencia del microorganismo en la muestra biológica, tras tratamiento de la mezcla de reacción según el apartado a), a través de la determinación de la presencia o ausencia de amplicones procedentes de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) realizada de forma cuantitativa en tiempo real;

donde dicha reacción en cadena de la polimerasa (PCR) emplea ADN, ADN complementario (ADNc) ó ADN de hebra simple obtenido por retrotranscripción de ácido ribonucleico (ARN) de la muestra biológica, al menos un par de cebadores específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado, una ADN polimerasa termoestable y una sonda marcada fluorescentemente, donde dicha sonda marcada fluorescentemente consiste en un oligonucleótido con una longitud de 8 a 9 nucleótidos marcado con un fluoróforo, preferiblemente de 8 nucleótidos.

En una realización preferida de este primer aspecto de la invención, dicha reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplifica amplicones con una longitud entre 60 y 120 nucleótidos, más preferentemente amplicones que presenten una longitud entre 70 y 110 nucleótidos, más preferentemente amplicones que presenten una longitud entre 75 y 110 nucleótidos.

En el contexto de la presente invención, ejemplos ilustrativos del término “muestra Biológica” incluyen, pero no se limitan a, diferentes tipos de muestras de tejidos, así como de fluidos biológicos, tales como sangre, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal, muestras respiratorias (Lavado bronquioalveolar, Aspirado nasofaríngeo) y heces.

En el contexto de la presente invención, el término “microorganismo” representa cualquier ser vivo que solo puede visualizarse con el microscopio y que sea susceptible de determinarse su ausencia o presencia en una muestra biológica a través de la utilización de la técnica de la PCR cuantitativa o en tiempo real. En su mayoría son unicelulares, aunque en algunos casos se trate de organismos cenóticos compuestos por células multinucleadas, o incluso multicelulares.

En el contexto de la presente invención, el término “fluoróforo” son moléculas que tienen la propiedad de emitir fluorescencia. Al ser iluminadas por una radiación luminosa de una determinada longitud de onda, son excitadas y liberan energía a través de la emisión de luz de una longitud de onda mayor..

En el contexto de la presente invención, el término sujeto se refiere preferiblemente a un sujeto humano.

En el contexto de la presente invención, el término “Tratamiento de la mezcla de reacción” es la incubación de las Uracil-ADN-glicosilasas (UNGs) con el ADN total o el ADN complementario (ADNc) ó el ADN de hebra simple obtenido por retrotranscripción de ácido ribonucleico (ARN) de la muestra biológica y los reactivos que constituyen la reacción. En dicha incubación se produce la activación de dichas enzimas.

Es importante matizar que el procedimiento descrito en el primer aspecto de la presente invención no está especialmente limitado y su implementación será evidente para el experto en la materia. La selección del rango de tamaño de los amplicones se puede realizar siguiendo indicaciones del software Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net/>) utilizando los ajustes optimizados para una adecuada eficiencia de amplificación, presentando la temperatura de fusión de ambos cebadores ajustada a 59-61 ° C y la longitud del cebador fijada en 18-27 nucleótidos.

En una realización preferida de la invención, la sonda marcada fluorescentemente es una sonda Taqman.

En aún otra realización de la presente invención, el microorganismo es un patógeno. Preferentemente, dicho microorganismo infeccioso se selecciona de la lista que consiste en *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*, *Virus de la Varicela Zoster*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella holmensis*, el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, *Haemophilus influenzae* o *Streptococcus pneumoniae*.

Un segundo aspecto de la presente invención, se refiere a un procedimiento para diagnosticar una patología causada por un microorganismo en base a la presencia o ausencia de dicho microorganismo en una muestra biológica de un sujeto, que comprende:

- a. Toma de una muestra biológica de un sujeto;
- b. Preparar una mezcla de reacción que permita determinar la presencia o ausencia del microorganismo en la muestra biológica a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) realizada de forma cuantitativa en tiempo real;
- c. Llevar a cabo un tratamiento de la mezcla de reacción que se utilizará para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) realizada de forma cuantitativa en tiempo real con Uracil-ADN-Glicosilasa procedente del Bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) de SEQ ID No 3 o con una variante de la misma; y
- d. Determinar la presencia o ausencia del microorganismo en la muestra biológica, tras tratamiento de la mezcla de reacción según el apartado c), a través de la determinación de la presencia o ausencia de amplicones procedentes de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) realizada de forma cuantitativa en tiempo real;

donde dicha reacción en cadena de la polimerasa (PCR) emplea ADN, ADN complementario (ADNc) ó ADN de hebra simple obtenido por retrotranscripción de ácido ribonucleico (ARN), de la muestra Biológica, al menos un par de cebadores específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado, una ADN polimerasa termoestable y una sonda marcada fluorescentemente, donde dicha sonda marcada

fluorescentemente consiste en un oligonucleótido con una longitud de 8 a 9 nucleótidos marcado con un fluoróforo, preferiblemente 8 nucleótidos.

