

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 048**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03812592 .8**

96 Fecha de presentación: **08.12.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1567676**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.08.2005**

54 Título: **DETECCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE TAXONES EUBACTERIANOS EMPLEANDO UN ENSAYO DE HIBRIDACIÓN.**

30 Prioridad:  
**06.12.2002 EP 02447248**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.01.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.01.2012**

73 Titular/es:  
**Innogenetics N.V.  
Technologiepark 6  
9052 Gent, BE y  
Roche Diagnostics GmbH**

72 Inventor/es:  
**DE HENAU, Hilde;  
VAN CROMBRUGGEN, Joachim;  
JANNES, Geert;  
HABERHAUSEN, Gerd y  
EMRICH, Thomas**

74 Agente: **Lehmann Novo, Isabel**

ES 2 372 048 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Detección, identificación y diferenciación de taxones eubacterianos empleando un ensayo de hibridación

### 5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un método para la detección y/o identificación específicas de especies de *Enterococcus*, en particular de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*, empleando secuencias nuevas de ácidos nucleicos procedentes de la región ITS (espaciadores de transcripción interna).

10 La presente descripción también se refiere a dichas secuencias nuevas de ácidos nucleicos procedentes de la región ITS, entre los ácidos ribonucleicos ribosomales (ARNr) 16S y 23S o entre los genes de ARNr 16S y 23S, para su uso en la detección y/o identificación específicas de especies de *Enterococcus*, en particular de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*, en una muestra biológica.

15 También se refiere a los cebadores de ácidos nucleicos que se emplean para la amplificación de dicha región de espaciadores de las especies de *Enterococcus* en una muestra.

### 20 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Actualmente, el género *Enterococcus* incluye 27 especies descritas. Desde el punto de vista clínico humano, las especies más importantes son *E. faecalis* y/o *E. faecium*: de forma conjunta, *E. faecalis* y *E. faecium* representan hasta un 95% de todas las infecciones nosocomiales causadas por enterococos, que se distribuye como un 80-90% y un 5-10%, respectivamente. De forma ocasional, se aíslan *E. casseliflavus* y *E. gallinarum*.

25 Cada vez más, se reconoce que los enterococos son causas comunes de infección que resultan difíciles de tratar, debido a su resistencia a los antibióticos tanto inherente como adquirida.

El control eficaz de *E. faecalis* y/o *E. faecium* en los hospitales y comunidades requiere medidas más agresivas que incluyan un diagnóstico más temprano de los pacientes colonizados, dicho de otra manera, que incluyan un paso de detección sistemática.

35 Además, varias de las especies descritas recientemente no se corresponden con las características fenotípicas empleadas hasta la fecha para su identificación. Por consiguiente, resulta necesario y urgente obtener métodos más rápidos de detección y/o identificación, empleando sondas y/o cebadores más sensibles y más específicos.

### COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

Un objeto de la presente invención es proporcionar secuencias nuevas de ácidos nucleicos procedentes de una región particular de ITS de las especies de *Enterococcus*, que se puedan emplear para la detección y/o identificación de las especies de *Enterococcus*, en particular de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*.

45 Por lo tanto, la presente descripción proporciona una molécula aislada de ácido nucleico que consiste en SEQ ID NO 1 ó 2, la forma de ARN de dicha SEQ ID NO 1 ó 2, donde T se reemplaza por U, la forma complementaria de dicha SEQ ID NO 1 ó 2 o cualquier homóloga, y el uso de dicha molécula de ácido nucleico como una diana para la detección y/o identificación de especies de *Enterococcus*.

50 Un aspecto de la presente invención se refiere a polinucleótidos nuevos para su uso como sondas, que tienen como diana una región particular de la región de espaciadores de ARNr 16S-23S de las especies de *Enterococcus*, y que permiten la detección y/o identificación de especies de *Enterococcus*, en particular de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*.

55 Por lo tanto, la presente descripción proporciona una molécula aislada de ácido nucleico que se hibrida específicamente con SEQ ID NO 1 ó 2, o con la forma de ARN de dicha SEQ ID NO 1 ó 2, donde T se reemplaza por U, o con la forma complementaria de dicha SEQ ID NO 1 ó 2, o con cualquiera de sus secuencias homólogas, o con un fragmento de al menos 20 nucleótidos contiguos de esta, para la detección y/o identificación de especies de *Enterococcus*, en particular de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*.

60 Otro aspecto de la presente invención se refiere a conjuntos de sondas para la detección y/o identificación de especies de *Enterococcus*, en particular de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*, en una muestra.

Otro aspecto de la presente descripción se refiere a cebadores que permiten una amplificación específica de la región de espaciadores de ARNr 16S-23S de las especies de *Enterococcus*, en particular de *Enterococcus faecalis*

y/o *Enterococcus faecium*.

Otro objeto de la presente invención consiste en una composición que contiene cualquiera de los nuevos conjuntos de sondas de la invención.

5 Otro objeto de la presente invención consiste en un kit, en el cual se emplean dichas sondas, para la detección y/o identificación de especies de *Enterococcus*, en particular de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*.

10 Otro objeto de la presente invención consiste en un método de hibridación rápido y fiable para la detección y/o identificación de especies de *Enterococcus*, en particular de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*.

Otro objeto de la presente invención consiste en un método de hibridación basado en PCR a tiempo real para la detección y/o identificación de especies de *Enterococcus*, en particular de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*.

15 **LEYENDAS DE LAS TABLAS**

Tabla 1: lista de las SEQ ID

Tabla 2: pares cebadores

20 Tabla 3: conjunto de sondas

Tabla 4: Especie de *Enterococcus*

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

25 Las siguientes definiciones sirven para ilustrar los términos y las expresiones que se emplean en las diferentes realizaciones de la presente invención, según se expone a continuación.

Los términos “espaciador” e “ITS” (espaciador de transcripción interna) son términos abreviados que se refieren a la región entre el ARNr 16S y 23S o entre los genes de ARNr 16 S y 23S.

30 El término “sonda” se refiere a oligonucleótidos o polinucleótidos monocatenarios que contienen una secuencia suficientemente complementaria para hibridarse con la secuencia diana que se desea detectar.

35 Preferentemente, las sondas comparten un 70%, 80%, 90% o más de un 95% de homología con relación al complemento exacto de la secuencia diana que se desea detectar. Estas secuencias diana consisten en ADN genómico o ARN precursor, o versiones amplificadas de estos.

40 Las sondas de la invención se pueden obtener clonando plásmidos recombinantes que contienen injertos que incluyen las secuencias de nucleótidos correspondientes, si es necesario, eliminando estas últimas de los plásmidos clonados empleando las nucleasas adecuadas y recuperándolas, p. ej., mediante fraccionamiento según el peso molecular.

45 Las sondas de acuerdo con la presente invención también se pueden sintetizar químicamente, por ejemplo, mediante el método convencional del fosfotriéster.

La expresión ácidos nucleicos “complementarios”, según se emplea en la presente, se refiere a que las secuencias de los ácidos nucleicos pueden formar una doble hélice perfecta de bases apareadas entre sí.

50 Las expresiones “ácido polinucleico”, “ácido nucleico” y “polinucleótido” se corresponden con ARN o ADN genómico o ADNc monocatenario o bicatenario, que contienen al menos 5, 10, 20, 30, 40 o 50 nucleótidos contiguos. Un ácido polinucleico que contiene menos de 100 nucleótidos de longitud se denomina “oligonucleótido”.

También se pueden referir a nucleótidos modificados tales como la inosina o a nucleótidos que contienen grupos modificados que no alteran esencialmente sus características de hibridación.

55 En la presente invención, las secuencias de ácidos polinucleicos monocatenarios siempre se representan del extremo 5' al extremo 3'.

60 Se pueden emplear como tales, en su forma complementaria o en su forma de ARN, donde T se reemplaza por U.

La expresión “el más cercano” se refiere a un taxón, del cual se sabe que es o se espera que sea el más cercano en cuanto a la homología de ADN, y el cual se debe diferenciar del organismo de interés.

La expresión “hibridación específica para un taxón” o “sonda específica para un taxón” se refiere a que la sonda solo

se hibrida con el ADN o ARN del taxón para el cual se ha diseñado y no se hibrida con el ADN o ARN de otros taxones.

5 El término "taxón" se puede referir a un género completo o a un subgrupo de un género, a una especie o incluso a un subtipo de una especie (subespecies, serovares, sequevares, biovares...).

La expresión "amplificación específica" o "cebadores específicos" se refiere al hecho de que dichos cebadores solo amplifican la región del espaciador de aquellos organismos para los cuales se han diseñado y no de otros organismos.

10 El término "sensibilidad" se refiere al número de negativos falsos: es decir, si 1 de cada 100 cepas que se deberían detectar, no se detecta, el ensayo presentará una sensibilidad de  $(100-1/100)\% = 99\%$ .

15 El término "especificidad" se refiere al número de positivos falsos: es decir, si de cada 100 cepas detectadas, parece ser que 2 pertenecen a organismos para los cuales no está diseñado el ensayo, la especificidad del ensayo será de  $(100-2/100)\% = 98\%$ .

20 Los oligonucleótidos o polinucleótidos seleccionados como "preferenciales" presentan una sensibilidad y especificidad superior a un 80%, preferentemente superior a un 90% y, de forma más preferida, superior a un 95%.

25 La expresión "soporte sólido" se puede referir a cualquier sustrato al cual se pueda acoplar una sonda de polinucleótidos, siempre que se mantengan sus características de hibridación y siempre que el nivel de fondo de la hibridación se mantenga bajo. Normalmente, el sustrato sólido será una placa de microvaloración, una membrana (p. ej., nailon o nitrocelulosa) o una microesfera. Antes de aplicarla sobre la membrana o fijarla, puede resultar adecuado modificar la sonda de ácidos nucleicos para facilitar la fijación o mejorar la eficacia de hibridación. Dichas modificaciones pueden englobar la prolongación con homopolímeros, el acoplamiento con diferentes grupos reactivos tales como grupos alifáticos, grupos NH<sub>2</sub>, grupos SH, grupos carboxílicos o el acoplamiento con biotina, haptenos o proteínas.

30 El término "marcado" se refiere al uso de ácidos nucleicos marcados. El marcado se puede llevar a cabo empleando nucleótidos marcados que se incorporan durante el paso de polimerasa de la amplificación, según ilustran Saiki *et al.* (1988) o Bej *et al.* (1990), o empleando cebadores marcados, o empleando cualquier otro método conocido por los expertos en la materia. La naturaleza del marcado puede ser isotópica (<sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S, etc.) o no isotópica (biotina, digoxigenina, tinte fluorescente, biotina, enzima, etc.).

