

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 403 587**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2007 E 07857150 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2013 EP 2118306**

54 Título: **Métodos de detección de S. aureus resistente a meticilina, así como cebadores, sondas y kits para los mismos**

30 Prioridad:

29.12.2006 US 882799 P
23.04.2007 EP 07008206

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.05.2013

73 Titular/es:

**MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION
AND RESEARCH (50.0%)**
200 First Street SW
Rochester, MN 55905 , US y
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (50.0%)

72 Inventor/es:

AICHINGER, CHRISTIAN;
REISER, ASTRID;
UHL, JAMES, R. y
COCKERILL, FRANKLIN, R.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 403 587 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de detección de *S. aureus* resistente a meticilina, así como cebadores, sondas y kits para los mismos

5 La presente invención se refiere a métodos de detección de la presencia o ausencia de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) en una muestra, comprendiendo el método la realización de una etapa de amplificación, una etapa de hibridación y una etapa de detección. Además, la presente invención se refiere a cebadores, sondas y kits para la detección de MRSA.

10 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, SA) es una bacteria cuyo reservorio natural son áreas mucosas o de piel húmeda/salada tales como ingles, ano o nariz. Además, habita en heridas. Globalmente, la nariz es el ambiente principal de *S. aureus*. Sin embargo, *S. aureus* puede provocar enfermedades que van desde infecciones menores de la piel (tales como máculas, forúnculos y celulitis) y abscesos, hasta enfermedades graves tales como neumonía, meningitis, endocarditis, síndrome del choque térmico (SCT), septicemia y síndrome de la disfunción multiorgánica (SDMO). Cada año, unos 500.000 pacientes en los hospitales estadounidenses contraen una infección estafilocócica.

Actualmente *S. aureus* ha adquirido resistencia a muchos antibióticos de uso general. En el Reino Unido, sólo 2% de todos los aislados de *S. aureus* son sensibles a la penicilina, y la situación es similar en el resto del mundo. Las penicilinas resistentes a β -lactamasa (meticilina, oxacilina, cloxacilina, flucloxacilina) han sido desarrolladas para tratar *S. aureus* resistente a penicilina y todavía se utilizan como tratamiento de primera línea. La meticilina fue el primer antibiótico de esta clase en ser utilizado (se introdujo en 1959), aunque sólo dos años después se informó del primer caso de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) en Inglaterra. SARM también se conoce como *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina (SARO) y *Staphylococcus aureus* de múltiple resistencia, mientras que las cepas no resistentes a meticilina de *S. aureus* en ocasiones se denominan *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina (SASM) en el caso de que resulte necesario realizar una distinción explícita.

A pesar de su resistencia, SARM seguía siendo una observación infrecuente incluso en el contexto hospitalario hasta los años '90, cuando la prevalencia de SARM se incrementó drásticamente en los hospitales, en donde ahora es endémica. Además, en los EEUU crecientemente se informan casos de brotes de colonización e infección por SARM por medio del contacto con la piel en vestuarios y gimnasios, incluso en poblaciones sanas. SARM también se está convirtiendo en un problema pediátrico (Johnson A.P. *et al.*, *J. Antimicrob. Chemother.* 56(3): 455-62). Desde principios de 2005 el número de muertes en el Reino Unido atribuidas a SARM ha sido estimado por diversas fuentes en aproximadamente 3.000 al año (Johnson, *supra*).

Las infecciones causadas por SARM muestran una tasa de letalidad más alta y síntomas más severos, ya que el tratamiento se encuentra restringido debido a las resistencias a unos pocos antibióticos. El tratamiento de primera línea para SARM actualmente son los antibióticos glucopéptidos (vancomicina y teicoplanina). Sin embargo, estos antibióticos presentan varios problemas, principalmente centrados en la necesidad de la administración intravenosa (no se dispone de preparación oral), la toxicidad y la necesidad de realizar un seguimiento de los niveles de fármaco regularmente mediante análisis de sangre. También es problemático que los antibióticos glucopéptidos no penetran muy bien en los tejidos infectados (éste es un problema particular con las infecciones del cerebro y las meninges y en la endocarditis). Sin embargo, los glucopéptidos no deben utilizarse para tratar *S. aureus* sensible a meticilina, ya que los resultados son peores. Conjuntamente, los pacientes infectados por SARM presentan estancias hospitalarias más prolongadas que los pacientes infectados meramente por SA.

Además, la colonización no identificada con SARM puede conducir al contagio de SARM de un paciente a otro mediante la sustitución con SARM de la flora de los pacientes no colonizados por SARM. La colonización resulta facilitada por determinados factores de riesgo, entre ellos, por ejemplo, el tratamiento antibiótico previo, la polimorbilidad y la diabetes, así como estancias hospitalarias anteriores.

A partir de lo anterior resulta altamente importante disponer de una herramienta segura y fiable para el diagnóstico y/o detección de SARM.

55 En la actualidad, el diagnóstico de la mayoría de infecciones de la piel se realiza a partir del patrón de síntomas y los resultados del examen físico, pero habitualmente no resulta posible saber si la infección está causada por bacterias *Staphylococcus* de un tipo particular o por otra bacteria, tal como, por ejemplo, *Streptococcus* β -hemolítico del grupo A (*Streptococcus pyogenes*). Para realizar un diagnóstico definitivo y para confirmar que SARM es la bacteria causante de la infección, puede llevarse a cabo un cultivo. Sin embargo, el diagnóstico de SARM mediante cultivo convencional requiere 16 a 72 horas, provocando un retraso en el tratamiento, perjudicando significativamente los resultados clínicos y potencialmente facilitando la incidencia de brotes, así como el incremento de los costes hospitalarios.

Los análisis fenotípicos, tales como de tipo coagulasa, de tipo enterotoxina (SE), producción de toxina 1 del síndrome del choque tóxico y susceptibilidad *in vitro* a antibióticos, han sido utilizados rutinariamente para el tipado de cepas de SARM.

Además, se ha establecido el análisis genotípico para las cepas de SARM, proporcionando una clasificación más detallada que los análisis fenotípicos. En particular, la electroforesis en gel de campo pulsado (EGCP) con fragmentos de restricción de ADN genómico total de SARM es un método excelente de caracterización.

Alternativamente, se ha utilizado la tipificación de secuencias multilocus (TSML) para caracterizar aislados de bacterias mediante la utilización de secuencias de fragmentos internos de siete genes de mantenimiento. Se ha desarrollado y validado la TSML para *S. aureus* (Enright *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 99: 7687-7692, 2002) y proporciona un método discriminatorio que permite identificar con facilidad cepas relacionadas que se han recuperado en países diferentes.

La patente EP nº 1529847 da a conocer un método para detectar SARM utilizando cebadores específicos para la unión situada a la derecha respecto a *SSC mec*.

Se han desarrollado kits de ensayo para detectar SARM (por ejemplo el ensayo IDI-MRSA, Becton Dickinson, USA), el cual es un ensayo diagnóstico *in vitro* para la detección directa de la colonización nasal por parte de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (SARM) para ayudar a prevenir y controlar las infecciones por SARM en el ámbito clínico.