En una realización preferida de este segundo aspecto de la invención, dicha reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplifica amplicones con una longitud entre 60 y 120 nucleótidos, más preferentemente amplicones que presenten una longitud entre 70 y 110 nucleótidos, más preferentemente amplicones que presenten una longitud entre 75 y 110 nucleótidos.

La presencia o ausencia del microorganismo en la muestra biológica facultará a la persona encargada de realizar el diagnóstico de la enfermedad con la posibilidad de realizar dicho diagnóstico.

En una realización preferida de este segundo aspecto de la invención, la sonda marcada fluorescentemente es una sonda Taqman.

En otra realización de este segundo aspecto, el sujeto es un humano.

En aún otra realización de este segundo aspecto, el microorganismo es aquel tanto responsable de patología infecciosa (patógeno), como saprofita (forma parte de la flora normal. Preferentemente, dicho microorganismo infeccioso se selecciona de la lista que consiste en *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*, *Virus de la Varicela Zoster*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella holmensis*, el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, *Haemophilus influenzae* o *Streptococcus pneumoniae*.

Un tercer aspecto de la presente invención, se refiere a un kit adecuado para la determinación de la presencia o ausencia de un microorganismo de acuerdo con cualquiera de los aspectos precedentes, que comprende al menos los siguientes elementos:

- a. La Uracil-ADN-Glicosilasa procedente del Bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) de SEQ ID No 3 o una variante de la misma; y
- b. Sonda/s marcada/s fluorescentemente con una longitud de 8 a 9 nucleótidos, preferiblemente de 8 nucleótidos.

En una realización preferida del tercer aspecto de la invención, el microorganismo a identificar y la sonda se seleccionan de cualquiera de la siguiente lista:

- a. *Bordetella pertussis* y la sonda marcada con un fluoróforo de SEQ ID No 4. La SEQ ID No 4 se corresponde con la siguiente secuencia CGGGGTTC;
- b. *Bordetella holmensis* y la sonda marcada con un fluoróforo de SEQ ID No 5. La SEQ ID No 5 se corresponde con la siguiente secuencia GGCCCTGG
- c. Complejo *Mycobacterium tuberculosis* y la sonda marcada con un fluoróforo de SEQ ID No 6. La SEQ ID No 6 se corresponde con la siguiente secuencia GACGGCGA
- d. *Streptococcus pneumoniae* y la sonda marcada con un fluoróforo de ID No 7. La SEQ ID No 7 se corresponde con la siguiente secuencia CTGGGACT

- e. *Neisseria meningitidis* y la sonda marcada con un fluoróforo de ID No 8. La SEQ ID No 8 se corresponde con la siguiente secuencia CTGTGAGC
- f. *Listeria monocytogenes* y la sonda marcada con un fluoróforo de ID No 9. La SEQ ID No 9 se corresponde con la siguiente secuencia ACCACCAG; o
- 5 g. *Streptococcus agalactiae* y la sonda marcada con un fluoróforo de ID No 10. La SEQ ID No 10 se corresponde con la siguiente secuencia TGGCAACA

Un cuarto aspecto de la invención, se refiere a un kit adecuado para el diagnóstico de la tosferina, que comprende al menos los siguientes elementos:

- 10 a. La Uracil-ADN-Glicosilasa procedente del Bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) de SEQ ID No 3 o una variante de la misma; y
- b. Las sondas marcadas con un fluoróforo de SEQ ID No 4 y SEQ ID No 5.

Un quinto aspecto de la presente invención, se refiere a un kit adecuado para el diagnóstico de la meningitis bacteriana, que comprende al menos los siguientes elementos:

- 15 a. La Uracil-ADN-Glicosilasa procedente del Bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) de SEQ ID No 3 o una variante de la misma; y
- b. Las sondas marcadas con un fluoróforo de SEQ ID No 8, SEQ ID No 9, SEQ ID No 7 y SEQ ID No 10.

En una realización preferida del tercer, cuarto y quinto aspecto de la invención, el kit además comprende al menos uno de los siguientes elementos: un par de cebadores específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado y/o una ADN polimerasa termoestable.

En otra realización preferida del tercer, cuarto y quinto aspecto de la invención, el kit además comprende un control positivo, preferiblemente B-globina.

El uso del kit no está particularmente limitado, aunque se prefiere el uso en el procedimiento de la invención en cualquiera de sus realizaciones.

25 Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente invención; no se pretende de ninguna forma que estos ejemplos limiten el alcance de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Análisis clínico de 20 muestras humanas de distinto origen, para analizar la presencia o ausencia del microorganismo *Bordetella pertussis* utilizando la técnica de PCR en tiempo real utilizando sondas marcadas fluorescentemente constituidas por oligonucleótidos de un tamaño entre 8 y 9 nucleótidos.