35 El término "señal" se refiere a una serie de ondas electromagnéticas (por ejemplo, fluorescencia) o a cambios en la corriente eléctrica que transportan información. La señal puede ser visible directamente o se puede hacer visible y/o interpretable empleando diferentes métodos o dispositivos.

40 La "muestra" puede ser cualquier material biológico. Este material biológico se puede tomar directamente del ser humano o animal infectados, o después de cultivarlo o enriquecerlo, o a partir de comida, del medioambiente, etc.

45 El material biológico puede ser, por ejemplo, expectoración de cualquier tipo, broncolavados, sangre, tejido cutáneo, biopsias, material de cultivo de glóbulos sanguíneos de tipo linfocito, colonias, etc. Dichas muestras se pueden preparar o extraer empleando cualquiera de las técnicas conocidas en la materia.

50 Las especies de *Enterococcus* clínicamente relevantes a efectos de la presente invención son *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. durans*, *E. flavescens*, *E. hirae*, *E. malodoratus*, *E. mundtii*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* (Tabla 4).

Para algunas especies de *Enterococcus* ya se conocen los ITS.

55 En otros estudios, la secuenciación del genoma completo de diferentes especies de *Enterococcus* ha revelado que estos organismos contienen 5 ó 6 operones de ARN ribosómico en su genoma.

En particular, dentro de las especies de *Enterococcus*, las cepas de *E. faecalis* presentan dos tipos diferentes de espaciadores y las cepas de *E. faecium* muestran cuatro tipos diferentes.

60 Para solventar los problemas generados por esta variabilidad tan elevada, la presente descripción proporciona una región particular de ITS, identificada y delimitada por presentar la gran ventaja de que ofrece una secuencia diana única para la detección y/o identificación de todas las especies de *Enterococcus*, y en particular de todas las especies de *Enterococcus* clínicamente relevantes, y más particularmente de *E. faecalis* y/o *E. faecium*.

Además, se ha descubierto que la secuencia diana se encuentra en el espaciador de todas las especies de

*Enterococcus*, en particular de todas las especies de *Enterococcus* clínicamente relevantes.

Esta región particular de ITS, también denominada "región diana" o "secuencia diana", se puede definir como una molécula de ácido nucleico que consiste en SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2, o como una molécula de ácido nucleico homóloga a SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2, su forma de ARN donde T se reemplaza por U, o su forma complementaria.

Esta expresión "secuencia diana" engloba todas las secuencias homólogas que se encuentran en la región de ITS de cualquier especie de *Enterococcus*; dichas secuencias homólogas también se denominan en lo sucesivo en la presente "homólogas". El grado de homología es entonces superior a un 75%, generalmente superior a un 80% e incluso superior a un 90%.

En el marco de esta descripción, por lo tanto, "homólogas" se refiere a secuencias homólogas a SEQ ID NO 1 ó 2 o a cualquier fragmento de estas, localizadas en la región de ITS de cualquier especie de *Enterococcus*, donde SEQ ID NO 1 y 2 proceden, respectivamente, de cepas de *E. faecalis* y *E. faecium*.

También constituyen un objeto de la invención polinucleótidos nuevos para su uso como sondas, diseñados a partir de la secuencia diana para la detección y/o identificación de especies de *Enterococcus*.

Dicho de otra manera, un objeto de la invención se refiere a polinucleótidos nuevos para su uso como sondas, los cuales se hibridan con la secuencia diana de la invención para la detección y/o identificación de especies de *Enterococcus*.

En particular, un objeto de la invención es una molécula aislada de ácido nucleico que se hibrida específicamente con SEQ ID NO 1 ó 2, o la forma de ARN de dicha SEQ ID NO 1 ó 2, donde T se reemplaza por U, o con la forma complementaria de dicha SEQ ID NO 1 ó 2, o con un fragmento de al menos 20 nucleótidos contiguos de esta, o con cualquiera de sus homólogas, para la detección y/o identificación de especies de *Enterococcus*, en particular de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*.

Las sondas de polinucleótidos preferidas tienen una longitud de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 50 bases, más preferentemente contienen entre aproximadamente 10 y aproximadamente 25 nucleótidos y son suficientemente homólogas a la secuencia diana.

Los polinucleótidos de SEQ ID NO 3 a 84 y cualquiera de sus homólogas se pueden emplear como sondas.

Las sondas preferidas son polinucleótidos de SEQ ID NO 22 a 26, 28 a 43, 45 a 65 y 67 a 84 y homólogas, en particular polinucleótidos de SEQ ID NO 28 a 36, 45 a 58, 67 a 84.

Los cebadores preferidos de la descripción son polinucleótidos de ADN monocatenario capaces de actuar como un punto de iniciación para la síntesis de la secuencia diana de la invención. La longitud y la secuencia de un cebador de la invención deben ser tales que permitan iniciar la síntesis de los productos de extensión.

Preferentemente, un cebador tiene una longitud de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 nucleótidos, preferentemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 25. Su longitud y secuencia específicas se deberán seleccionar dependiendo de las condiciones empleadas tales como temperatura y fuerza iónica.

Los cebadores preferidos amplifican la secuencia diana. Dicho de otra manera, los cebadores preferidos son SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2 y/o homólogas.

Los cebadores preferidos son polinucleótidos de SEQ ID NO 3 a 10 y 12 a 20, y homólogas.

El hecho de que los cebadores para la amplificación no tengan que coincidir exactamente con la secuencia modelo correspondiente para garantizar una amplificación adecuada está ampliamente documentado en la bibliografía (Kwok *et al.*, 1990).

El método de amplificación empleado puede ser la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Saiki *et al.*, 1988), reacción en cadena de la ligasa (LCR; Landgren *et al.*, 1988; Wu y Wallace, 1989; Barany, 1991), amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA; Guatelli *et al.*, 1990; Compton, 1991), sistema de amplificación basado en la transcripción (TAS; Kwok *et al.*, 1989), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA; Duck, 1990; Walker *et al.*, 1992) o amplificación mediante replicasa Q $\beta$  (Lizardi *et al.*, 1988; Lomeli *et al.*, 1989) o cualquier otro método adecuado conocido en la materia para amplificar las moléculas de ácido nucleico.

Los polinucleótidos preferidos de la descripción para su uso como cebadores o como sondas se enumeran en la Tabla 1.

5 Los polinucleótidos de la descripción pueden diferir en la secuencia de cualquiera de los polinucleótidos especificados en la Tabla 1, o de cualquiera de sus homólogas, tanto por la adición como la eliminación de cualquiera de sus extremos respectivos de uno o varios nucleótidos, o por el cambio de uno o más nucleótidos dentro de dichas secuencias, o una combinación de ambos, siempre que los equivalentes obtenidos de esta manera se sigan hibridando con la secuencia diana del mismo modo que los polinucleótidos no modificados correspondientes. Dichos polinucleótidos equivalentes comparten al menos un 75% de homología, preferentemente más de un 80%, de forma más preferida más de un 85% de homología con los polinucleótidos no modificados correspondientes.

10 Cuando se emplea un equivalente de un polinucleótido, puede resultar necesario modificar las condiciones de hibridación para obtener la misma especificidad que para los polinucleótidos no modificados correspondientes.

15 Como consecuencia, también será necesario modificar de forma correspondiente la secuencia de otros polinucleótidos cuando los polinucleótidos se vayan a utilizar en un conjunto en las mismas condiciones de hibridación. Estas modificaciones se pueden realizar de acuerdo con los principios conocidos en la materia, p. ej., como los descritos en Hames B y Higgins S (Eds): *Nucleic acid hybridization. Practical approach*. IRL Press, Oxford, Reino Unido, 1985.

20 Los cebadores y/o sondas de polinucleótidos también pueden comprender análogos de nucleótidos tales como fosforotioatos (Matsukura *et al.*, 1987), alquilfosforotioatos (Miller *et al.*, 1979) o ácidos nucleicos peptídicos (Nielsen *et al.*, 1991; Nielsen *et al.*, 1993) o pueden contener agentes intercalantes (Asseline *et al.*, 1984), etc.

25 Los cebadores o sondas modificados requieren adaptaciones con relación a las condiciones en las cuales se utilizan, para obtener la especificidad y sensibilidad requeridas. Sin embargo, los resultados de la hibridación se deben mantener esencialmente iguales a los obtenidos con los polinucleótidos no modificados.

30 La introducción de estas modificaciones puede resultar ventajosa para influir en ciertas características tales como la cinética de la hibridación, la reversibilidad de la formación del híbrido, la estabilidad biológica de las moléculas de polinucleótidos, etc.

Las sondas y los cebadores se emplean en métodos, que también son objeto de la presente invención, para la detección y/o identificación de especies de *Enterococcus*, en particular de *E. faecalis* y/o *E. faecium*.

35 La detección y/o identificación de la secuencia diana se puede realizar empleando un método de electroforesis, un método de hibridación o un método de secuenciación.

Un método para la detección de una o más especies de *Enterococcus* en una muestra comprende los siguientes pasos:

- 40
- En primer lugar, y si resulta necesario, los ácidos nucleicos presentes en la muestra se preparan para la amplificación y/o hibridación.
  - En segundo lugar, y también si resulta necesario, los ácidos nucleicos, si están presentes, se amplifican con un sistema de amplificación diana u otro, según se especifica más adelante. Normalmente, la amplificación es necesaria para aumentar la señal de hibridación posterior. Sin embargo, para algunas

45

    - muestras, o para algunos sistemas de amplificación-sígnal muy sensibles, puede ser que la amplificación no sea necesaria.
    - En tercer lugar, los ácidos nucleicos presentes en la muestra o el producto amplificado resultante se ponen en contacto con las sondas y se permite que tenga lugar la hibridación.
    - Finalmente, se detectan los híbridos empleando un sistema de detección compatible y adecuado. A partir

50

      - de las señales o patrones de hibridación observados, se puede deducir la presencia o ausencia de una o más especies de *Enterococcus*.

El sistema de amplificación empleado puede ser más o menos universal, dependiendo de la aplicación específica necesaria.

55 Al emplear cebadores universales localizados en las regiones flanqueantes conservadas (genes 16S y 23S) del espaciador de ARNr, se amplificará la región de espaciadores de la mayor parte de los organismos de origen eubacteriano o de todos ellos.