Sin embargo, dicho kit presenta una serie de desventajas que limitan su utilidad. En primer lugar, no detecta el SARM del casete cromosómico estafilocócico (SCC) de tipo V, el cual resulta importante ya que SCC tipo V es un tipo identificado con anterioridad, especialmente presente en Asia y Australia. En segundo lugar, su aplicabilidad es limitada si el número de sondas es elevado. En tercer lugar, la preparación de las muestras es bastante complicada o resulta difícil. En cuarto lugar, el concepto utilizado para los controles no es del estado de la técnica. Además, la tasa de inhibición es bastante elevada y, finalmente, se requiere un número elevado de cebadores y sondas, resultando en una herramienta diagnóstica con tendencia a los errores. Además, el análisis de curvas de fusión que puede utilizarse en el ensayo de sondas FRET permite una especificidad más alta dentro de la señal de salida que con las curvas de amplificación. Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar un método alternativo para detectar el SARM, preferentemente un método alternativo que evita las desventajas anteriormente indicadas.

El objetivo de la presente invención se ha resuelto proporcionando un método para detectar la presencia o ausencia de *S. aureus* resistente a la metilina (SARM) en una muestra, comprendiendo el método:

- (a) la realización de una etapa de amplificación que comprende poner en contacto la muestra con un conjunto de cebadores de SARM con el fin de producir un producto de amplificación en el caso de que SARM se encuentre presente en la muestra,
- (b) la realización de una etapa de hibridación que comprende poner en contacto el producto de amplificación de la etapa (a) con una pareja de sondas de SARM, en la que una primera sonda de SARM de la pareja de sondas de SARM se marca con una fracción fluorescente donante y en la que una segunda sonda de SARM de la pareja de sondas de SARM se marca con una fracción fluorescente aceptora correspondiente, y
- (c) la detección de la presencia o ausencia de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) entre la fracción fluorescente donante de la primera sonda de SARM y la fracción fluorescente aceptora de la segunda sonda de SARM, en la que la presencia de FRET es indicativa de la presencia de SARM en la muestra, y en la que la ausencia de FRET es indicativa de la ausencia de SARM en la muestra,

en el que el método es capaz de detectar cada uno de los casetes cromosómicos estafilocócicos (*SSC mec*) tipos I a V del SARM, y en el que el conjunto de cebadores es tal como se define en la reivindicación 1 adjunta.

El método puede utilizarse para la detección rápida y fiable de SARM en una muestra. Particularmente, el método puede utilizarse para detectar SARM en una muestra o para diagnosticar una infección por SARM en un individuo, tal como un paciente.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la detección rápida de SARM mejora la situación de los pacientes que sufren SARM, por ejemplo mediante un tratamiento más precoz, evita los brotes de SARM mediante, por ejemplo, la aplicación rápida y estricta de precauciones de barrera para los pacientes colonizados o infectados por SARM en hospitales y, por lo tanto, reduce los costes sanitarios. Además, en realizaciones preferentes de la invención, puede utilizarse un número limitado de cebadores, por ejemplo 3 ó 4, con el fin de detectar elementos de todos los tipos de *SSC mec* actualmente conocidos, es decir, los tipos I, II, III, IV y V, lo que proporciona una herramienta altamente fiable para la detección del SARM.

Tal como se ha detallado anteriormente, el método de la presente invención resulta adecuado para la detección de SARM de todos los tipos conocidos de casete cromosómico estafilocócico (*SSC mec*), es decir, de los tipos I, II, III, IV y V. Esto resulta particularmente importante para seleccionar el tratamiento apropiado, por ejemplo para un paciente infectado por SARM.

Gen de resistencia a la meticilina (*mecA*). El gen *MecA* codifica una proteína de unión a la penicilina resistente a la meticilina (PBP2a ó PBP2'), una proteína de unión a la penicilina con afinidad reducida para los anillos β -lactamo (el sitio activo primario de los antibióticos β -lactamo, tales como las penicilinas, las cefalosporinas y los carbapenemos) (Guignard B. *et al.*, Curr. Opin. Pharmacol. 5(5): 479-89, 2005), que no se encuentra presente en las cepas susceptibles y que se cree que ha sido adquirida de una especie de parentesco lejano. El gen *MecA* se encuentra en un elemento genético móvil, el casete cromosómico estafilocócico *mec* (*SCCmec*) de las cepas de SARM, del que se han descrito cinco formas que difieren en tamaño y composición genética. Los elementos SCC también se encuentran en *S. aureus* sensible, pero no portan el gen *mecA* o portan un gen *mecA* no funcional. Dichas cepas son una fuente importante de resultados falsos positivos debido a que no presentan la misma unión en el extremo derecho.

Sin embargo, la detección de SARM a partir de un espécimen nasal mediante la detección del gen *mecA* y un gen específico de *S. aureus* conduce a valores predictivos positivos (VPP) bajos debido a la presencia de cantidades variables de estafilococos SA negativos para coagulasa tanto no resistentes como resistentes a la meticilina (SCoNRM). Una combinación de ellos resulta indistinguible de SARM debido a la presencia de ambas dianas. Dependiendo de la prevalencia de SARM, esta situación conduce hasta a 30% de resultados falsos positivos. Para un mejor VPP, la diana seleccionada debe ser única para SARM. La única diana conocida actualmente es el casete cromosómico estafilocócico (*SCCmec*), que amplifica el sitio de integración de trasposones para el elemento genético que porta el gen *mecA*.

SCCmec, el elemento SCC del SARM (con gen *mecA* funcional) es un trasposón que presenta una longitud de 16 a 67 kb integrado en la parte 3' del marco de lectura abierto X de *S. aureus* (*orfX*) que contiene el gen *mecA*. El gen *MecA* codifica PBP2a, que proporciona resistencia a la meticilina y sus derivados, así como a otros antibióticos. *OrfX* no presenta ninguna función definida en *S. aureus* y es único de SA. La integración de *SCCmec* crea una firma única para SARM.

Los elementos *SCCmec* presentan dos componentes esenciales: el complejo del gen *ccr* (*ccr*) y el complejo del gen *mec* (*mec*). El complejo del gen *ccr* está compuesto de genes *ccr* y marcos de lectura abiertos (ORF) circundantes, y el complejo del gen *mec* está compuesto del gen *mecA*, genes reguladores y secuencias de inserción cadena arriba o abajo de *mecA*. Se han encontrado varios alotipos de *mec* y *ccr* entre los elementos *SCCmec*, lo que ha conducido a la clasificación siguiente (Ito *et al.*, Antimicrob. Agents Chemother. 48: 2637-2651, 2004):

- *SCCmec* de tipo I, con *mec* de clase B y *ccr* de tipo 1,
- *SCCmec* de tipo II, con *mec* de clase A y *ccr* de tipo 2,
- *SCCmec* de tipo III, con *mec* de clase A y *ccr* de tipo 3,
- *SCCmec* de tipo IV, con *mec* de clase B y *ccr* de tipo 2, y
- *SCCmec* de tipo V, con *mec* de clase C2 y *ccr* de tipo 5.