Para llevar a cabo este ejemplo diseñamos una sonda corta marcada con fluorocromo cuya secuencia nucleotídica fue (6FAM-GGCAGCAG-BBQ) y cebadores (Directo 5'-GACCATCTGACCGGACGTT-3' y Reverso 5'-GCTGGTGGAGACGAAAGC-3') para la amplificación y detección de un amplicon de 63 nucleótidos del gen *ptxA* del microorganismo *Bordetella pertussis* en muestras respiratorias. (Njamkepo E, Bonacorsi S, Debruyne M, Gibaud SA, Guillot S, Guiso N. Significant finding of *Bordetella holmesii* DNA in nasopharyngeal samples from French patients with suspected pertussis. J Clin Microbiol. 2011 Dec;49(12):4347-8. Epub 2011 Oct 19). Como control de extracción de DNA y amplificación utilizamos el gen *B-globina*. (Fenollar F, Raoult D. Molecular techniques in Whipple's disease. Expert Rev Mol Diagn 2001; 1:299-309). Como control negativo, el agua estéril utilizada en la mezcla de la PCR a tiempo real.

La PCR a tiempo real fué llevada a cabo a partir del LightCycler480 Probes Master kit (Roche). La mezcla que constituye la reacción de PCR (20 µl de volumen total por reacción) está constituida por los siguientes componentes (Volumen/concentraciones): Master Probe x2 (5 µl/ Fast Start Polymerase, reaction Buffer, dNTPs y 6.4 mM MgCl₂), cebador directo (0,75 µl del stock inicial a 20 µM), cebador reverso (0,75 µl del stock inicial a 20 µM), sonda corta (0,5 µl de un stock inicial de 10 µmol/L), DNA de la muestra (5 µl) y agua estéril (3 µl). Realizamos PCR a tiempo real sin tratamiento previo con UNGs. El protocolo de PCR a tiempo real se realizó en un aparato de LightCycler480 II y estuvo constituido por los siguientes pasos: 1) Activación de la enzima Fast Start (95° durante 10 min). 2) Amplificación del fragmento (95° durante 10 segundos, 60° durante 20 segundos, 72° durante 1 segundo) y 3) Enfriamiento (40° durante 10min). Los resultados (Cp) fueron analizados a partir del software del LightCycler480 II teniendo en cuenta una eficiencia de amplificación de 2 (en inglés "Second Derivative Maximum method").

Ejemplo 2: Descontaminación de muestras clínicas utilizando distintas UNGs. (amplicones de 127 nucleótidos)

Diseñamos sonda corta (6FAM-TCCAGCAG-BBQ) y cebadores (Directo 5'-CATCAAGGGAATGGAGTTGG-3' y Reverso 5'-TAGCGGGTCTGCTTCTC-3') para la amplificación y detección de un amplicon de 127 nucleótidos del gen *devR* del microorganismo *Mycobacterium tuberculosis* en muestras respiratorias (Dasgupta N, Kapur V, Singh KK, Das TK, Sachdeva S, Jyothisri K, Tyagi JS.Characterization of a two-component system, devR-devS, of *Mycobacterium tuberculosis*. Tuber Lung Dis. 2000;80(3):141-59) .Tras llevar a cabo la PCR a tiempo real siguiendo el protocolo comentado en el ejemplo 1, el producto de PCR obtenido (amplicones) fue utilizado para contaminar muestras en una dilución 1/10.000. A partir de estas muestras contaminadas se volvió a realizar PCR a tiempo real siguiendo el siguiente protocolo: 1) **Activación de UNGs: 50° durante 10 min** 2) Activación de la enzima Fast Start (95° durante 10 min). 3)

Amplificación del fragmento (95° durante 10 segundos, 60° durante 20 segundos, 72° durante 1 segundo) y 4) Enfriamiento (40° 10 min). Sorprendentemente, se obtuvieron excelentes resultados con la Uracil-ADN-Glicosilasa procedente del Bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*). utilizando un programa a 50° 10 min en el Lightcycler480 II. Los resultados (Cp) fueron analizados a partir del software del LightCycler480 II teniendo en cuenta una eficiencia de amplificación de 2 (en inglés "Second Derivative Maximum method").

Ejemplo 3: Descontaminación de muestras clínicas utilizando distintas UNGs. (amplicones 60 a 110 nucleótidos)

Diseñamos sondas cortas y cebadores para la detección de *N.meningitidis*, *S.agalactiae*, *L.monocytogenes*, *Virus de la Varicela Zoster* y *Bordetella pertussis* (ver Tabla VII abajo).

Tras llevar a cabo la PCR a tiempo real siguiendo el protocolo comentado en el ejemplo 1, el producto de PCR obtenido (amplicones de 65nt, 67nt, 76 nt, 85 nt y 106 nt) fueron utilizados para contaminar muestras en una dilución 1/10.000. A partir de estas muestras contaminadas se volvió a realizar PCR a tiempo real siguiendo el siguiente protocolo del ejemplo 2 (protocolo de PCR a tiempo real añadiendo una incubación de 50° durante 10 min con las diferentes UNGs). Los resultados fueron analizados con el software del Lightcycler 480 II, como en los ejemplos 1 y 2.