60 Para algunas aplicaciones, puede resultar adecuado no amplificar todos los organismos presentes en la muestra, sino una o varias especies de *Enterococcus*. Esto se puede conseguir empleando cebadores específicos localizados en la región diana de las especies de *Enterococcus*.

En particular, un método de la invención para la detección y/o identificación de especies de *Enterococcus*, concretamente de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*, en una muestra comprende los pasos de:

- 5 (i) si resulta necesario, liberar, aislar y/o concentrar los ácidos polinucleicos en la muestra;
- (ii) si resulta necesario, amplificar la región de espaciadores de ARNr 16S-23S, o un fragmento que comprenda la secuencia diana, o la secuencia diana o un fragmento de esta, con al menos un par cebador adecuado;
- (iii) hibridar los ácidos polinucleicos del paso (i) o (ii) con un conjunto de sondas de polinucleótidos, según se define en la reivindicación adjunta 1, realizando un análisis de curva de fusión y
- 10 (iv) detectar los híbridos formados,
- (v) interpretar la(s) señal(es) obtenida(s) y deducir la presencia de especies de *Enterococcus* y/o identificar las especies de *Enterococcus* en la muestra.

Preferentemente, las sondas de la invención se hibridan en condiciones muy rigurosas.

15 En condiciones muy rigurosas, solo se forman híbridos de ácidos nucleicos complementarios. Por consiguiente, la rigurosidad de las condiciones de ensayo determina la cantidad de complementariedad necesaria entre dos cadenas de ácidos nucleicos que forman un híbrido. Se selecciona la rigurosidad para maximizar la diferencia de estabilidad entre el híbrido formado con el ácido nucleico diana y el ácido nucleico no diana.

20 Las condiciones de hibridación se seleccionan de manera que la señal de hibridación obtenida cuando un polinucleótido de la invención se hibrida específicamente con una secuencia diana sea diferente de la señal obtenida cuando dicho polinucleótido se hibrida con una secuencia diana de manera no específica.

25 En la práctica, las diferentes señales se pueden visualizar, por ejemplo, cuando su intensidad es dos, cinco, diez o más veces más intensa en el caso de una hibridación específica con la secuencia diana, en comparación con el caso de una hibridación no específica con la secuencia diana, por ejemplo, el sistema LiPA.

30 Las diferentes señales también se pueden visualizar cuando se representan diferentes picos en un análisis de curva de fusión, por ejemplo, cuando se utiliza un método de PCR a tiempo real.

El fragmento mencionado en el paso de amplificación o de hibridación de cualquier método de la invención puede comprender de 20 a 50, de 20 a 80 o de 20 a 100 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO 1 ó 2 o de cualquier homóloga.

35 En una realización, una técnica muy adecuada y ventajosa para la detección de secuencias diana que estén posiblemente presentes en la muestra es el método de PCR a tiempo real.

40 Existen diferentes formatos para la detección de ADN amplificado, en particular sondas TaqMan™, sondas de balizas moleculares o sondas de hibridación FRET.

45 Con relación a las sondas TaqMan™, se marca una sonda de hibridación monocatenaria con dos componentes. Cuando el primer componente, denominado fluorocromo, se excita con luz de una longitud de onda adecuada, la energía absorbida se transfiere al segundo componente, denominado quencher, según el principio de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia. Durante el paso de apareamiento de la reacción de PCR, la sonda de hibridación se une al ADN diana y se degrada mediante la actividad exonucleasa 5'-3' de la polimerasa, por ejemplo, la Taq polimerasa, durante la fase de elongación. Como resultado, el componente fluorescente excitado y el quencher están separados espacialmente el uno del otro y, por lo tanto, se puede medir la emisión de fluorescencia del primer componente (EP B 0 543 942 y US 5.210.015).

50 En cuanto a las sondas de balizas moleculares, las sondas también se marcan con un primer componente y con un quencher, estando los marcadores preferentemente localizados en extremos diferentes de una sonda al menos parcialmente autocomplementaria. Como resultado de la estructura secundaria de la sonda, ambos componentes se encuentran espacialmente cercanos en solución. Después de la hibridación con los ácidos nucleicos diana, ambos componentes se separan el uno del otro, de manera que después de la excitación con luz de una longitud de onda adecuada, se puede medir la emisión de fluorescencia del primer componente (US 5.118.801).

60 El formato del ensayo con la sonda de hibridación de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) es especialmente útil para todos los tipos de ensayos de hibridación homogénea (Matthews, J. A. y Kricka, L. J., Anal Biochem 169 (1988) 1-25). Se caracteriza por que contiene dos sondas de hibridación monocatenarias, que se emplean simultáneamente y son complementarias a sitios adyacentes de la misma cadena de un ácido nucleico diana (amplificado). Ambas sondas se marcan con componentes fluorescentes diferentes. Cuando se

excitan con luz de una longitud de onda adecuada, un primer componente transfiere la energía absorbida al segundo componente, según el principio de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, de manera que se puede medir la emisión de fluorescencia del segundo componente solo cuando ambas sondas de hibridación se unen a posiciones adyacentes de la molécula diana que se desea detectar.

5 Cuando se hibridan con la secuencia diana, las sondas de hibridación deben estar situadas muy cerca la una de la otra, en una disposición de "cabeza-cola". Normalmente, el espacio entre el extremo 3' marcado de la primera sonda y el extremo 5' marcado de la segunda sonda es lo menor posible, y en particular está constituido por aproximadamente de 0 a 25 bases, y preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 bases. Esto permite que el compuesto dador FRET y el compuesto aceptor FRET se encuentren muy cerca, normalmente a una distancia de 10-100 Ångstrom.

15 En lugar de monitorizar el aumento de la fluorescencia del componente aceptor FRET, también es posible monitorizar la disminución de la fluorescencia del componente dador FRET como una medida cuantitativa del evento de hibridación.

20 Entre todos los formatos de detección conocidos en la materia para PCR a tiempo real, se ha demostrado que el formato de la sonda de hibridación FRET es muy sensible, exacto y fiable (WO 97/46707; WO 97/46712; WO 97/46714). A pesar de ello, el diseño de las secuencias adecuadas para la sonda de hibridación FRET se puede ver limitado en ocasiones por las características especiales de la secuencia de ácidos nucleicos diana que se desea detectar.

25 Como alternativa al uso de dos sondas de hibridación FRET, también es posible emplear un cebador con marcado fluorescente y solo una sonda de polinucleótidos marcada (Bernard, P. S., *et al.*, Anal. Biochem. 255 (1998) 101-7). En este caso, se puede seleccionar de forma arbitraria si el cebador se marca con el compuesto dador FRET o el compuesto aceptor FRET.

30 Las sondas de hibridación FRET (también denominadas Hybprobes o sondas FRET) también se pueden emplear para análisis de curvas de fusión (WO 97/46707, WO 97/46712, WO 97/46714). En un ensayo de este tipo, en primer lugar se amplifica el ácido nucleico diana en una reacción de PCR típica con cebadores de amplificación adecuados. Las sondas de hibridación ya pueden estar presentes durante la reacción de amplificación o se pueden añadir posteriormente. Tras completar la reacción de PCR, la temperatura de la muestra se aumenta de forma consecutiva. Se detecta fluorescencia siempre que la sonda de hibridación esté unida al ADN diana. Al alcanzar la temperatura de fusión, la sonda de hibridación se separa de su diana y la señal de fluorescencia se reduce inmediatamente hasta el nivel de fondo. Esta disminución se monitoriza con un gráfico adecuado de fluorescencia frente a temperatura-tiempo, de manera que se puede calcular la forma negativa de la primera derivada de la función. A continuación, el valor de temperatura correspondiente al máximo obtenido de esta función se considera como la temperatura de fusión determinada para dicho par de sondas de hibridación FRET.

40 Los polimorfismos o mutaciones puntuales en el ácido nucleico diana dan como resultado una complementariedad menor de un 100% entre el ácido nucleico diana y las sondas FRET, lo que provoca la obtención de una temperatura de fusión menor. Esto permite una detección común de un grupo de variantes de secuencias mediante una hibridación con una sonda de hibridación FRET, mientras que, posteriormente, se pueden discriminar los diferentes miembros de dicho grupo realizando análisis de curvas de fusión.

45 En lugar de sondas de hibridación FRET, se pueden emplear como alternativa balizas moleculares para los análisis de curvas de fusión.

50 Una vez se dispone de los análisis de curvas de fusión por PCR a tiempo real y PCR a tiempo real homogéneo, es posible discriminar ciertos tipos de especies o cepas empleando tintes de unión de ADN bicatenario tales como SybrGreen™ o, como alternativa, sondas de hibridación específicamente diseñadas que se hibridan con secuencias diana diferentes pero similares.

55 En el primer caso, se debe determinar la temperatura de fusión del producto de PCR bicatenario generado. Sin embargo, este método tiene solamente aplicaciones limitadas debido a que no se pueden monitorizar eficazmente unas pocas diferencias, porque las variaciones pequeñas en la secuencia solo provocan diferencias sutiles en la temperatura de fusión.

60 Como alternativa, las sondas de hibridación se pueden utilizar de manera tal que se determine la temperatura de fusión de la sonda/híbrido del ácido nucleico diana.

Existen diferentes plataformas de PCR a tiempo real tales como los equipos ABI/Prism™, y en particular el aparato LightCycler™, todas ellas basadas en el mismo principio, que consiste en medir la emisión de luz, monitorizar continuamente el pico de emisión durante el ciclo de fusión, determinar y visualizar las temperaturas (picos de

fusión) a las cuales las sondas marcadas se separan de los productos de amplificación. Los datos de los picos de fusión son característicos de una secuencia (sonda:diana) particular, porque los desajustes entre la sonda y la diana afectan a la cinética de la fusión, de manera que se obtienen picos de fusión diferentes para cada especie de interés.

5 La plataforma LightCycler™ ofrece muchas ventajas y, en particular, permite ganar tiempo y hace posible utilizar varios sistemas diferentes de detección de sonda fluorescente de secuencia específica tales como las sondas de hibridación (HybProbes), sondas TaqMan™, balizas moleculares y sondas duales (SYBR Green I).