Sin embargo, la clasificación de SARM y la asignación a *SCCmec* de tipos I a V es un enfoque fenotípico. Alternativamente, puede utilizarse un enfoque que utilice diferentes genotipos de SARM. Una diana para la detección y clasificación de SARM basada en el genotipo podría ser la unión en el extremo derecho (ED) de *SCCmec*. Este método alternativo de tipificación de SARM se denomina, por lo tanto, tipificación ED (extremo derecho de *SCCmec*). Este método de tipificación aprovecha el polimorfismo en el extremo derecho de los ADN *SCCmec* situados contiguamente al sitio de integración entre los tres tipos de *SCCmec*. Basándose en las secuencias de ácidos nucleicos de SEC ID nº 78 a nº 85, el SARM puede clasificarse de la manera siguiente:

RE2 Tipo A (GenBank gi|73537130|gb|DQ106887.1|; SEC ID nº 78)

```
TTTGCTTCACTATAAGTATTCAGTATAAAGAATATTTGCTATTATTTACTTGAAATGAAA
GACTGCGGAGGCTAACTATGTCAAAAATCATGAACCTCATTACTTATGATAAGCTTCTTAA
AACATAACAGCAATTCACATAAACCTCATATGTTCTGATACATTCAAATCCCTTTATGA
AGCGGCTGAAAAAACCGCATCATTTGATATGCTTCTTAAAAACATAACAGCAATTCACATA
AACCTCATATGTTCTGATACATTCAAATCCCTTTATGAAGCGGCTGAAAAAACCGCATCA
TTTATGATATGCTTCTCCACGCATAATCTTAAATGCTCTATACACTTGCTCAATTAACACA
ACCCGCATCATTTGATGTGGGAATGTCATTTTGCTGAATGATAGTGCGTAGTTACTGCGTT
GTAAGACGTCCTTGTGCAGGCCGTTTGATCCGCCAATGACGAATACAAAGTCGCTTTGCC
TTGGGTCATGCGTTGGTTCAATCCTTGGCCAATCCTTCGGAAGATAGCATCTTTCCTTGT
ATTTCTAATGTAATGACTGTGGATTGTGGTTTAAATTTTGCTAGTATTCGTTGGCCTTCTT
TTTCTTTTACTTGCTCAATTTCTTTGTGCTCA
```

RE2 Tipo_B (GenBank gi|73537130|gb|DQ106887.1|; SEC ID nº 79)

TTTGCTTCACTATAAGTATTCAGTATAAAGAATATTTTCGCTATTATTTACTTGAAATGAAA
GACTGCGGAGGCTAACTATGTCAAAAATCATGAACCTCATTACTTATGATAAGCTTCTTAA
AACATAACAGCAATTACATAAACCTCATATGTTCTGATACATTCAAATCCCTTTATGA
AGCGGCTGAAAAACCGCATCATTTATGATATGCTTCTCCACGCATAATCTTAAATGCTCT
ATACACTTGCTCAATTAACACAACCCGCATCATTTGATGTGGGAATGTCATTTTGCTGAAT
GATAGTGCCTAGTTACTGCGTTGTAAGACGTCCTTGTGCAGGCCGTTTGATCCGCCAATGA
CGAATACAAAGTCGCTTTGCCCTTGGGTCATGCGTTGGTTCAATTCTTGGGCCAATCCTTC
GGAAGATAGCATCTTTCCTTGTATTTCTAATGTAATGACTGTGGATTGTGGTTTAATTTTG
GCTAGTATTCGTTGGCCTTCTTTTT

RE2 Tipo_C (GenBank gi|57284222|gb|CP000046.1|; SEC ID nº 80)

TTTGCTTCACTATAAGTATTCAGTATAAAGAATATTTTCGCTATTATTTACTTGAAATGAAA
GACTGCGGAGGCTAACTATGTCAAAAATCATGAACCTCATTACTTATGATAAGCTTCTCCA
CGCATAATCTTAAATGCTCTATACACTTGCTCAATTAACACAACCCGCATCATTTGATGTG
GGAATGTCATTTTGCTGAATGATAGTGCCTAGTTACTGCGTTGTAAGACGTCCTTGTGCAG
GCCGTTTGATCCGCCAATGACGAATACAAAGTCGCTTTGCCCTTGGGTCATGCGTTGGTTC
AATTCTTGGGCCAATCCTTCGGAAGATAGCATCTTTCCTTGTATTTCTAATGTAATGACTG
TGGATTGTGGTTTAATTTTGCTAGTATTCGTTGGCCTTCTTTTT

5

RE3 (GenBank gi|23451317|gb|AF422696.1|; SEC ID nº 81)

CATTCTTCTTGATTCCATTAGTTTAAATTTAAAATTTNTCATAACAATTTCTTAATTTAAT
TGTAAGTCCATAATCAATATAAATTTGTACAGTTATTATATATTCTAGATCATCAATAGTTG
AAAAATGGTTTATTAAACACTCTATAAACATCGTATGATATTGCAAGGTATAATCCAATAT
TTCATATATGTAATTCCTCCACATCTCATTAAATTTTAAATTATACACAACCTAATTTTT
AGTTTTATTTATGATACGCTTCTCCACGCATAATCTTAAATGCTCTGTACACTTGTTCAAT
TAACACAACCCGCATCATTTGATGTGGGAATGTCATTTTGCTGAATGATAGTGCCTAGTTA
CTGCGTTGTAAGACGTCCTTGTGCAGGCCGTTTGATCCGCCAATGACGAATACAAAGTCGC
TTTGCCCTTGGGTCATGCGTTGGTTCAATTCTTGGGCCAATCCTTCGGAAGATAGCATCTT
TCCTTGTATTTCTAATGTAATGACTGTTGATTGTGGTTTGAATTTGGCTAGTATTCGTTGG
CCTTCTTTTTCTTTACTTGCTCAATTTGCTTTGTCGTCTCATATT

10

RE4 (GenBank AY267374.; SEC ID nº 82)

TCCATCTCTACTTTATTGTTTTCTTCAAATATTATCTCGTAATTTACCTTGTTTCATTAAAC
AAAAACTGGATAAAAAACCGCATCATTTGTGGTACGCTTCTCCACGCATAATCTTAAATG
CTCTGTACACTTGTTCAATTAACACAACCCGCATCATTTGATGTGGGAATGTCATTTTGCT
GAATGATAGTGCCTAGTTACTGCGTTGTAAGACGTCCTTGTGCAGGCCGTTTGATCCGCCA
ATGACGAATACAAAGTCGCTTTGCCCTTGGGTCATGCGTTGGTTCAATTCTTGGGCCAATC
CTTCGGAAGATAGCATCTTTCCTTGTATTTCTAATGTAATGACTGTTGATTGTGGTTTGA
TTTGGCTAGTATTCGTTGGCCT

15

RE5 (GenBank AY267381; SEC ID nº 83)