Tabla VII

Tamaño del amplicon	Patógeno (gen)	Cebadores(5'-3')	Sonda corta
65 nt	<i>N.meningitidis(sod)</i>	D-GTAAATTGACAGCTGGTTTAGGC R-ACCATGTTGTTTTGCACCTTT	CACTGGGA
67 nt	<i>S.agalactiae(sip)</i>	D-TGCATCACCAGAGCATGTATC R-CTGTCTGTAGCTGTTGAAGTCGT	TCCAGCAG
76 nt	<i>Listeria monocytogenes(hly)</i>	D-TCTGCATTCAATAAAGAAAATTCAA R-TTGGCGTCTTAGGACTTGC	ACCACCAG
85 nt	<i>VVZ(glycoprotein G)</i>	D-TGTTAATGAAATGTTGGCACGTA R-TGGAAATAGTCCGCTCCAAA	TCCTCGTC
106 nt	<i>Bordetella pertussis(ptxA)</i>	D-GGTCCATATACGGTCTCTATGACG R-CAGAAAGTTTCGCGATAAATGA	CGGGGTTC

Un experto en la materia apreciará fácilmente que la presente invención está bien adaptada para llevar a cabo los objetivos y obtener los fines y ventajas mencionados, así como los inherentes a la misma. Los ejemplos proporcionados en el presente documento son representativos de realizaciones preferidas, son
5 ilustrativos, y no se pretende que sean limitaciones del alcance de la invención.

Será fácilmente evidente para un experto en la materia que se pueden hacer diferentes sustituciones y modificaciones de la invención descrita en el presente documento sin salirse del alcance y espíritu de la invención.

Todas las publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva son representativas de los
10 niveles de los expertos en la materia a la que pertenece la invención.

La invención descrita de forma ilustrativa en el presente documento se puede llevar a la práctica de forma adecuada en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones que no se describen específicamente en el presente documento. Por lo tanto, por ejemplo, en cada caso en el presente documento, cualquiera de los términos “comprende”, “consiste esencialmente en” y “consiste
15 en” se puede sustituir por cualquiera de los otros dos términos. Los términos y expresiones que se han usado se usan como términos de descripción y no de limitación, y no se pretende que el uso de dichos términos y expresiones excluya cualquiera de los equivalentes de las características mostradas y descritas o partes de las mismas, pero se reconoce que son posibles diferentes modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada. Por lo tanto, debe entenderse que aunque la presente invención se
20 ha descrito específicamente por las realizaciones preferidas y características opcionales, los expertos en la materia pueden recurrir a la modificación y variación de los conceptos descritos en el presente documento, y dichas modificaciones y variaciones están dentro del alcance de esta invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la determinación de la presencia o ausencia de un microorganismo en una muestra biológica de un sujeto a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) realizada de forma cuantitativa en tiempo real , que comprende:

- 5 a. Llevar a cabo un tratamiento de la mezcla de reacción que se utilizará para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) realizada de forma cuantitativa en tiempo real con la Uracil-ADN-Glicosilasa procedente del Bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) de SEQ ID No 3; y
- 10 b. Determinar la presencia o ausencia del microorganismo en la muestra biológica, tras el tratamiento de la mezcla de reacción según el apartado a), a través de la determinación de la presencia o ausencia de amplicones procedentes de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) realizada de forma cuantitativa en tiempo real;

donde dicha reacción en cadena de la polimerasa (PCR) emplea ADN, ADN complementario (ADNc) ó ADN de hebra simple obtenido por retrotranscripción de ácido ribonucleico (ARN), de la muestra biológica, al menos un par de cebadores específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado, una ADN polimerasa termoestable y una sonda marcada fluorescentemente, donde dicha sonda marcada fluorescentemente consiste en un oligonucleótido con una longitud de 8 a 9 nucleótidos marcado con un fluoróforo.

- 20 2. El procedimiento de la reivindicación 1, donde la sonda marcada fluorescentemente consiste en un oligonucleótido con una longitud de 8 nucleótidos.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, donde dicha reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplifica amplicones con una longitud entre 60 y 120 nucleótidos.
4. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, donde dicha reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplifica amplicones con una longitud entre 70 y 110 nucleótidos.
- 25 5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la sonda marcada fluorescentemente es una sonda Taqman.
6. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el sujeto es un humano.
7. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el microorganismo es un patógeno.
- 30 8. El procedimiento según la reivindicación 7, donde el patógeno se selecciona de la lista que consiste en *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*, *Virus de la Varicela Zoster*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella holmensis*, el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, *Haemophilus influenzae* o *Streptococcus pneumoniae*.