10 En un método preferido de la presente invención, se emplea el sistema HybProbe, que consiste en dos sondas de polinucleótidos adyacentes derivadas de la región diana de la invención, en una orientación cabeza-cola, separadas por algunos nucleótidos, generalmente de 0 a 25, preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 5. Una de las sondas se marca en su extremo 3' con un tinte dador, la otra se marca con una molécula aceptora en su extremo 5' y se bloquea con un fosfato en el extremo 3' (para evitar que actúe como un cebador). El tinte dador es  
15 generalmente fluoresceína y la molécula aceptora es generalmente LC Red640 ó 705.

La detección de la secuencia diana de la invención también se puede lograr con una cadena de PCR marcada interna y una sonda de detección localizada en la cadena opuesta. La señal depende de la aproximación espacial de los tintes y depende de la cantidad de diana.

20 Cuando ambas sondas se hibridan con su secuencia diana, la luz emitida por el dador se transmite al fluoróforo aceptor mediante transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) y se puede detectar la fluorescencia emitida (640 ó 705 nm). La intensidad de la fluorescencia emitida aumenta de forma paralela con el producto de la amplificación del ADN diana.

25 Las sondas LightCycler ofrecen la ventaja frente a las sondas TaqMan™ de que no requieren hidrólisis y, por consiguiente, no requieren una extensión adicional de los tiempos de PCR (apareamiento-elongación ≤ 12 s). Por lo tanto, es posible sacar partido de las ventajas de la ciclación térmica de alta velocidad del LightCycler y completar el programa de PCR en solamente 45 minutos.

30 Además, las generaciones más recientes de esta plataforma de PCR a tiempo real son capaces de monitorizar varias sondas en una única reacción, lo que permite la detección y/o identificación de diferentes *Enterococci*, en los niveles de la especie y también en niveles taxonómicos más bajos.

35 Además, se ha demostrado que los métodos diseñados para la tecnología TaqMan se pueden adaptar fácilmente para la tecnología HybProbe con resultados equivalentes (*Haematologica*, vol. 85 (12), págs. 1248-1254, diciembre de 2000).

40 Por consiguiente, otro objetivo de la invención se refiere a conjuntos de al menos 2 sondas de polinucleótidos, también denominadas HybProbes, donde ambas HybProbes se hibridan con la misma secuencia diana y se encuentran en una posición adyacente entre ellas, con un máximo de 25 nucleótidos entre dichas 2 HybProbes, preferentemente con un máximo de 10 nucleótidos, en particular con un máximo de 5 nucleótidos.

45 Cuando hay dos HybProbes, una se marca con un fluoróforo aceptor y la otra con un fluoróforo dador de un par de transferencia de energía por fluorescencia, de manera que al hibridar ambas HybProbes con la secuencia diana, el fluoróforo dador y el aceptor se encuentran entre 0 y 25 nucleótidos el uno del otro, y preferentemente entre 0 y 5 nucleótidos el uno del otro.

50 Cuando hay más de dos HybProbes, algunas se marcan con un fluoróforo aceptor y otras con un fluoróforo dador de un par de transferencia de energía por fluorescencia, de manera que al hibridar las HybProbes con la secuencia diana, el fluoróforo dador y el aceptor se encuentran entre 0 y 25 nucleótidos el uno del otro, y preferentemente entre 0 y 5 nucleótidos el uno del otro.

55 Para detectar y/o identificar especies de *Enterococcus*, en particular especies de *Enterococcus* clínicamente relevantes, se puede emplear un conjunto de al menos dos sondas de polinucleótidos, donde dichas sondas se hibridan con SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2, o con la forma de ARN de dicha SEQ ID NO 1 ó 2, donde T se reemplaza por U, o con la forma complementaria de dicha SEQ ID NO 1 ó 2, o con homólogas, donde no hay más de 25 nucleótidos, preferentemente no más de 5 nucleótidos, entre dichas sondas.

60 Un conjunto de sondas también puede estar constituido por 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sondas, pero preferentemente está constituido por de 2 a 5 sondas, y más preferentemente por 3 sondas.

Se prefieren los conjuntos de sondas enumerados en la Tabla 3 y sus homólogas. El conjunto de sondas de la invención se define en la reivindicación 1.

También se pueden emplear conjuntos de 2 polinucleótidos, uno se utiliza como cebador y el otro como sonda, donde tanto dicho cebador como dicha sonda se hibridan con la secuencia diana constituida por SEQ ID NO 1 ó 2, o la forma de ARN de dicha SEQ ID NO 1 ó 2, donde T se reemplaza por U, o la forma complementaria de dicha SEQ ID NO 1 ó 2, o cualquiera de sus homólogas, donde no hay más de 25 nucleótidos, preferentemente no más de 5 nucleótidos, entre dicho cebador y dicha sonda.

El conjunto de sondas que se define en la reivindicación 1 se emplea en métodos para la detección y/o identificación de especies de *Enterococcus*, en particular de *E. faecalis* y/o *E. faecium*.

Un método para la detección y/o identificación de especies de *E. faecalis* y/o *E. faecium* en una muestra comprende los pasos de:

- (i) si resulta necesario, liberar, aislar y/o concentrar los ácidos polinucleicos en la muestra;
- (ii) si resulta necesario, amplificar la región de espaciadores de ARNr 16S-23S, o un fragmento que comprenda la secuencia diana, o la secuencia diana o un fragmento de esta, con al menos un par cebador adecuado;
- (iii) hibridar los ácidos polinucleicos del paso (i) o (ii) con el conjunto de sondas de polinucleótidos, según se define en la reivindicación 1,
- (iv) detectar los híbridos formados, realizando un análisis de curva de fusión, y
- (v) interpretar la(s) señal(es) obtenida(s) y deducir la presencia de especies de *E. faecalis* y/o *E. faecium* en la muestra.

Por ejemplo, un par cebador empleado en el paso de amplificación puede ser cualquier combinación de un cebador directo, constituido por SEQ ID NO 3 a 11 o sus homólogas, y un cebador inverso, constituido por SEQ ID NO 12 a 21 o sus homólogas.

Por ejemplo, un conjunto de 2 ó 3 HybProbes empleadas en el paso de hibridación puede ser cualquier combinación de 2 ó 3 HybProbes seleccionadas entre los polinucleótidos de SEQ ID NO 22 a 26, 28 a 43, 45 a 65 ó 67 a 84 o sus homólogas, preferentemente entre los polinucleótidos de SEQ ID NO 28 a 36, 45 a 56 ó 67 a 84 o sus homólogas, siempre que la separación entre las dos HybProbes mencionadas, cuando se hibridan con la secuencia diana, sea menor de 25 nucleótidos, preferentemente menor de 5 nucleótidos.

Los conjuntos preferidos se mencionan en la Tabla 3.

Una de las ventajas del sistema HybProbes reside en el hecho de que permite la detección de variaciones en la secuencia, incluidas las mutaciones, polimorfismos y otras especies de ácidos nucleicos variantes, que se basa en el siguiente concepto molecular: una de las HybProbes es una "sonda de anclaje" fuertemente enlazante, mientras que la "sonda sensora" adyacente abarca la región de variación de la secuencia. Durante la fusión del producto de PCR final, se detecta la alteración de la secuencia como un cambio en la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) de la sonda sensora.

Por ejemplo, si la muestra contiene solamente SEQ ID NO 1, el uso de Hybprobes que se hibridan específicamente con dicha SEQ ID NO 1 generaría un único pico de fusión. Si también hay una homóloga en la muestra, el uso de las dos mismas Hybprobes generaría dos picos, siempre que exista una base desapareada, que generalmente inducirá un desplazamiento de la temperatura fácilmente observable.

Dependiendo de los polinucleótidos seleccionados, su T<sub>m</sub> y las condiciones de hibridación, la fluorescencia se puede medir durante el paso de amplificación, generando a continuación curvas de amplificación, o después del paso de amplificación, generando curvas de fusión para un análisis de curvas de fusión.

De este modo, la señal obtenida se puede visualizar en forma de curvas de amplificación o en forma de curvas de fusión, a partir de las cuales es posible deducir la presencia de especies de *Enterococcus* y/o deducir cuál(es) de los *Enterococci* está(n) presente(s).

En particular, un método para la detección y/o identificación de especies de *Enterococcus* en una muestra también comprende los pasos de:

- (i) si resulta necesario, liberar, aislar y/o concentrar los ácidos polinucleicos en la muestra, y
- (ii) amplificar la secuencia diana, o parte de ella, con un par cebador marcado,
- (iii) hibridar los ácidos polinucleicos con al menos una HybProbe que se hibride, en una posición adyacente a dicho cebador marcado con menos de 25 nucleótidos en medio, con SEQ ID NO 1 ó 2, o con la forma de ARN de dicha SEQ ID NO 1 ó 2, donde T se reemplaza por U, o con la forma complementaria de dicha SEQ ID NO 1 ó 2 o con cualquier homóloga, o con un fragmento de al menos 20 nucleótidos

contiguos de esta,

(iv) detectar los híbridos formados, y

(v) deducir la presencia de especies de *Enterococcus* y/o identificar las especies de *Enterococcus* en la muestra a partir de las señales obtenidas en el paso (iv).

5 Un método que utilice el sistema HybProbes se puede adaptar para la detección e identificación de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*, de manera que permita distinguir *E. faecalis* y/o *E. faecium* de otras especies.

10 A continuación, en el paso de amplificación, los cebadores adecuados son pares cebadores que amplifican específicamente la secuencia diana constituida por SEQ ID NO 1 ó 2, o por la forma de ARN de dicha SEQ ID NO 1 ó 2, donde T se reemplaza por U, o por la forma complementaria de dicha SEQ ID NO 1 ó 2.

15 En el paso de hibridación, las HybProbes se deberían hibridar específicamente con SEQ ID NO 1 ó 2, o con la forma de ARN, donde T se reemplaza por U, o con la forma complementaria.

Por consiguiente, las cepas de *E. faecalis* y/o *E. faecium* se pueden distinguir de manera inequívoca de todos los demás organismos examinados mediante análisis de curvas de fusión.

20 No se obtienen señales relevantes con ADN genómico humano o que no pertenezca a *Enterococci*.

Los pares cebadores preferidos empleados en este ejemplo particular pueden ser cualquier combinación de cebadores directos, seleccionados entre SEQ ID NO 3 a 11 o sus homólogas, y cebadores inversos, seleccionados entre SEQ ID NO 12 a 21 o sus homólogas.

25 Los conjuntos de HybProbes enumerados en la Tabla 3 o sus homólogas son los conjuntos preferidos de HbyProbes. Un conjunto más preferido de 3 HybProbes está constituido por SEQ ID NO 36 u homólogas y SEQ ID NO 56 u homólogas y SEQ ID NO 73 u homólogas.