AGATGCCTATAAACTAACAAATTACAAATTATTATTTTGTGTTTACATTATAATATATCAA
CTAGAATTAATTTCTTAATAAAAAGTAATCATTAAAATTTAATAAACTCTGCTTTATATTAT
AAAATTACGGCTGAAATAACCGCATCATTTATGATATGCTTCTCCTCGCATAATCTTAAAT
GCTCTATACACTTGTTCAATTAACACAACCCGCATCATTTGATGTGGGAATGTCATTTTGC
TGAATGATAGTGCCTAGTTACTGCGTTGTAAGACGTCCTTGTGCAGGCCGTTTGATCCGCC
AATAACGAATACAAAGTCGCTTTGCCCTTGGGTCATGCGTTGGTTCAATTCTTGGGCCAAT
CCTTCGGAAGATAGCATCTTTCCTTGTATTTCTAATGTAATGACTGTGGATTGTGGTTTGA
TTTTGGCTAGTATTCGTTGGCCTTCTTTTTCTTTTACTTGCTCGATTTCTTT

20

RE6 (GenBank AY267375; SEC ID nº 84)

AAAAAGAAGTCGATTTACACACCATGTATTAATAATGGAAATTCTTAATCTTTACTTGTA
 CCTAAATTATCAAACCTTAATATTCACCTTTTTATTCTTCAAAGATTTGAGCTAATTTAATAA
 TTTTCTCATATTTTTTAGTTTTATTTGTGGTACGCTTCTCCTCGCATAATCTTAAATGCTC
 TATACACTTGTTCAATTAACACAACCCGCATCATTTGATGTGGGAATGTCATTTTGCTGAA
 TGATAGTGCCTAGTTACTGCGTTGTAAGACGTCCTTGTGCAGGCCGTTTGATCCGCCAATA
 ACGAATACAAAGTCGCTTTGCCCTTGGGTCATGCGTTGGTTCAATTCTTGGGCCAATCCTT
 CGGAAGATAGCATCTTTCCTTGTATTTCTAATGTAATGACTGTGGATTGTGGTTTGATTTT
 GGCTAGTATTCGTTGGCCTTCTTTTTCTTTACTTGCTCGATTTCTTT

RE7 (GenBank gi|49257031|dbj|AB121219.1|; SEC ID nº 85)

CAAAAATATATTTACTTTAGTCAAATCATCTTCACTAGTGTAATTATCGAATGATTTATA
 ACTAACATTTTCTAATTTATTTAACATAAAAATCAATCCTTTTTTATATTTAAAATATATTAT
 ACACAATCCGTTTTTTTAGTTTTATTTATGATACGCCTCTCCACGCATAATCTTAAATGCTC
 TATACACTTGTTCAATTAACACAACCCGCATCATTTGATGTGGGAATGTCATTTTGCTAAA
 TGATAGTGCATAGTTACTGCGTTGTAAGACGTCCTTGTGCAGGCCGTTTGATCCGCCAATG
 ACGAATACAAAGTCGCTTTGCCCTTGGGTCATGCGTTGGTTCAATTCTTGGGCCAATCCTT
 CGGAAGATAGCATCTTTCCTTGTATTTCTAATGTAATGACTGTGGATTGTGGTTTGATTTT
 GGCTAGTATTCGTTGGCCTTCTTTTTCTTTACTTGCTCAATTTCTTTGT

Tal como se ha detallado anteriormente, los tipos de ED describen variaciones de secuencia de la unión del extremo derecho del trasposón *SCCmec*. RE2 constituye la mayor parte de los tipos de ED (representando los tipos I, II, III (algunos) y algunos IV de *SCCmec*). RE3 y RE7 representan los tipos III y V de *SCCmec* y tipo V de *SCCmec*, respectivamente.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, se dan a conocer en la presente memoria conjuntos particulares de cebadores utilizados para proporcionar la detección de todos los tipos de *SCCmec*. El conjunto de cebadores puede comprender:

(i) un cebador específico para SARM de tipo RE2, particularmente un cebador que comprende o que consiste de una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada de entre el grupo que consiste de:

- 5'-GCA ATT CAC ATA AAC CTC ATA TGT TC -3' (AR *mec1* sentido; SEC ID nº 1),
- 5'-ACC TCA TAT GTT CTG ATA CAT TCA -3' (AR *mec2* sentido; SEC ID nº 2),
- 5'-GCA ATT CAC ATA AAC CTC ATA T -3' (AR *mec3* sentido; SEC ID nº 3),
- 5'-CAT AAC AGC AAT TCA CAT AAA CCT C -3' (AR *mec4* sentido; SEC ID nº 4),
- 5'-TAA CAG CAA TTC ACA TAA ACC T -3' (AR *mec5* sentido; SEC ID nº 5),
- 5'-CGC TAT TAT TTA CTT GAA ATG AAA GAC -3' (AR *mec6* sentido; SEC ID nº 6),
- 5'-CTT GAA ATG AAA GAC TGC GGA -3' (AR *mec7* sentido; SEC ID nº 7),
- 5'-TTG CTT CAC TAT AAG TAT TCA GTA TAA AGA -3' (AR *mec8* sentido; SEC ID nº 8),
- 5'-ATT TAC TTG AAA TGA AAG ACT GCG -3' (AR *mec9* sentido; SEC ID nº 9),
- 5'-AAA GAA TAT TTC GCT ATT ATT TAC TTG AA -3' (AR *mec10* sentido; SEC ID nº 10),
- 5'-TCA GTA TAA AGA ATA TTT CGC TAT TAT TT -3' (AR *mec11* sentido; SEC ID nº 11),
- 5'-TGA AAT GAA AGA CTG CGG AG -3' (AR *mec12* sentido; SEC ID nº 12),
- 5'-AAC CTC ATA TGT TCT GAT ACA TTC AAA -3' (JU1 sentido; SEC ID nº 13),
- 5'-TAT GTC AAA AAT CAT GAA CCT CAT TAC T -3' (JU2 sentido; SEC ID nº 14),
- 5'-CAT AAC AGC AAT TCA CAT AAA CCT C -3' (JU3 sentido; SEC ID nº 15),
- 5'-GAC TGC GGA GGC TAA CT -3' (JU4 sentido; SEC ID nº 16),
- 5'-ATC CCT TTA TGA AGC GGC -3' (JU5 sentido; SEC ID nº 17), y
- 5'-TGA AAT GAA AGA CTG CGG AG -3' (SARM directo RE2 sentido; SEC ID nº 92),

especialmente AR *mec11* sentido o AR *mec12* sentido o SARM directo RE2 sentido, particularmente SARM directo RE2 sentido, y/o

(ii) un cebador específico para SARM de tipo RE3, particularmente un cebador que comprende o que consiste de una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada de entre el grupo que consiste de:

- 5'-GCA AGG TAT AAT CCA ATA TTT CAT ATA TGT -3' (AR *mecA 3/1*; SEC ID nº 18),
- 5'-AGT TCC ATA ATC AAT ATA ATT TGT ACA GT -3' (AR *mecA 3/2*; SEC ID nº 19),
- 5'-ACA TCG TAT GAT ATT GCA AGG TA -3' (AR *mecA 3/3*; SEC ID nº 20),
- 5'-CTT TCA TTC TTT CTT GAT TCC ATT AG -3' (AR *mecA 3/4*; SEC ID nº 21),
- 5'-CAC TCT ATA AAC ATC GTA TGA TAT TGC -3' (AR *mecA 3/5*; SEC ID nº 22),
- 5'-TTC TTA ATT TAA TTG TAG TTC CAT AAT CAA -3' (AR *mecA 3/6*; SEC ID nº 23),

- 5'-AAT TAT ACA CAA CCT AAT TTT TAG TTT TAT -3' (AR *mecA* 3/7; SEC ID nº 24),
- 5'-AAT TTT TAG TTT TAT TTA TGA TAC GCT TC -3' (AR *mecA* 3/8; SEC ID nº 25),
- 5'-ACA CAA CCT AAT TTT TAG TTT TAT TTA TGA -3' (AR *mecA* 3/9; SEC ID nº 26),
- 5'-TTT ATT AAA CAC TCT ATA AAC ATC GTA TGA -3' (AR *mecA* 3/10; SEC ID nº 27),
- 5 - 5'-CCA CAT CTC ATT AAA TTT TTA AAT TAT ACA C -3' (AR *mecA* 3/13 SEC ID nº 28), y
- 5'-CCA CAT CTC ATT AAA TTT TTA AAT TAT ACA C -3' (MRSA directo RE3 sentido; SEC ID nº 93),

especialmente AR *mecA* 3/8 ó AR *mecA* 3/1 ó SARM directo RE3 sentido, particularmente SARM directo RE3 sentido, y/o

10 (iii) un cebador específico para SARM de tipo RE7,

particularmente un cebador que comprende o que consiste de una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada de entre el grupo que consiste de:

- 5'-ATA TTA TAC ACA ATC CGT TTT TTA GTT TTA -3' (AR *mec* 5/1, SEC ID nº 29),
- 15 - 5'-ACA CAA TCC GTT TTT TAG TTT TAT TTA TG -3' (AR *mec* 5/2, SEC ID nº 30),
- 5'-TTC TAA TTT ATT TAA CAT AAA ATC AAT CCT -3' (AR *mec* 5/3, SEC ID nº 31),
- 5'-CAA TCC TTT TTA TAT TTA AAA TAT ATT ATA CAC -3' (AR *mec* 5/16 SEC ID nº 32), y
- 5'-CAA TCC TTT TTA TAT TTA AAA TAT ATT ATA CAC -3' (MRSA directo RE7 sentido; SEC ID nº 94),

20 especialmente AR *mec* 5/2 ó AR *mec* 5/16 ó SARM directo RE7 sentido, particularmente SARM directo RE7 sentido.

El término "cebador" se utiliza en la presente memoria tal como es conocido por el experto en la materia y se refiere a "compuesto oligomérico", principalmente a "oligonucleótido", aunque también a "oligonucleótidos modificados" que son capaces de "cebar la síntesis de ADN por parte de una ADN polimerasa dependiente de molde, es decir, el extremo 3' de, por ejemplo, un oligonucleótido, proporciona un grupo 3'-OH libre al que una ADN polimerasa dependiente de molde puede unir "nucleótidos" adicionales estableciendo enlaces 3' a 5' fosfodiéster, en el que se utilizan desoxinucleósidos trifosfato, liberando pirofosfato. Por lo tanto, no existe (excepto para la función deseada) ninguna diferencia fundamental entre un "cebador", un "oligonucleótido" o una "sonda" según la invención.

30 En la invención, el conjunto de cebadores consiste de un cebador específico para SARM de tipo RE2, un cebador específico para SARM de tipo RE3 y un cebador específico para SARM de tipo RE7, en el que los cebadores para SARM de tipo RE2, para SARM de tipo RE3 y para SARM de tipo RE7 consisten de las secuencias SEC ID nº 92, SEC ID nº 93 y SEC ID nº 94, respectivamente. Se dan a conocer además conjuntos en los que los cebadores para SARM de tipo RE2, para SARM de tipo RE3 y para SARM de tipo RE7 comprenden o consisten de las secuencias de nucleótidos SEC ID nº 11, SEC ID nº 25 y SEC ID nº 30, respectivamente, o en las que los cebadores para SARM de tipo RE2, para SARM de tipo RE3 y para SARM de tipo RE7 comprenden o consisten de las secuencias de nucleótidos SEC ID nº 12, SEC ID nº 28 y SEC ID nº 32, respectivamente.

40 En una realización preferente de la invención, el conjunto de cebadores comprende además un cebador adicional específico para *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM), así como *S. aureus* sensible a la meticilina (SASM) (cebador para SARM/SASM). Los ejemplos de dicho cebador se seleccionan de entre el grupo de cebadores que comprende o que consiste de la secuencia de ácidos nucleicos seleccionada de entre el grupo que consiste de:

- 5'-AGG AAA GAT GCT ATC TTC CGA -3' (AR *mec* 1 inv., SEC ID nº 33),
- 45 - 5'-GAA AGA TGC TAT CTT CCG AAG -3' (AR *mec* 2 inv., SEC ID nº 34),
- 5'-GAT GCT ATC TTC CGA AGG -3' (AR *mec* 3 inv., SEC ID nº 35),
- 5'-GTC ATT ACA TTA GAA ATA CAA GGA AAG AT -3' (AR *mec* 4 inv., SEC ID nº 36),
- 5'-GCC AAC GAA TAC TAG CC -3' (AR *mec* 5 inv., SEC ID nº 37),
- 5'-ACG AAT ACT AGC CAA AAT TAA ACC -3' (AR *mec* 6-2 inv., SEC ID nº 38),
- 50 - 5'-CAC AAT CCA CAG TCA TTA CAT TAG A -3' (AR *mec* 7 inv., SEC ID nº 39),
- 5'-CAA GGA AAG ATG CTA TCT TCC G -3' (JU1 inv., SEC ID nº 40),
- 5'-AGT CAT TAC ATT AGA AAT ACA AGG AAA GA -3' (JU2 inv., SEC ID nº 41),
- 5'-AGGAAAGATGCTATCTTCCGA -3' (JU3 inv., SEC ID nº 42),
- 5'-AGG AAA GAT GCT ATC TTC CGA -3' (JU4 inv., SEC ID nº 43),
- 55 - 5'-ACA ATC CAC AGT CAT TAC ATT AGA A -3' (JU5 inv., SEC ID nº 44), y
- 5'-CAA GGA AAG ATG CTA TCT TCC G -3' (SARM directo inv.; SEC ID nº 95),

especialmente AR *mec* 6-2 inv. o JU1 inv. o SARM directo inv., particularmente SARM directo inv.