9. Procedimiento para diagnosticar una patología causada por un microorganismo en base a la presencia o ausencia de dicho microorganismo en una muestra biológica de un sujeto, que comprende:

a. Toma de muestra biológica de un sujeto;

b. Preparar una mezcla de reacción que permita determinar la presencia o ausencia del microorganismo en la muestra biológica a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) realizada de forma cuantitativa en tiempo real;

c. Llevar a cabo un tratamiento de la mezcla de reacción que se utilizará para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) realizada de forma cuantitativa en tiempo real con la Uracil-ADN-Glicosilasa procedente del Bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) de SEQ ID No 3; y

d. Determinar la presencia o ausencia del microorganismo en la muestra biológica, tras tratamiento de la mezcla de reacción según el apartado c), a través de la determinación de la presencia o ausencia de amplicones procedentes de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) realizada de forma cuantitativa en tiempo real;

donde dicha reacción en cadena de la polimerasa (PCR) emplea ADN, ADN complementario (ADNc) ó ADN de hebra simple obtenido por retrotranscripción de ácido ribonucleico (ARN), de la muestra biológica, al menos un par de cebadores específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado, una ADN polimerasa termoestable y una sonda marcada fluorescentemente, donde dicha sonda marcada fluorescentemente consiste en un oligonucleótido con una longitud de 8 a 9 nucleótidos marcado con un fluoróforo.

10. El procedimiento de la reivindicación 9, donde la sonda marcada fluorescentemente consiste en un oligonucleótido con una longitud de 8 nucleótidos.

11. El procedimiento de la reivindicación 9 ó 10, donde dicha reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplifica amplicones con una longitud entre 60 y 120 nucleótidos.

12. El procedimiento de la reivindicación 9 ó 10, donde dicha reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplifica amplicones con una longitud entre 70 y 110 nucleótidos.

13. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, donde la sonda marcada fluorescentemente es una sonda Taqman.

14. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, donde el sujeto es un humano.

15. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, donde el microorganismo es un patógeno.

16. El procedimiento según la reivindicación 15, donde el patógeno se selecciona de la lista que consiste en *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*, *Virus de la*

Varicela Zoster, Bordetella pertussis, Bordetella holmensis, el complejo Mycobacterium tuberculosis, Haemophilus influenzae o Streptococcus pneumoniae.

- 5 17. Un kit útil para la determinación de la de la presencia o ausencia de un microorganismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende al menos los siguientes elementos:
 - a. La Uracil-ADN-Glicosilasa procedente del Bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) de SEQ ID No 3; y
 - b. Sonda marcada fluorescentemente con una longitud de 8 a 9 nucleótidos.
- 10 18. El kit según la reivindicación 17, que además comprende al menos uno de los siguientes elementos: un par de cebadores específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado, una ADN polimerasa termoestable.
- 15 19. El kit según cualquiera de las reivindicaciones 17 ó 18, donde el microorganismo a identificar y la sonda se seleccionan de una cualquiera de las opciones de la siguiente lista:
 - a. *Bordetella pertussis* y la sonda marcada con un fluoróforo de SEQ ID No 4;
 - b. *Bordetella holmensis* y la sonda marcada con un fluoróforo de SEQ ID No 5;
 - c. Complejo *Mycobacterium tuberculosis* y la sonda marcada con un fluoróforo de SEQ ID No 6;
 - d. *Streptococcus pneumoniae* y la sonda marcada con un fluoróforo de ID No 7;
 - e. *Neisseria meningitidis* y la sonda marcada con un fluoróforo de ID No 8;
 - 20 f. *Listeria monocytogenes* y la sonda marcada con un fluoróforo de ID No 9;o
 - g. *Streptococcus agalactiae* y la sonda marcada con un fluoróforo de ID No 10.
- 25 20. Un kit adecuado para el diagnóstico de la tosferina, que comprende al menos los siguientes elementos:
 - a. La Uracil-ADN-Glicosilasa procedente del Bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) de SEQ ID No 3; y
 - b. Las sondas marcadas *con un fluoróforo de* SEQ ID No 4 y SEQ ID No 5.
- 30 21. Un kit adecuado para el diagnóstico de la meningitis bacteriana, que comprende al menos los siguientes elementos:
 - a. La Uracil-ADN-Glicosilasa procedente del Bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*); y
 - b. Las sondas marcadas con un fluoróforo de SEQ ID No 8, SEQ ID No 9, SEQ ID No 7 y SEQ ID No 10.

22. El kit según cualquiera de las reivindicaciones 20 ó 21, que además comprende al menos uno de los siguientes elementos: un par de cebadores específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado, una ADN polimerasa termoestable.
23. El kit según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22, que además comprende un control positivo, preferiblemente B-globina.