30 Un conjunto de HybProbes constituido por SEQ ID NO 36, 56 y 73 es capaz de detectar *E. faecalis* y/o *E. faecium* con elevada sensibilidad.

35 Cualquier polinucleótido enumerado en la Tabla 1, que se corresponde con SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 84 y cualquiera de sus homólogas, se puede emplear en cualquier método de la presente descripción como un cebador y/o como una sonda, por sí solo o combinado.

40 Una segunda realización, también basada en un método de hibridación, consiste en la técnica de ensayo de sondas en una tira. El ensayo de sondas en una tira (LiPA) es un formato de hibridación inversa (SaiKi *et al.*, 1989) que emplea tiras de membrana sobre las cuales se pueden aplicar convenientemente varias sondas de polinucleótidos (incluidos los polinucleótidos de control positivo o negativo) como líneas paralelas.

45 La técnica LiPA, según describe Stuyver *et al.* (1993) en la Solicitud Internacional WO 94/12670, proporciona un ensayo de hibridación rápido y fácil de usar. Los resultados se pueden leer 4 h después del inicio de la amplificación. Después de la amplificación, durante la cual normalmente se incorpora un marcador no isotópico al producto amplificado, y desnaturalización alcalina, el producto amplificado se pone en contacto con las sondas de la membrana y se lleva a cabo la hibridación durante aproximadamente de 1 a 1.5 h. Como consecuencia, los híbridos formados se detectan mediante un procedimiento enzimático que proporciona un precipitado visual de color lila-marrón. El formato LiPA es completamente compatible con los escáneres que se pueden adquirir de proveedores comerciales, lo que hace posible obtener una interpretación automática de los resultados. Todas estas ventajas hacen que sea posible emplear el formato LiPA en condiciones rutinarias.

50 El formato LiPA constituye una herramienta ventajosa para la detección y/o identificación de patógenos en el nivel de la especie, pero también en unos niveles taxonómicos más elevados o más bajos. Por ejemplo, se pueden seleccionar las configuraciones de las sondas de las tiras de LiPA de manera tal que puedan detectar el género completo de *Enterococcus*, o que puedan identificar especies dentro del género (p. ej., *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*, etc), o que, en algunos casos, puedan detectar incluso subtipos (subespecies, serovares, sequevares, biovares, etc., cualquiera que sea clínicamente relevante) dentro de una especie.

60 La capacidad de generar resultados de hibridación simultáneamente con un gran número de sondas constituye otro beneficio de la tecnología LiPA. En muchos casos, la cantidad de información que se puede obtener con una combinación particular de sondas supera considerablemente los datos obtenidos empleando ensayos de sonda única. Por consiguiente, la selección de sondas de la tira de membrana es de suma importancia, ya que un conjunto optimizado de sondas generará la máxima información posible.

Estas sondas se pueden aplicar sobre las tiras de membrana en diferentes posiciones y el resultado se interpreta como positivo si al menos una de estas sondas es positiva. Como alternativa, estas sondas se pueden aplicar como una mezcla en la misma posición, de manera que se reduce el número de líneas en una tira. Esta reducción puede resultar conveniente para hacer que la tira sea más concisa o para poder extender el número total de sondas en una tira.

Otra estrategia alternativa, en vistas a sus beneficios prácticos, consiste en la síntesis de polinucleótidos que albergan las secuencias de dos o más sondas diferentes, denominadas sondas degeneradas, que se pueden procesar adicionalmente a continuación y aplicar sobre la tira como una molécula de polinucleótido. Esta estrategia simplificaría considerablemente los procedimientos de fabricación de las tiras de LiPA. Por ejemplo, se requieren sondas con secuencias A y B de nucleótidos para detectar todas las cepas de un taxón X. Aplicando la última estrategia, se puede sintetizar una sonda que contenga la secuencia AB de nucleótidos. Esta sonda poseerá las características combinadas de las sondas A y B.

Debido a las propiedades mencionadas anteriormente, se puede considerar el sistema LiPA como un formato eficaz para un método de hibridación en el que resulta necesario detectar varios organismos simultáneamente en una muestra.

Sin embargo, debería quedar claro que se puede emplear cualquier otro ensayo de hibridación, en el que se empleen diferentes sondas en las mismas condiciones de hibridación y lavado, para los métodos de detección y/o selección mencionados anteriormente. Por ejemplo, puede que sea posible inmovilizar el ácido nucleico diana en un soporte sólido y emplear mezclas de diferentes sondas, todas marcadas de forma diferente, lo que proporcionaría una señal de detección diferente para cada una de las sondas hibridadas con la diana. Además, hoy en día existen muchos soportes diferentes disponibles.

A modo de ejemplo, a continuación se describe el procedimiento que se debe seguir para detectar una o más especies de *Enterococcus* en una muestra empleando el formato LiPA:

- En primer lugar, y si resulta necesario, los ácidos nucleicos presentes en la muestra se preparan para la amplificación y/o hibridación.
- En segundo lugar, los ácidos nucleicos, si están presentes, se amplifican con un sistema de amplificación diana u otro, según se especifica más adelante. Normalmente, la amplificación es necesaria para aumentar la señal de hibridación posterior.
- En tercer lugar, finalmente después de un paso de desnaturalización, los ácidos nucleicos presentes en la muestra o el producto amplificado resultante se ponen en contacto con las tiras de LiPA sobre las cuales se han inmovilizado una o más sondas (sondas de ADN, ARN, degeneradas o modificadas) que hacen posible la detección de los organismos de interés, y se permite que tenga lugar la hibridación.
- Por último, finalmente después de realizar un paso de lavado, se detectan los híbridos empleando un sistema de detección compatible y adecuado. A partir de las señales o patrones de hibridación observados, se puede deducir la presencia o ausencia de uno o varios organismos que se deseaban determinar en esa muestra biológica particular.

El sistema de amplificación empleado puede ser más o menos universal, dependiendo del método específico de aplicación.

Al emplear cebadores universales localizados en las regiones flanqueantes conservadas del espaciador de ARNr, es decir, en el gen 16S y el gen 23S, se amplificará la región de espaciadores de la mayor parte de los organismos de origen eubacteriano o de todos ellos.

Para algunas aplicaciones puede resultar adecuado no amplificar todos los organismos presentes en la muestra, sino más específicamente las especies de *Enterococcus*.

Un método para la detección y/o identificación de especies de *Enterococcus* en una muestra comprende los pasos de:

- (i) si resulta necesario, liberar, aislar y/o concentrar los ácidos polinucleicos en la muestra;
- (ii) si resulta necesario, amplificar la región de espaciadores de ARNr 16S-23S, o parte de esta, con al menos un par cebador adecuado;
- (iii) hibridar los ácidos polinucleicos con al menos una sonda que se hibride con la secuencia diana constituida por SEQ ID NO 1 ó 2, o por la forma de ARN de dicha SEQ ID NO 1 ó 2, donde T se reemplaza por U, o por la forma complementaria de dicha SEQ ID NO o cualquier homóloga, o por un fragmento de al menos 20 nucleótidos contiguos de esta;

- (iv) detectar los híbridos formados en el paso (iii);
- (v) identificar el o los microorganismos presentes en la muestra a partir de las señales de hibridación diferenciales obtenidas en el paso (iv).

- 5 La parte de ITS mencionada en el paso de amplificación es un polinucleótido que comprende la secuencia diana o la secuencia diana de por sí, donde la secuencia diana está constituida por SEQ ID NO 1 ó 2, o por la forma de ARN de dicha SEQ ID NO 1 ó 2, donde T se reemplaza por U, o por la forma complementaria de dicha SEQ ID NO 1 ó 2 o cualquier homóloga, o por un fragmento de al menos 20 nucleótidos contiguos de esta.
- 10 Preferentemente, la presente descripción proporciona un método como el que se ha descrito anteriormente, donde se detectan al menos 2 microorganismos simultáneamente.
- Un conjunto de sondas como el que se ha descrito en el paso (iii) comprende al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o más sondas o equivalentes de estas.
- 15 En un método preferido, el conjunto de sondas como el descrito en el paso (iii) comprende al menos dos sondas.
- Las sondas preferidas son los polinucleótidos de SEQ ID NO 1 a 84 y sus homólogas.
- 20 La presente descripción también proporciona un método como el descrito anteriormente, en el que las sondas especificadas en el paso (iii) se combinan con al menos una sonda diferente, preferentemente perteneciente también a la región de espaciadores de ARNr 16S-23S, de manera que hacen posible la detección simultánea de diferentes bacterias patogénicas que puedan estar presentes en la misma muestra.
- 25 Las sondas preferidas están diseñadas para conseguir un rendimiento óptimo en las mismas condiciones de hibridación, de manera que se puedan utilizar en conjuntos de hibridación simultánea; esto aumenta considerablemente la utilidad de estas sondas y proporciona un ahorro significativo de tiempo y trabajo.
- También constituye un objeto de la invención un kit que contiene las sondas de la reivindicación 1.
- 30 Un kit de la descripción comprende los siguientes componentes:
- al menos un polinucleótido que se hibrida con la secuencia diana constituida por SEQ ID NO 1 ó 2, o la forma de ARN de dicha SEQ ID NO 1 ó 2, donde T se reemplaza por U, o la forma complementaria de dicha SEQ ID NO 1 ó 2 o cualquier homóloga;
  - un tampón de hibridación o los componentes necesarios para producir dicho tampón.
- 35 Un kit preferido comprende:
- al menos un conjunto de dos HybProbes que se hibridan, en una posición adyacente la una de la otra con menos de 25 nucleótidos, preferentemente menos de 5 nucleótidos, con la secuencia diana constituida por SEQ ID NO 1 ó 2, o la forma de ARN de dicha SEQ ID NO 1 ó 2, donde T se reemplaza por U, o la forma complementaria de dicha SEQ ID NO 1 ó 2 o cualquier homóloga;
- 40 • un tampón de hibridación o los componentes necesarios para producir dicho tampón.