60 Tal como se ha detallado anteriormente, es un objetivo de la presente invención proporcionar una herramienta altamente fiable para la detección de SARM. Con el fin de reducir la propensión a errores del método de la invención, puede restringirse el número de cebadores utilizado en el método. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en una realización preferente adicional de la invención el conjunto de cebadores consiste de como máximo 5, preferentemente como máximo 4 cebadores. Son ejemplos de dichos conjuntos dados a conocer en la presente memoria:

65

- un cebador específico para SARM de tipo RE2, un cebador específico para SARM de tipo RE3, y un cebador específico para SARM de tipo RE7, especialmente en el que uno, dos o tres de los cebadores se seleccionan de entre los ácidos nucleicos de secuencias SEC ID nº 1 a nº 32 y nº 92 a nº 94,
- 5 - un cebador específico para SARM de tipo RE2, un cebador específico para SARM de tipo RE3, y un cebador específico para SARM de tipo RE7, y un cebador específico para SARM, así como SASM (cebador para SARM/SASM), especialmente en el que uno, dos, tres o cuatro de los cebadores se seleccionan de entre los ácidos nucleicos de SEC ID nº 1 a nº 44 y nº 92 a nº 95, AR *mec* 11 sentido, AR *mecA* 3/8 y AR *mec* 5/2 y opcionalmente un cebador inverso,
- 10 - AR *mec* 12 sentido, AR *mecA* 3/13 y AR *mec* 5/16 y opcionalmente un cebador inverso,
- AR *mec* 11 sentido, AR *mecA* 3/8 y AR *mec* 3/2 y AR *mec* 6-2 inv.,
- AR *mec* 12 sentido, AR *mecA* 3/13, AR *mec* 5/16 y JU1 inv.,
- SARM directo RE2 sentido, SARM directo RE3 sentido y SARM directo RE7 sentido y opcionalmente un cebador inverso, o
- 15 - SARM directo RE2 sentido, SARM directo RE3 sentido, SARM directo RE7 sentido y SARM directo inv.

En otro aspecto dado a conocer, el cebador para RE2, RE3, RE7 y/o SARM/SAMS comprende o consiste de una variante funcionalmente activa de cualquiera de los cebadores de SEC ID nº 1 a nº 44 ó nº 92 a nº 95, opcionalmente comprendido en cualquiera de las combinaciones preferentes de cebadores particulares, tal como se ha detallado anteriormente.

20 Una variante funcionalmente activa de cualquiera de los cebadores de SEC ID nº 1 a nº 44 ó nº 92 a nº 95 puede identificarse mediante la utilización del cebador en el método de la exposición. Una variante funcionalmente activa de un cebador de cualquiera de SEC ID nº 1 a nº 44 ó nº 92 a nº 95 se refiere a un cebador que proporciona una especificidad y sensibilidad similares o más altas en el método o kit de la exposición que la secuencia respectiva de SEC ID nº 1 a nº 44 ó nº 92 a nº 95.

25 El término "especificidad" en un ensayo de clasificación binaria con respecto a una clase dada es la probabilidad de que el ensayo clasifique correctamente casos no pertenecientes a dicha clase. Es decir, es la proporción de verdaderos negativos de entre todos los casos negativos en la población. Es un parámetro del ensayo. En el presente caso, para la detección de SARM con el fin de determinar si se encuentra presente un SARM, la especificidad para la presencia de SARM es la probabilidad de que, si SARM se encuentra ausente, el ensayo sea negativo.

$$\text{especificidad} = \frac{\text{número de verdaderos negativos}}{\text{núm. de verdaderos negativos} + \text{núm. de falsos positivos}}$$

35 Por consiguiente, una especificidad de 100% significa que el ensayo reconoce todas las muestras positivas para SARM como positivas para SARM.

40 Una especificidad similar en el contexto de la presente invención se refiere a una especificidad que es como máximo 10%, preferentemente como máximo 5%, más preferentemente como máximo 4, 3, 2 ó 1% menor que la del cebador respectivo, en caso de que los cebadores (el cebador variante y correspondiente sin mutación) se sometan a ensayo en el método de la invención, preferentemente el método descrito en el Ejemplo 3.

45 El término "especificidad" en un ensayo de clasificación binaria con respecto a una clase dada es la probabilidad de que el ensayo clasifique correctamente casos no pertenecientes a dicha clase. Es decir, es la proporción de verdaderos positivos de entre todos los casos positivos en la población. Es un parámetro del ensayo. En el presente caso, para la detección de SARM con el fin de determinar si se encuentra presente un SARM, la sensibilidad a la presencia de SARM es la probabilidad de que, si SARM se encuentra presente, el ensayo sea positivo.

$$\text{sensibilidad} = \frac{\text{número de verdaderos positivos}}{\text{núm. de verdaderos positivos} + \text{núm. de falsos negativos}}$$

50 Una sensibilidad de 100% significa que el ensayo reconoce todas las personas enfermas como tales. En todos los casos resulta posible diseñar un ensayo trivial que alcance una sensibilidad del 100% al clasificar todos los casos de ensayo como positivos.

55 Una sensibilidad similar en el contexto de la presente invención se refiere a una sensibilidad que es como máximo 10%, preferentemente como máximo 5%, más preferentemente como máximo 4, 3, 2 ó 1% menor que la del cebador respectivo, en caso de que los cebadores (el cebador variante y correspondiente sin mutación) se sometan a ensayo en el método de la invención, preferentemente el método descrito en el Ejemplo 3.

60 En un aspecto preferente, el cebador comprende o consiste de una variante funcionalmente activa de cualquiera de los cebadores de SEC ID nº 1 a nº 44 ó nº 92 a nº 95, en el que:

(a) la variante funcionalmente activa es una parte funcionalmente activa de un cebador de SEC ID nº 1 a nº 44 ó nº 92 a nº 95, comprendiendo la parte por lo menos 70%, preferentemente por lo menos 80%, más preferentemente por lo menos 90%, todavía más preferentemente por lo menos 95% de cualquiera de las secuencias de SEC ID nº 1 a nº 44 ó nº 92 a nº 95,

(b) la variante funcionalmente activa es una variante funcionalmente activa que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 70%, preferentemente de por lo menos 80%, más preferentemente de por lo menos 90%, todavía más preferentemente de por lo menos 90%, todavía más preferentemente de por lo menos 95% respecto a cualquiera de las secuencias de SEC ID nº 1 a nº 44 ó nº 92 a nº 95,

(c) la variante funcionalmente activa es una sonda de SEC ID nº 1 a nº 44 ó nº 92 a nº 95, que comprende por lo menos un ácido nucleico químicamente modificado, y/o

(d) la variante funcionalmente activa es una parte funcionalmente activa complementaria a cualquiera de las secuencias de SEC ID nº 1 a nº 44 ó nº 92 a nº 95 ó una variante funcionalmente activa de (a), (b) y/o (c).

La parte del cebador puede obtenerse mediante delección terminal de nucleótidos (en el extremo 5' y/o en el extremo 3'). La identidad de secuencia puede determinarse mediante alineación de secuencias. Los métodos de alineación de secuencias para la comparación son bien conocidos de la técnica. Se han descrito diversos programas y algoritmos de alineación en, por ejemplo, Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482, 1981, o en Pearson y Lipman, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85: 2444-2448, 1988.