5

10

15

20

25

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Fundación do Complexo Hospitalario Universitario A Coruña
Servizo Galego de Saúde- Consellería de Sanidade, Xunta de Galicia
- <120> Procedimiento para el diagnóstico clínico de una enfermedad infecciosa basada en el empleo de la PCR cuantitativa, oligonucleótidos marcados de 8 a 9 nucleótidos de longitud y la UNG del Bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*).
- <130> 156181
- <160> 3
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 192
<212> PRT
<213> *Thermotoga maritima*
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(192)
<223> Uracil-ADN- Glicosilasa procedente de *Thermotoga maritima* MSB8.
- <400> 1

Met Tyr Thr Arg Glu Glu Leu Met Glu Ile Val Ser Glu Arg Val Lys
1 5 10 15

Lys Cys Thr Ala Cys Pro Leu His Leu Asn Arg Thr Asn Val Val Val
20 25 30

Gly Glu Gly Asn Leu Asp Thr Arg Ile Val Phe Val Gly Glu Gly Pro
35 40 45

Gly Glu Glu Glu Asp Lys Thr Gly Arg Pro Phe Val Gly Arg Ala Gly
50 55 60

Met Leu Leu Thr Glu Leu Leu Arg Glu Ser Gly Ile Arg Arg Glu Asp
65 70 75 80

Val Tyr Ile Cys Asn Val Val Lys Cys Arg Pro Pro Asn Asn Arg Thr
85 90 95

Pro Thr Pro Glu Gln Ala Ala Cys Gly His Phe Leu Leu Ala Gln
100 105 110

Ile Glu Ile Ile Asn Pro Asp Val Ile Val Ala Leu Gly Ala Thr Ala
115 120 125

Leu Ser Phe Phe Val Asp Gly Lys Lys Val Ser Ile Thr Lys Val Arg
130 135 140

Gly Asn Pro Ile Asp Trp Leu Gly Gly Lys Lys Val Ile Pro Thr Phe
145 150 155 160

ES 2 449 665 B2

His Pro Ser Tyr Leu Leu Arg Asn Arg Ser Asn Glu Leu Arg Arg Ile
165 170 175

Val Leu Glu Asp Ile Glu Lys Ala Lys Ser Phe Ile Lys Lys Glu Gly
180 185 190

<210> 2
<211> 229
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(229)
<223> Uracil-ADN- Glicosilasa procedente de la cepa K12 de la bacteria E.coli

<400> 2

Met Ala Asn Glu Leu Thr Trp His Asp Val Leu Ala Glu Glu Lys Gln
1 5 10 15

Gln Pro Tyr Phe Leu Asn Thr Leu Gln Thr Val Ala Ser Glu Arg Gln
20 25 30

Ser Gly Val Thr Ile Tyr Pro Pro Gln Lys Asp Val Phe Asn Ala Phe
35 40 45

Arg Phe Thr Glu Leu Gly Asp Val Lys Val Val Ile Leu Gly Gln Asp
50 55 60

Pro Tyr His Gly Pro Gly Gln Ala His Gly Leu Ala Phe Ser Val Arg
65 70 75 80

Pro Gly Ile Ala Ile Pro Pro Ser Leu Leu Asn Met Tyr Lys Glu Leu
85 90 95

Glu Asn Thr Ile Pro Gly Phe Thr Arg Pro Asn His Gly Tyr Leu Glu
100 105 110

Ser Trp Ala Arg Gln Gly Val Leu Leu Leu Asn Thr Val Leu Thr Val
115 120 125

Arg Ala Gly Gln Ala His Ser His Ala Ser Leu Gly Trp Glu Thr Phe
130 135 140

Thr Asp Lys Val Ile Ser Leu Ile Asn Gln His Arg Glu Gly Val Val
145 150 155 160

Phe Leu Leu Trp Gly Ser His Ala Gln Lys Lys Gly Ala Ile Ile Asp
165 170 175

ES 2 449 665 B2

Lys Gln Arg His His Val Leu Lys Ala Pro His Pro Ser Pro Leu Ser
180 185 190

Ala His Arg Gly Phe Phe Gly Cys Asn His Phe Val Leu Ala Asn Gln
195 200 205

Trp Leu Glu Gln Arg Gly Glu Thr Pro Ile Asp Trp Met Pro Val Leu
210 215 220

Pro Ala Glu Ser Glu
225

<210> 3
<211> 223
<212> PRT
<213> Gadus morhua

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(223)
<223> Uracil-ADN-Glicosilasa procedente del Bacalao del Atlántico
(Gadus morhua),