Tabla 1

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia	Función preferida
SEQ ID NO 1		GTTCA TTGAAA AACTGG ATATTGA AGTAAAA AAGAATCA AAAACA AAAACCGAGA ACACCGCG GTTGAAT	
SEQ ID NO 2		GTTCA TTGAAA AACTGG ATATTGA AGTAAAA AAGAATCA AAAACA AACCGAGA ACACCGCG GTTGAAT	
SEQ ID NO 3	REncspeFP1V1	5'-ACT-TTG-TTGAGT-TTT-GAG-AGG-T-3'	CD
SEQ ID NO 4	REncspeFP1V2	5'-TTT-ACT-TTGTTGAGT-TTT-GAG-AGG3'	CD
SEQ ID NO 5	REncspeFP1V3	5'-TAC-TTT-GTT-CAG-TTT-TGA-GAG-GT-3'	CD
SEQ ID NO 6	REncspeFP1V4	5'-TTT-ACT-TTG-TTC-AGT-TTT-GAG-AGG-T-3'	CD
SEQ ID NO 7	REncspeFP1V5	5'-TTT-ACT-TTG-TTC-AGT-TTT-GAG-AG-3'	CD
SEQ ID NO 8	REncspeFP2V1	5'-TAC-AAA-CCG-AGA-ACA-CCG-3'	CD
SEQ ID NO 9	REncspeFP3V1	5'-CCT-CCT-TTC-TAA-GGA-ATA-TCCG-3'	CD
SEQ ID NO 10	REncspeFP3V2	5'-CTGCTT-TCT-AAG-GAA-TAT-CGG-3'	CD
SEQ ID NO 11		5'-GTT-CAT-TGA-AAA-CTG-GAT-A-3'	CD
SEQ ID NO 12	REncspeRP1V1	5'-CGG-TGT-ICT-CGG-TTT-GTA-G-3'	Cl
SEQ ID NO 13	REncspeRP2V1	5'-CCT-TCT-TCT-AGC-GAT-AGA-AGG-3'	Cl
SEQ ID NO 14	REncspeRP3V1	5'-ATC-AAC-CTT-ACG-GTT-GGG-3'	Cl
SEQ ID NO 15	REncspeRP3V2	5'-T7A-TCA-ACG-TTG-CGGTTG-3'	Cl
SEQ ID NO 16	REncspeRP3V3	5'-TTA-TCA-ACC-TTA-CGGTTGGGT-3'	Cl
SEQ ID NO 17	REncspeRP3V4	5'-TAT-CAA-CCT-TAC-GGT-TGG-GT-3'	Cl
SEQ ID NO 18	REncspeRP4V1	5'-GCA-ATT-CAA-CTT-ATT-AAA-AAA-CTC-3'	Cl
SEQ ID NO 19	REncspeRP4V2	5'-AGC-AAT-TGA-ACT-TAT-TAA-AAA-ACT-C-3'	Cl
SEQ ID NO 20	REncspeRP4V3	5'-GC-AAT-TGA-ACT-TAT-TAA-AAA-AC-3'	Cl'
SEQ ID NO 21		5'-ATT-CAA-CGC-GGT-GTT-CTC-G-3'	Cl
SEQ ID NO 22	REncfis_cHP2V1.2_5LC6	5'-TTG-ATT-CCT-TTT-ACT-TCA-ATA-TCC-AGT-TTT-CA-3'	Sensor
SEQ ID NO 23	REncfis_cHP2V1.3_5LC6	5'-TTT-TGA-TTC-TTT-TTA-CTT-CAA-TAT-CCA-GTT-TTC-3'	Sensor
SEQ ID NO 24	REncfis_cHP2V1_5LC6	5'-TTT-TGA-TTC-TTT-TTA-CTT-CAA-TAT-CCA-GTT-TTC-AAT-GAA-CGA-AT-4'	Sensor
SEQ ID NO 25	REncfis_cHP2V2_5LC6	5'-TTT-ACT-TCA-ATA-TCC-AGT-TTT-CAA-TGA-ACG-3'	Sensor

(continuación)			
SEQ ID NO	Nombre	Secuencia	Función preferida
SEQ ID NO 26	REncfis_cHP2V3_SLC6	5'-ATC-CAG-TTT-TCA-ATG-AAC-GAA-T-3'	Sensor
SEQ ID NO 27	REncdis_HP1_3FL	5'-GGA-ATA-TTA-CGG-AAA-TAC-ACA-TTT-CGT-C TT-T-3'	Sensor
SEQ ID NO 28	REncfis_HP2_3FL	5'-GAA-AAC-TGG-ATA-TTG-AAG-TAA-AAA-GAA-TCA-AAA-CA-3'	Sensor
SEQ ID NO 29	REnc6s_HP2V2_3FL	5'-CTG-GAT-ATT-GAA-GTA-AAA-AGA-ATC-AA-3'	Sensor
SEQ ID NO 30	REnc6s_HP2V3_3FL	5'-TTC-GTT-CAT-TGA-AAA-CTG-GAT-ATT-GAA-GTA-AA-3'	Sensor
SEQ ID NO 31	REncfis_HP2V4_3FL	5'-GTT-CAT-TGA-AAA-CTG-GAT-ATT-GAA-GTA-AA-3'	Sensor
SEQ ID NO 32	REncfis_HP2V6_3FL	5'-CAT-TGA-AAA-CTG-GAT-ATT-TGA-AGT-AAA-AAG-AA-3'	Sensor
SEQ ID NO 33	REncfis_HP2V7_3FL	5'-TGA-AAA-CTG-GAT-ATT-TGA-AGT-AAA-AAG-AA-3'	Sensor
SEQ ID NO 34	REncfis_HP2V6_3FL	5'-AAC-TGG-ATA-TTG-AAG-TAA-AAA-GAA-TC-3'	Sensor
SEQ ID NO 35	REncfis_HP2V9_3FL	5'-GGA-TAT-TGA-AGT-AAA-AAG-AAT-CAA-AAA-3'	Sensor
SEQ ID NO 36	REncfis_HP2V10_3FL	5'-CT-GGA-TAT-TGA-AGT-AAA-AAG-AAT-CAA-AAC-3'	Sensor
SEQ ID NO 37	REncfum_cHP2V1_5LC6	5'-TAT-TAC-TTA-CAT-TTA-CTT-CAA-ATA-TCC-A-3'	Sensor
SEQ ID NO 38	REncfum_eHP2V2_5LC6	5'-TTT-ACT-TCA-AAT-ATC-CAG-TTT-TCA-AT-3'	Sensor
SEQ ID NO 39	REncfum_cHP2V3_5LC6	5'-TAT-CCA-GTT-TTC-AAT-GAA-CAA-ATT-TAA-CAA-CTA-ATG-3'	Sensor
SEQ ID NO 40	REncfum_cHP2V3_5LC6	5'-TTT-ACT-TCA-AAT-ATC-CAG-TTT-TCA-ATG-AAC-3'	Sensor
SEQ ID NO 41	REncfum_cHP2V4_5LC6	5'-TTT-ACT-TCA-AAT-ATC-CAG-TTT-TCA-ATG-AAC-AA-3'	Sensor
SEQ ID NO 42	REncfum_cHP2V5_5LC6	5'-TAC-TTC-AAA-TAT-CCA-GTT-TTC-AAT-GAA-CAA-3'	Sensor
SEQ ID NO 43	REncfum_cHP2V6_5LC6	5'-CAT-TTA-CTT-CAA-ATA-TCC-AGT-TTT-CAA-TCA-ACA-AA-3'	Sensor
SEQ ID NO 44	REncfum_HP1_3FL	5'-AAT-ATT-ACG-AGA-ACT-ACA-CAA-TTT-GTT-TTT-3'	Sensor
SEQ ID NO 45	REncfum_HP2_3FL	5'-GGA-TAT-TTT-GAA-GTA-AAT-GTA-AGT-AAC-TAC-3'	Sensor
SEQ ID NO 46	REncfum_HP2V2_3FL	5'-TGG-ATA-TTT-GAA-GTA-AAT-GTA-AGT-AA-3'	Sensor
SEQ ID NO 47	REncfum_HP2V3_3FL	5'-GAT-ATT-TGA-AGT-AAA-TGT-AAG-TAA-3'	Sensor
SEQ ID NO 48	REncfum_HP2V4_3FL	5'-TTT-GTT-CAT-TGA-AAA-CTG-GAT-ATT-TGA-AGT-AAA-3'	Sensor
SEQ ID NO 49	REncfum_HP2V5_3FL	5'-GTT-CAT-TGA-AAA-CTGGAT-ATT-TGA-AGT-AAA-3'	Sensor