La herramienta de búsqueda de alineaciones locales básicas (BLAST) del NCBI (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410, 1990) se encuentra disponible de varias fuentes, incluyendo el National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD) y en Internet, para la utilización en relación con los programas de análisis de secuencias blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx. Las variantes de un cebador de cualquiera de los cebadores de SEC ID nº 1 a nº 44 ó nº 92 a nº 95 se caracterizan típicamente utilizando Blast 2.x del NCBI.

La variante puede variar, por ejemplo, respecto a la secuencia de SEC ID nº 1 a nº 44 ó nº 92 a nº 95 en una o más adiciones, delecciones o sustituciones de nucleótidos, particularmente una o más adiciones, delecciones o sustituciones de nucleótidos en el extremo 5' y/o 3' de la secuencia respectiva de SEC ID nº 1 a nº 44 ó nº 92 a nº 95.

Tal como se ha detallado anteriormente, el cebador (y/o la sonda) puede modificarse químicamente, es decir, el cebador y/o la sonda comprenden un nucleótido modificado o un compuesto no nucleótido. La sonda (o el cebador) en este caso es un oligonucleótido modificado. Los "nucleótidos modificados" (o "análogos de nucleótido") difieren de un "nucleótido" natural en alguna modificación, aunque todavía consisten de una base, un azúcar pentofuranosilo, una parte fosfato, de tipo base, una parte de tipo azúcar pentafricanosilo y una parte de tipo fosfato o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, puede unirse un "marcage" a la parte base de un "nucleótido", obteniendo de esta manera un "nucleótido modificado". También puede sustituirse una base natural en un "nucleótido" por, por ejemplo, una 7-desazapurina, de manera que también se obtiene un "nucleótido modificado". Las expresiones "nucleótido modificado" o "análogo de nucleótido" se utilizan intercambiamente en la presente solicitud. Un "nucleósido modificado" (o "análogo de nucleósido") difiere de un nucleósido natural en alguna modificación de la manera indicada de manera general anteriormente para un "nucleótido modificado" (o "análogo de nucleótido").

Un "oligonucleótido modificado" (o "análogo de oligonucleótido") pertenece a otro subgrupo específico de los "compuestos oligoméricos", que presenta uno o más "nucleótidos", uno o más "compuestos no nucleótidos" o "nucleótidos modificados" como "unidades monoméricas". De esta manera, la expresión "oligonucleótido modificado" (o "análogo de oligonucleótido") se refiere a estructuras que funcionan de una manera sustancialmente similar a "oligonucleótido" y se utilizan intercambiamente en la totalidad de la memoria. Desde un punto de vista sintético, un "oligonucleótido modificado" (o un "análogo de oligonucleótido") puede prepararse mediante, por ejemplo, modificación química de "oligonucleótidos" mediante modificación apropiada del esqueleto de fosfatos, unidades de ribosa o bases nucleotídicas (Uhlmann y Peyman, *Chemical Reviews* 90:543, 1990; Verma S. y Eckstein F., *Annu. Rev. Biochem.* 67:99-134, 1998). Entre las modificaciones representativas se incluyen fosforotioato, fosforoditoato, fosfonato de metilo, enlaces entre nucleósidos fosfotriéster o fosforamidato en lugar de enlaces entre nucleósidos fosfodiéster; purinas o pirimidinas deaza o aza en lugar de bases purinas y pirimidinas naturales, bases pirimidinas con grupos sustituyentes en la posición 5 ó 6, bases purinas con grupos sustituyentes alterados en las posiciones 2, 6 ó 8, o en la posición 7, tales como las 7-deazapurinas; azúcares que presentan grupos sustituyentes en, por ejemplo, su posición 2', o análogos de azúcares carbocíclicos o acíclicos. El experto en la materia conocerá otras modificaciones. Dichos "oligonucleótidos modificados" (o "análogos de oligonucleótidos") se describen mejor como funcionalmente intercambiables aunque estructuralmente diferentes de los "oligonucleótidos" naturales (o de "oligonucleótidos" sintéticos en líneas naturales). En más detalle, se dan a conocer modificaciones ejemplares en Verma S. y Eckstein F., *Annu. Rev. Biochem.* 67:99-134, 1998, o en el documento WO nº 02/12263. Además, puede realizarse una modificación en la que las unidades nucleósidos se unen mediante grupos que sustituyen los enlaces de fosfato o de azúcar-fosfato entre nucleósidos. Entre dichos enlaces se incluyen los dados a conocer en Verma S. y Eckstein F., *Annu. Rev. Biochem.* 67:99-134, 1998. En el caso de que se utilicen enlaces diferentes de los enlaces fosfato para unir las unidades nucleósido, dichas estructuras también se han descrito como "oligonucleósidos".

Sin embargo, pueden diseñarse cebadores alternativos que amplifican una molécula de ácidos nucleicos codificante

de SARM, por ejemplo ácidos nucleicos codificantes de partes alternativas de partes de RE2, RE3 ó RE7, utilizando, por ejemplo, un programa informático tal como OLIGO (Molecular Biology Insights Inc., Cascade, CO). Entre las características importantes durante el diseño de los oligonucleótidos que se utilizarán como cebadores de amplificación se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, un producto de amplificación de tamaño apropiado para facilitar la detección (por ejemplo mediante electroforesis), temperaturas de fusión similares para los miembros de una pareja de cebadores, y la longitud de cada cebador (es decir, los cebadores deben ser suficientemente largos para hibridarse con especificidad de secuencia y para iniciar la síntesis, pero no tan largos que se reduzca la fidelidad durante la síntesis de los oligonucleótidos). Típicamente, los cebadores oligonucleótidos presentan una longitud de 8 a 50 nucleótidos (por ejemplo una longitud de 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 ó 50 nucleótidos).

Las secuencias de SCC*mec* de diversos tipos de SARM se encuentran disponibles para el público, por ejemplo en la base de datos de nucleótidos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (ver, por ejemplo, AB033763 para el casete cromosómico estafilocócico *mec*: cepa NCTC10442; D86934 para el casete cromosómico estafilocócico *mec* de tipo II: cepa N315; AB047089, extremo derecho para el casete cromosómico estafilocócico *mec* de tipo III y su región cromosómica flanqueante: cepa 85/3907; AB063172 para el casete cromosómico estafilocócico *mec* de tipo IV.1 (IVa): cepa CA05(JCSC1968), o el casete cromosómico estafilocócico *mec* de tipo V AB121219: cepa JCSC3624(WIS)).

Los "cebadores específicos para RE2" o "cebadores específicos para RE3" o "cebadores específicos para RE7" tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a los cebadores oligonucleótidos que se hibridan con secuencias de ácidos nucleicos codificantes de RE2 ó RE3 ó RE7, respectivamente, e inician la síntesis a partir de los mismos bajo condiciones apropiadas.

Además del conjunto de cebadores tal como se define en la reivindicación 1 adjunta, el método de la invención utiliza una pareja de sondas con el fin de detectar la presencia o ausencia de SARM. El término "sonda" se refiere a ácidos nucleicos producidos sintéticamente o biológicamente (ADN o ARN) que, por su diseño o por la selección, contienen secuencias de nucleótidos específicas que les permiten hibridarse bajo astringencias predeterminadas definidas de manera específica (es decir, preferentemente) con "ácidos nucleicos diana", en el presente caso a un ácido nucleico (diana) de SARM. Una "sonda" puede identificarse como "sonda de detección", lo que significa que detecta el ácido nucleico diana.