<400> 3

Met Glu Phe Phe Gly Glu Ser Trp Lys Lys His Leu Ser Gly Glu Phe
1 5 10 15

Gly Lys Pro Tyr Phe Ile Lys Leu Met Gly Phe Val Ala Glu Glu Arg
20 25 30

Lys His Tyr Thr Val Tyr Pro Pro Pro His Gln Val Phe Thr Trp Thr
35 40 45

Gln Met Cys Asp Ile Lys Asp Val Lys Val Val Ile Leu Gly Gln Asp
50 55 60

Pro Tyr His Gly Pro Asn Gln Ala His Gly Leu Cys Phe Ser Val Gln
65 70 75 80

Arg Pro Val Pro Pro Pro Pro Ser Leu Val Asn Ile Tyr Lys Glu Leu
85 90 95

Ser Thr Asp Ile Glu Asp Phe Val His Pro Gly His Gly Asp Leu Ser
100 105 110

Gly Trp Ala Lys Gln Gly Val Leu Leu Leu Asn Ala Val Leu Thr Val
115 120 125

Arg Ala His Gln Ala Asn Ser His Lys Glu Arg Gly Trp Glu Gln Phe
130 135 140

Thr Asp Ala Val Val Ser Trp Leu Asn Gln Asn Ser Asn Gly Leu Val
145 150 155 160

ES 2 449 665 B2

Phe Leu Leu Trp Gly Ser Tyr Ala Gln Lys Lys Gly Ser Ala Ile Asp
165 170 175

Arg Lys Arg His His Val Leu Gln Thr Ala His Pro Ser Pro Leu Ser
180 185 190

Val Tyr Arg Gly Phe Phe Gly Cys Arg His Phe Ser Lys Thr Asn Glu
195 200 205

Leu Leu Gln Lys Ser Gly Lys Lys Pro Ile Asp Trp Lys Glu Leu
210 215 220



- ②① N.º solicitud: 201231456
②② Fecha de presentación de la solicitud: 19.09.2012
②③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)
C12N9/24 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	EP 2138590 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH) 30.12.2009, reivindicaciones 1-15.	1-18,23
Y	LONGO, M.C. et al., 'Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions.', GENE, 1990, Vol. 93, No. 1, Páginas 125-128, ISSN: 0378-1119 (print), todo el documento, en particular, 'Experimental and Discussion'.	1-18,23
Y	LANES, O. et al., 'Purification and characterization of a cold-adapted uracil-DNA glycosylase from Atlantic cod (Gadus morhua).', COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY. PART B, BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY, 2000, Vol. 127, No. 3, Páginas 399-410, ISSN: 1096-4959, Resultados, Discusión.	1-18,23
A	PRUVOST, M. et al., 'Minimizing DNA contamination by using UNG-coupled quantitative real-time PCR on degraded DNA samples: application to ancient DNA studies.', BIOTECHNIQUES, 2005, Vol. 38, No. 4, Páginas 569-575. ISSN: 0736-6205 (Print), todo el documento.	1-23
A	PENNINGS, J.L. et al., 'Degradable dU-based DNA template as a standard in real-time PCR quantitation.', LEUKEMIA, 2001, Vol.15, No. 12, Páginas 1962-1965. ISSN: 0887-6924 (Print), todo el documento.	1-23
A	KLEIBOEKER, S.B., 'Quantitative assessment of the effect of uracil-DNA glycosylase on amplicon DNA degradation and RNA amplification in reverse transcription-PCR.', VIROLOGY JOURNAL, 2005, Vol. 2, No. 29, Páginas 1-8, ISSN: 1743-422X (print), ISSN: 1743-422X (electronic), todo el documento.	1-23
A	WO 2006009870 A2 (EPIGENOMICS AG) 26.01.2006, todo el documento.	1-23

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
06.03.2014

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 06.03.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-23	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 19-22	SI
	Reivindicaciones 1-18, 23	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	EP 2138590 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH)	30.12.2009
D02	LONGO, M.C. et al., 'Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions.', GENE, 1990, Vol. 93, No. 1, Páginas 125-128, ISSN: 0378-1119 (print), todo el documento, en particular, 'Experimental and Discussion'.	
D03	LANES, O. et al., 'Purification and characterization of a cold-adapted uracil-DNA glycosylase from Atlantic cod (Gadus morhua).', COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY. PART B, BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY, 2000, Vol. 127, No. 3, Páginas 399-410, ISSN: 1096-4959, Resultados, Discusión.	
D04	PRUVOST, M. et al., 'Minimizing DNA contamination by using UNG-coupled quantitative real-time PCR on degraded DNA samples: application to ancient DNA studies.', BIOTECHNIQUES, 2005, Vol. 38, No. 4, Páginas 569-575. ISSN: 0736-6205 (Print), todo el documento.	
D05	PENNINGS, J.L. et al., 'Degradable dU-based DNA template as a standard in real-time PCR quantitation.', LEUKEMIA, 2001, Vol.15, No. 12, Páginas 1962-1965. ISSN: 0887-6924 (Print), todo el documento.	
D06	KLEIBOEKER, S.B., 'Quantitative assessment of the effect of uracil-DNA glycosylase on amplicon DNA degradation and RNA amplification in reverse transcription-PCR.', VIROLOGY JOURNAL, 2005, Vol. 2, No. 29, Páginas 1-8, ISSN: 1743-422X (print), ISSN: 1743-422X (electronic), todo el documento.	
D07	WO 2006009870 A2 (EPIGENOMICS AG)	26.01.2006

En D01, D02, D04-D07 se analizan métodos para prevenir y/o minimizar la presencia de amplicones contaminantes en reacciones PCR de amplificación de ADN.