(continuación)			
SEQ ID NO	Nombre	Secuencia	Función preferida
SEQ ID NO 50	REncfum_HP2V6_3FL	5'-CAT-TGA-AAA-CTG-GAT-ATT-TGA-AGT-AAA-3'	Sensor
SEQ ID NO 51	REncfum_HP2V7_3FL	5'-TTT-GTT-CAT-TGA-AAA-CTG-GAT-ATT-3'	Sensor
SEQ ID NO 52	REncfum_HP2V8_3FL	5'-TGA-AAA-CTG-GAT-ATT-TGA-AGT-AAA-3'	Sensor
SEQ ID NO 53	REncfum_HP2V9_3FL	5'-GGA-TAT-TTG-AAG-TAA-ATGTAA-GT-3'	Sensor
SEQ ID NO 54	REncfum_HP2V10_3FL	5'-ATT-GAA-CTG-GAT-ATT-TGA-AGT-AAA-3'	Sensor
SEQ ID NO 55	REncfum_HP2V11_3FL	5'-ATT-TGA-AGT-AAA-TGT-AAG-TAA-TAC-3'	Sensor
SEQ ID NO 56	REncfum_HP2V12_3FL	5'-GAT-ATT-TGA-AGT-AAA-TGT-AAG-TAA-T-3'	Sensor
SEQ ID NO 57	REncfum_HP2V13_3FL	5'-TGA-AAA-CTG-GAT-ATT-TGA-TGT-AAA-TGT-AAG-TA-3'	Sensor
SEQ ID NO 58	REncfum_HP2V14_3FL	5'-GA-AAA-CTG-GAT-ATT-TGA-AGT-AAA-TGT-AAG-TA-3'	Sensor
SEQ ID NO 59	REncspe_cHP2V1_3FL	5'-TTC-AAC-GCG-GTG-TTC-TCG-GTT-T-3'	Anclaje
SEQ ID NO 60	REncspe_cHP2V2_3FL	5'-CAA-CGC-GGT-GTT-CTC-GGT-TTG-TTT-TGA-TTC-T-3'	Anclaje
SEQ ID NO 61	REncspe_cHP2V3_3FL	5'-TTC-AAC-GCG-GTG-TTC-TCG-GTT-TGT-ATT-ACT-TAC-ATT-TAC-TTC-AA-3'	Anclaje
SEQ ID NO 62	REncspe_cHP2V3_3FL	5'-ATT-CAA-CGC-GGT-GTT-CTC-GGT-TTG-TTT-TGA-TT-3'	Anclaje
SEQ ID NO 63	REncspe_cHP2V4_3FL	5'-ACG-CGG-TGT-TCT-CGG-TTT-GTT-TTG-ATT-3'	Anclaje
SEQ ID NO 64	REncspe_cHP2V5_3FL	5'-CAA-CGC-GGT-GTT-CTC-GGT-TTG-TTT-TGA-TT-3'	Anclaje
SEQ ID NO 65	REncspe_cHP2V6_3FL	5'-TTC-AAC-GCG-GTG-TTC-TCG-GTT-TGT-ATT-ACT-T-3'	Anclaje
SEQ ID NO 66	REncspe_HP1_5LC6	5'-TTT-GTT-CAG-TTT-TGA-GAG-GTT-TAC-TCT-CAA-3'	Anclaje
SEQ ID NO 67	REncspe_HP2_5LC8	5'-ACC-GAG-AAC-ACC-GCG-TTG-A-3'	Anclaje
SEQ ID NO 68	REncspe_HP2V2_5LC	5'-ACA-AAC-CGA-GAA-CAC-CGC-GTT-GAA-T-3'	Anclaje
SEQ ID NO 69	REncspe_HP2V3_5LC	5'-ACA-AAC-CGA-GAA-CAC-GGC-GTT-GAA-T-3'	Anclaje
SEQ ID NO 70	REncspe_HP2V4_5LC	5'-AGA-ATC-AAA-ACA-AAC-CGA-GAA-CAC-CGC-GTT-G-3'	Anclaje
SEQ ID NO 71	REncspe_HP2V5_5LC	5'-AAT-CAA-AAC-AAA-CCG-AGA-ACA-CCG-CGT-TGA-AT-3'	Anclaje
SEQ ID NO 72	REncspe_HP2V6_5LC	5'-ACA-AAC-CGA-GAA-CAC-CGC-GTT-3'	Anclaje
SEQ ID NO 73	REncspe_HP2V7_5LC	5'-ACC-GAG-AAC-GCG-TTG-AAT-3'	Anclaje
SEQ ID NO 74	REncspe_HP2V8_5LC	5'-ACC-GAG-AAC-ACC-GCG-TTG-AAT-3'	Anclaje

(continuación)			
SEQ ID NO	Nombre	Secuencia	Función preferida
SEQ ID NO 75	REncfs_HP2V11_3FL	5'-AC-TGG-ATA-TTG-AAG-TAA-AAA-GAA-TCA-AAA-3'	Sensor
SEQ ID NO 76	REncfs_HP2V12_3FL	5'-AAC-TGG-ATA-TTG-AAG-TAA-AAA-GAA-TCA-AAA-3'	Sensor
SEQ ID NO 77	REncfs_HP2V13_3FL	5'-A-AAC-TGG-ATA-TTC-AAG-TAA-AAA-GAA-TCA-AAA-3'	Sensor
SEQ ID NO 78	REncfs_HP2V14_3FL	5'-CT-GGC-TAT-TGA-AGT-AAA-AAG-AAT-CAA-AAC-3'	Sensor
SEQ ID NO 79	REncfs_HP2V15_3FL	5'-CT-GGA-TcT TGA-AGT-AAA-AAG-AAT-CAA-AAC-3'	Sensor
SEQ ID NO 80	REncfs_HP2V16_3FL	5'-A-AAC-TGG-cTA-TTG-AAG-TAA-AAA-GAA-TCA-AAA-3'	Sensor
SEQ ID NO 81	REncfum_HP2V15_3FL	5'-T-TGA-AGT-AAA-TGT-AAG-TAA-TAC-3'	Sensor
SEQ ID NO 82	REncfum_HP2V18_3FL	S'-GAT-cTT-TGA-AGT-AAA-TGT-AAG-TAA-T-3'	Sensor
SEQ ID NO 83	REncfum_HP2V17_3FL	5'-GAT-ATT-TGc-AGT-AAA-TGT-AAG-TAA-T-3'	Sensor
SEQ ID NO 84	REncspe_HP2VB_5LC6	5'-CC-GAG-AAC-ACC-GCG-TTG-AAT-GA-3'	Anclaje

CD: Cebador directo  
 CI: Cebador inverso  
 La función indicada es, de hecho, la función preferida.

**Tabla 2**

CD/CI	SEQ ID NO 12	SEQ ID NO 13	SEQ ID NO 14	SEQ ID NO 15	SEQ ID NO 16	SEQ ID NO 17	SEQ ID NO 18	SEQ ID NO 19	SEQ ID NO 20	SEQ ID NO 21
SEQ ID NO 3		2	4	7						22
SEQ ID NO 4						10	14	18		23
SEQ ID NO 5						11	15	19		24
SEQ ID NO 6						12	16	20		25
SEQ ID NO 7									21	
SEQ ID NO 8			5							
SEQ ID NO 9										26
SEQ ID NO 10										27
SEQ ID NO 11	1	3	6	8	9	13	17	29		28

CD: Cebadores directos  
 CI: Cebador inverso  
 Se prefieren los pares cebadores indicados.

**Tabla 3**

<b>SEQ ID NO</b>	<b>Combinación de cebadores</b>	<b>Rendimiento en las condiciones particulares de los ejemplos</b>
28/-67	28	+
-/45/67	28	+
29/-68	28	+++
-/46/68	28	++
-/47/68	28	++
29/46/68	28	+
28/47/68	28	+
-/48/69	15	+
-/48/69	28	+
-/49/69	28	+
-/50/69	15	+
-/50/69	28	++
30/-69	28	++
30/-69	15	++
31/-69	28	++
30/-70	15	++
31/-70	15	++
30/-71	15	++

ES 2 372 048 T3

(continuación)		
<b>SEQ ID NO</b>	<b>Combinación de cebadores</b>	<b>Rendimiento en las condiciones particulares de los ejemplos</b>
31/-71	15	++
32/-69	21	++
33/-69	21	+
34/-69	21	+++
-/48/70	15	+
-/49/70	15	+
-/50/70	15	+
-/48/71	15	+
-/49/71	15	+
-/50/71	15	+
-/53/69	21	+++
32/53/69	21	+
-/53/72	21	+++
34/53/72	21	+
35/-73	21	+++
-/55/73	21	+++
-/56/73	21	+++
35/55/73	21	++
36/56/73	15	+++
29/-73	15	+
35/-73	15	+
36/-73	15	+
75/-73	15	+
76/-73	15	+
-/46/73	15	+
-/47/73	15	++
-/53/73	15	++
-/55/73	15	++
-/56/73	15	++
35/56/73	15	++
77/-73	15	++
78/-73	15	++
79/-73	15	++
-/81/73	15	++
-/82/73	15	+++
-/83/73	15	+
36/-84	15	++
36/82/73	15	+++

Tabla 4

<b>Enterococcus</b>		
Especie	Relevancia clínica	Examinada en el estudio
<i>E. asini</i>	-	-
<i>E. avium</i>	+	+
<i>E. azikeevi</i>	-	-
<i>E. casseliflavus</i>	++	+
<i>E. cecorum</i>	+	+
<i>E. columbae</i>	+	+
<i>E. dispar</i>	-	-
<i>E. durans</i>	+	+
<i>E. faecalis</i>	++++	+
<i>E. faecium</i>	+++	+
<i>E. flavescens</i>	+	-
<i>E. gallinarum</i>	++	+
<i>E. haemoperoxidus</i>	-	-
<i>E. hirae</i>	+	+
<i>E. malodoratus</i>	+	+
<i>E. moraviensis</i>	-	-
<i>E. mundtii</i>	+	+
<i>E. phoeniculicola</i>	-	-
<i>E. pseudoavium</i>	+	-
<i>E. porcinus</i>	-	-
<i>E. raffinosus</i>	+	+
<i>E. ratti</i>	-	-
<i>E. rottae</i>	-	-
<i>E. saccharolyticus</i>	-	-
<i>E. solitarius</i>	-	-
<i>E. sulfureus</i>	-	-
<i>E. villorum</i>	-	-
Sin nombre	- (?)	-

## 5 EJEMPLOS

El método empleado en los ejemplos es un método para la detección de *Enterococci*, en particular de *E. faecalis* y/o *E. faecium*, que emplea el sistema HybProbe constituido por dos sondas marcadas con fluoresceína de SEQ ID NO 36 y 56, que actúan como sensor, y una sonda marcada con LC-Red de SEQ ID NO 73 como anclaje, combinadas con un par cebador del género *Enterococcus* de SEQ ID NO 5 y 1,8.

En total, se empleó una colección de 162 bacterias aisladas constituida por:

- 56 *Enterococcus faecalis* aislados,
- 50 *Enterococcus faecium* aislados,

- 56 cepas de diferentes microorganismos.

5 Cuando las bacterias aisladas no dieron los resultados esperados, se volvió a genotipificar el ADN<sub>g</sub> mediante PCR con ARNt (Vaneechoutte, M. *et al.*, 1998, *Int J. Syst. Bacteriol.* (48) 127-139) y/o se volvió a genotipificar el cultivo mediante ApiSTREP (Biomérieux).

El instrumento consiste en un LightCycler™ (versión 1.2) equipado con el software adecuado (software LC versión 3.5), que permite la detección de PCR por fluorescencia a tiempo real.

## 10 **Ejemplo 1: Preparación de las muestras que se van a analizar**

### 1/. ADN de cultivos puros

Para extraer el ADN de cultivos puros, se pueden emplear diferentes métodos de purificación:

- 15
- La lisis con lisostafina (5 µg/µl) durante 1 h a 37 °C y la purificación con el kit de aislamiento de ADN sanguíneo QIAamp (Qiagen).
  - El método de Pitcher *et al.* (1989).
  - El kit de aislamiento de ADN III MagNAPure LC (bacterias, hongos) en el instrumento MagNAPure. Las células bacterianas cultivadas durante toda la noche en tubos de cultivo inclinados o placas LB se suspendieron en de 100 a 1000 µl de TE a pH 8 para almacenarlas a -20 °C. Se emplearon de 2 µl a 20 µl para la extracción, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.
- 20
- El mini kit de ADN QIAamp (N.º de catálogo 51306 - QIAGEN). El cultivo se trató enzimáticamente con anterioridad empleando lisozima y lisostafina.