En D03 se caracteriza la enzima uracil-ADN glicosilasa (UNG) de bacalao (Gadus morhua).

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes).

1.1 Reivindicaciones independientes 1, 9 y 17.

1.1.1. El objeto de las reivindicaciones 1 y 9 consiste respectivamente en un procedimiento para determinar la presencia o ausencia de un microorganismo en una muestra biológica y en uno para diagnosticar una patología causada por un microorganismo mediante una reacción PCR en tiempo real. Los procedimientos de la reivindicaciones 1 y 9 se caracteriza básicamente por un tratamiento previo de la mezcla de reacción PCR con la enzima uracil-ADN glicosilasa (UNG) de bacalao (Gadus morhua). El objeto de la reivindicación 17 es un kit relacionado con los procedimientos indicados que se caracteriza porque comprende UNG de bacalao (Gadus morhua) y una sonda fluorescente de 8-9 nucleótidos.

En el estado de la técnica más próximo, constituido por los documentos D01-D07, no se ha divulgado ningún procedimiento ni kit que comparta la característica básica de los reivindicados en la solicitud de patente, es decir, el uso y la aplicación de UNG de bacalao (Gadus morhua). Por consiguiente, el objeto de protección de las reivindicaciones 1, 9 y 17 se considera nuevo sobre la base del documento D01-D07.

1.2. La presente invención satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 1-23, es nuevo de acuerdo con el Art. 6.1. de la Ley de Patentes.

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

2.1. Reivindicaciones independientes 1, 9 y 17.

2.1.1. Los documentos D01-D03 constituyen el estado de la técnica más próximo. En D01-D02 se describen procedimientos para controlar la denominada □carry-over contamination□ en reacciones de amplificación PCR a través de la eliminación de amplicones contaminantes no deseados mediante la incubación de la mezcla de reacción con la actividad uracil-ADN glicosilasa (cf. D01: Reivindicaciones 1-15. D02: 'Experimental and Discussion'). En D03 se divulga la purificación y caracterización de UNG de bacalao (Gadus morhua) (cf. D03: Resultados, Discusión).

2.1.2. El problema técnico a resolver por el objeto de las reivindicaciones 1, 9 y 17 puede ser considerado, por consiguiente, como la provisión de nuevos métodos para determinar la presencia o ausencia de un microorganismo en una muestra biológica y para diagnosticar una patología causada por un microorganismo mediante una reacción PCR en tiempo real, y un nuevo kit relacionado con dichos procedimientos.

2.1.3. Las soluciones propuestas son los métodos de las reivindicaciones 1 y 9 que se caracterizan básicamente por el tratamiento previo de la mezcla de reacción PCR con UNG de bacalao (*Gadus morhua*) y una sonda marcada fluorescentemente de 8-9 nucleótidos, y el kit de la reivindicación 17 caracterizado porque comprende a la enzima y a la sonda referidas. Según la descripción, la eficiencia de la amplificación es menor cuanto mayor sea el tamaño del amplicon. Por lo tanto, se recomienda la amplificación de transcritos con un tamaño de entre 50 y 150 nucleótidos, y más concretamente, de entre 70 y 110 nucleótidos cuando se emplean sondas cortas (8-9 nucleótidos). Sin embargo, el uso de amplicones y sondas de ese tamaño tiene la limitación de los falsos positivos como consecuencia de la contaminación resultante de las amplificaciones realizadas previamente ("carry-over contamination"). Con el fin de incrementar la fiabilidad de los métodos de detección reivindicados se ha llevado a cabo una descontaminación previa de los posibles amplicones no deseados presentes en la muestra mediante la utilización de UNG, en particular, UNG de bacalao frente a UNG de *E.coli* utilizada en D01-D02. Como en la solicitud no se explicita ningún efecto sorprendente e inesperado derivado del uso de UNG de bacalao, caracterizada en D03, frente a UNG utilizada D01-D02 con relación al objetivo de eliminar amplicones contaminantes no deseados, se considera que la solución propuesta en la solicitud es una alternativa no inventiva frente a las del estado de la técnica. Análogamente, el kit caracterizado porque comprende UNG de bacalao se considera una alternativa obvia para un experto en la materia sobre base de los documentos D1-D3. Por todo ello, se estima que las reivindicaciones 1, 9 y 17 y las reivindicaciones dependientes 2-8, 10-16, 18 y 23 no son inventivas.

2.2. La presente invención no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 1-18, 23 no implica actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1. de la Ley de Patentes.