### 2/. ADN de botellas de cultivos sanguíneos positivos

25 Se inocularon muestras sanguíneas en botellas de cultivos sanguíneos aeróbicos (BacT/ALERT FA) y se incubaron en un sistema BacT/Alert 3D (Organon Teknika) a 37 °C hasta que dieron un resultado positivo. La obtención de un resultado positivo se monitorizó mediante un cambio de color de verde oscuro a amarillo.

30 Se congelaron alícuotas (1.5 ml) de los cultivos sanguíneos a -70 °C hasta el momento de utilizarlas.

El ADN genómico se preparó según se describe en las instrucciones de uso del kit de aislamiento de ADN III MPLC. Según se recomienda para las botellas de cultivos sanguíneos de Organon Teknika, antes de la PCR, el eluato se centrifugó durante 10 segundos a 14 000 rpm para que las partículas de carbón extraídas se depositaran en el fondo.

35

## **Ejemplo 2: Protocolo para LightCycler (LC)**

40 Siguiendo las instrucciones del fabricante del kit de sondas de hibridación LC-FastStart DNA Master (N.º de catálogo 3 003 248 o N.º 2 239 272):

- se puede emplear cualquier material de muestra adecuado para PCR en cuanto a la pureza, concentración y ausencia de inhibidores;
  - los cebadores deben estar presentes con una concentración final de 0.3 a 1 µM, para cada uno de ellos;
  - las HybProbes deben tener una concentración final de 0.2 µM cada una, o el doble;
  - la concentración de MgCl<sub>2</sub> se tiene que optimizar y puede variar entre 1 y 5 mM;
  - se debe realizar un control negativo.
- 45

Las condiciones de fusión y amplificación se describen a continuación en la presente. Se empleó el software LC versión 3.5. Los parámetros de cuantificación fueron F2/back F1 (muestras). Para el ajuste de la línea base, se empleó el modo aritmético. El cálculo del punto de corte (Ct) se basa en el máximo de la segunda derivada. El método de cálculo para el pico de fusión fue polinomial. Se empleó el área del pico para calcular la T<sub>m</sub>.

50

Programa de la curva de fusión y amplificación:

	Temperatura (°C)	Tiempo de retención	Pendiente (°C/s)	Modo de adquisición	
45x {	Desnaturalización	95	10 min	20	ninguno
	Ciclos	95	10 s	20	ninguno
		50	15 s	20	único
		72	10 s	20	ninguno
	Fusión	95	60 s	20	ninguno
		40	60 s	20	ninguno
80		0 s	0.1	continuo	
Enfriamiento	30	0 s	20	ninguno	

**Ejemplo 3: Resultados para el ADN purificado, ensayos de inclusión y reactividad cruzada**

5 1/. Inclusión

Se examinaron un total de 47 bacterias aisladas, que se recibieron como *E. faecalis*. Todas ellas proporcionaron curvas de cuantificación (intervalo de Ct: 15.5-28.4) y 44 de ellas presentaron picos de fusión a alrededor de 58 °C (intervalo de Tm: 57.4 °C - 58.3 °C, Tm media = 57.9 °C).

Tres de las 47 bacterias aisladas recibidas como *E. faecalis* reaccionaron como *E. faecium* en el ensayo, ya que proporcionaron picos de fusión a alrededor de 53 °C. Los resultados con estas 3 bacterias aisladas se confirmaron empleando técnicas de identificación bioquímicas (Api 20Strep, Biomerieux) y análisis de PCR con ARNt.

De las 40 bacterias aisladas recibidas como *E. faecium*, 37 proporcionaron curvas de cuantificación (intervalo de Ct: 17.9-29.5), de las cuales 33 presentaron picos de fusión a alrededor de 53 °C (intervalo de Tm: 51.9 °C - 53.2 °C, Tm media = 52.7 °C).

Las 7 bacterias aisladas restantes reaccionaron de la siguiente manera:

- Una bacteria aislada presentó un pico doble, uno para *E. faecalis* y otro para *E. faecium*.
- Tres bacterias aisladas reaccionaron como *E. faecalis*, con un pico de fusión a alrededor de 58 °C.
- Las otras tres bacterias aisladas no proporcionaron curvas de amplificación ni curvas de fusión, pero dieron un resultado positivo en la reacción sobre gel, por lo tanto, lo más probable es que pertenezcan al género *Enterococcus*, pero que no sean bacterias aisladas *E. faecalis* ni *E. faecium*.

Las muestras discrepantes se analizaron empleando técnicas de identificación bioquímicas (Api 20Strep, Biomerieux) y análisis de PCR con ARNt. Para las 7 muestras, se demostró que la identificación inicial no era correcta y, para 6 muestras, los resultados coincidieron con los resultados del ensayo.

30 2/. Reactividad cruzada

Se evaluaron más de 50 especies bacterianas diferentes (*Mycobacteria*, *Pseudomonas*, *Streptococci*, etc) y también algunos hongos. Ninguno de los organismos evaluados proporcionó curvas de cuantificación ni picos de fusión con el ensayo.

35 3/. Conclusión

Los resultados de los ensayos de inclusión y de pruebas cruzadas se resumen a continuación. Se puede concluir que todas las bacterias aisladas *E. faecium* y *E. faecalis* están debidamente identificadas y diferenciadas y que no tiene lugar reactividad cruzada.

Se detectan todas las bacterias aisladas *E. faecium* y/o *E. faecalis* investigadas (100% de sensibilidad) y se pueden distinguir inequívocamente de todas las demás bacterias aisladas estudiadas.

45

Resumen de los ensayos de sensibilidad y especificidad:

Taxón	N.º de cepas evaluadas	N.º de cepas con				
		Tm a 53 °C	Tm a 58 °C	Tm ≤ 45 °C	Pico doble a 53 °C y 58 °C	Sin pico
<i>E. faecalis</i>	47	3 <sup>(1)</sup>	44	0	0	0
<i>E. faecium</i>	40*	33	3 <sup>(2)</sup>	0	1 <sup>(4)</sup>	3 <sup>(3)</sup>
Lista de pruebas cruzadas	56	0	0	0	0	56
ADN humano	1	0	0	0	0	1
(1) <i>E. faecium</i> confirmado (2) <i>E. faecalis</i> confirmado (3) sin <i>E. faecalis</i> / <i>E. faecium</i> confirmado (4) segunda genotipificación: <i>E. faecalis</i>						

**Ejemplo 4: Resultados en cultivos sanguíneos**

5 Los 41 cultivos sanguíneos positivos proporcionaron un PCR positivo. En general, para botellas de cultivos sanguíneos positivos, el valor mínimo de Ct obtenido fue de 18 y el valor máximo de Ct fue de 25. Los valores de Tm fueron muy similares, alrededor de 58 °C para todas las bacterias aisladas *E. faecalis* y alrededor de 53 °C para las bacterias aisladas *E. faecium*.

10 En todos los cultivos sanguíneos excepto uno, se identificó el patógeno correcto: *E. faecalis* o *E. faecium*. Una botella con resultado positivo, que se suponía que contenía *E. faecium*, no proporcionó una curva de crecimiento, pero se observó un pico de fusión a 45 °C, que indica la presencia de bacterias aisladas *E. durans*. El análisis de la longitud del fragmento sobre gel después de amplificar la región de espaciadores por PCR universal, proporcionó un patrón típico de *E. durans* y claramente diferente de *E. faecium*.

15 Según se resume en la tabla a continuación, la composición del ensayo final se comportó de manera tal que:  
 - Se detectan todos los *E. faecalis* y *E. faecium* (Ct y curvas de fusión) y se diferencian de otros organismos, incluidos otros *Enterococci*.  
 20 - No se observan reactividades cruzadas con otros organismos de los muchos microorganismos diferentes evaluados ni con ADN humano.

F2/Back F1				RESULTADO
Ct	Pico por debajo de 50 °C	Pico a 53 °C	Pico a 58 °C	
+	-	+	-	<i>Enterococcus faecium</i>
+	-	+	-	
+	-	-	+	<i>Enterococcus faecalis</i>
+	-	-	+	
-	+	-	-	Algún <i>Enterococci</i> que no sea <i>E. faecalis</i> ni <i>E. faecium</i>
-	+	-	-	
-	-	-	-	Negativo
-	-	-	-	Inválido

**REIVINDICACIONES**

- 5       1. Un conjunto de dos o tres sondas de polinucleótidos, donde dichas sondas se hibridan específicamente con SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2, o con su forma de ARN, donde T se reemplaza por U, o con su forma complementaria, donde no hay más de 25 nucleótidos entre dichas sondas, para la identificación de *E. faecalis* y/o *E. faecium*, que consisten en SEQ ID NO 29 y 68; 34 y 69; 53 y 69; 53 y 72; 55 y 73; 56 y 73; 82 y 73; 36, 56 y 73; y 36, 82 y 73.
- 10       2. Una composición que comprende un conjunto de sondas de polinucleótidos según se ha definido en la reivindicación 1.
- 10       3. Un método para la detección y/o identificación de especies de *E. faecalis* y/o *E. faecium* en una muestra que comprende los pasos de:
- 15           (i) si resulta necesario, liberar, aislar y/o concentrar los ácidos polinucleicos en la muestra;
- 15           (ii) si resulta necesario, amplificar la región de espaciadores de ARNr 16S-23S, o un fragmento que comprenda la secuencia diana, o la secuencia diana o un fragmento de esta, con al menos un par cebador adecuado;
- 15           (iii) hibridar los ácidos polinucleicos del paso (i) o (ii) con el conjunto de sondas de polinucleótidos, según se define en la reivindicación 1;
- 20           (iv) detectar los híbridos formados, realizando un análisis de curva de fusión, y
- 20           (v) interpretar la(s) señal(es) obtenida(s) y deducir la presencia de especies de *E. faecalis* y/o *E. faecium* en la muestra.
- 25       4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, donde un par cebador adecuado está constituido por cualquier combinación de un polinucleótido cebador directo, seleccionado del grupo constituido por SEQ ID NO 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 y sus homólogas, y un polinucleótido cebador inverso, seleccionado del grupo constituido por SEQ ID NO 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ó 21 y sus homólogas.
- 25       5. Un kit para la detección y/o identificación de especies de *Enterococcus* que comprende los siguientes componentes:
- un conjunto de dos o tres sondas de polinucleótidos, según se ha definido en la reivindicación 1
  - un tampón de hibridación o los componentes necesarios para producir dicho tampón.