En un aspecto preferente de la exposición, por lo menos una sonda de la pareja de sondas comprende o consiste de una fracción fluorescente y una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada de entre el grupo que consiste de:

- 5'-AAG TCG CTT TGC CTT TGG GTC A -3' (AR *mec* Fluo 1 sin marcaje; SEC ID nº 45),
- 5'-TAC AAA GTC GCT TTG CCT TTG GGT CA -3' (AR *mec* Fluo 2 sin marcaje; SEC ID nº 46),
- 5'-GGC CGT TTG ATC CGC CAA T -3' (AR *mec* Fluo 3 sin marcaje; SEC ID nº 47),
- 5'-AAG TCG CTT TGC CCT TGG GTA -3' (AR *mec* Fluo 4 sin marcaje; SEC ID nº 48),
- 5'-AAG TCG CTT TGC CCT TGG GT -3' (AR *mec* Fluo 4-2 sin marcaje; SEC ID nº 49),
- 5'-AAG TCG CTT TGC CCT TGG GTC A -3' (AR *mec* Fluo 4-3 sin marcaje; SEC ID nº 50),
- 5'-AAG TCG CTT TGC CCT TGG G -3' (AR *mec* Fluo 4-GV sin marcaje; SEC ID nº 51),
- 5'-CAA GAA TTG AAC CAA CGC AT -3' (AR *mec* Fluo 4k sin marcaje; SEC ID nº 52),
- 5'-CAA TGA CGA ATA CAT AGT CGC TTT GCC CTT -3' (AR *mec* Fluo 5 sin marcaje; SEC ID nº 53),
- 5'-CGT TTG ATC CGC CAA TGA CGA -3' (AR *mec* Fluo 6 sin marcaje; SEC ID nº 54),
- 5'-GCC AAT CCT TCG GAA GAT AGC A -3' (AR *mec* Fluo 7 sin marcaje; SEC ID nº 55),
- 5'-ATT AAC ACA ACC CGC ATC -3' (AR *mec* Fluo UR sin marcaje; SEC ID nº 56),
- 5'-GTC GCT TTG CCC TTG GGT C -3' JU1 sonda 1 sin marcaje; SEC ID nº 57),
- 5'-TCG CTT TGC CCT TGG GTC AT -3' JU2 sonda 1 sin marcaje; SEC ID nº 58),
- 5'-GGC CGT TTG ATC CGC CAA T -3' JU3 sonda 1 sin marcaje; SEC ID nº 59),
- 5'-GTC CTT GTG CAG GCC GTT TGA T -3' JU4 sonda 1 sin marcaje; SEC ID nº 60),
- 5'-CTT GGG TCA TGC GTT GGT TCA ATT -3' JU5 sonda 1 sin marcaje; SEC ID nº 61),
- 5'-CGA ATA CAA AGT CGC TTT GCC CTT GGG -3' (AR *mec* 640 3 sin marcaje; SEC ID nº 62),
- 5'-ATG CGT TGG TTC AAT TCT TG -3' (AR *mec* 640 4 sin marcaje; SEC ID nº 63),
- 5'-GCG TTG GTT CAA TTC TTG GG -3' (AR *mec* 610 4-3 sin marcaje; SEC ID nº 64),
- 5'-ACC CAA GGG CAA AGC GAC TT -3' (AR *mec* 640 4k sin marcaje; SEC ID nº 65),
- 5'-GGT AAT CGC TTG GTT CAA TTC TTG -3' (AR *mec* 640 5 sin marcaje; SEC ID nº 66),
- 5'-ACA AAG TCG CTA TGC CCT TGG GTC A -3' (AR *mec* 640 6 sin marcaje; SEC ID nº 67),
- 5'-CTT TCC TTG TAT TTC TAA TGT AAT GAC TG -3' (AR *mec* 640 7 sin marcaje; SEC ID nº 68),
- 5'-TTG ATG TGG GAA TGT CAT TTT GCT GAA -3' (AR *mec* 640 UR sin marcaje; SEC ID nº 69),
- 5'-GCG TTG GTT CAA TTC TTG GGC CAA T -3' JU1 sonda 2 sin marcaje; SEC ID nº 70),
- 5'-GTT GGT TCA ATT CTT GGG CCA ATC CTT CG -3' JU2 sonda 2 sin marcaje; SEC ID nº 71),
- 5'-CGA ATA CAA AGT CGC TTT GCC CTT GG -3' JU3 sonda 2 sin marcaje; SEC ID nº 72),
- 5'-GCC AAT GAC GAA TAC AAA GTC GCT TTG CC -3' JU4 sonda 2 sin marcaje; SEC ID nº 73),
- 5'-TGG GCC AAT CCT TCG GAA GAT AGC A -3' JU5 sonda 2 sin marcaje; SEC ID nº 74),
- 5'-ATG CGT TGG TTC GAT TCT TG -3' (AR *mec* 610 4-MM2 sin marcaje; SEC ID nº 75),

- 5'-CAT GCG TTG GTT CGA TTC TTG -3' (AR *mec* 610 4-MM2-GV sin marcaje; SEC ID nº 76),
- 5'-AAG TCG CTT TGC CCT TGG G -3' (MRSA directo Fluos sin marcaje; SEC ID nº 96), y
- 5'-CAT GCG TTG GTT CGA TTC TTG -3' (MRSA directo Red 610 sin marcaje; SEC ID nº 97),

5 especialmente AR *mec* Fluo 4 sin marcaje y/o AR *mec* 610 4-MM2 sin marcaje o especialmente AR *mec* Fluo 4-GV sin marcaje y/o AR *mec* 610 4-MM2-GV sin marcaje o especialmente SARM directo Fluos sin marcaje y/o SARM directo Red 610 sin marcaje, preferentemente SARM directo Fluos sin marcaje y/o SARM directo Red 610 sin marcaje, más preferentemente SARM directo Fluos sin marcaje y SARM directo Red 610 sin marcaje.

10 En una realización de la invención, la primera sonda comprende o consiste de una fracción fluorescente y las secuencias de ácidos nucleicos de SEC ID nº 96 y la segunda sonda comprende o consiste de una fracción fluorescente y la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID nº 97 ó viceversa. Según la invención, la primera sonda de SARM de la pareja de sondas de SARM se marca con una fracción fluorescente donante y la segunda sonda de SARM de la pareja de sondas de SARM se marca con una fracción fluorescente aceptora correspondiente. Se listan
 15 posteriormente ejemplos de marcajes adecuados y preferentes, en los que cada una de las sondas puede marcarse con cualquiera de los marcajes. Sin embargo, una pareja de sondas preferente es una en la que la primera sonda, que incluye el primer marcaje, es fluoresceína-5'-AAG TCG CTT TGC CCT TGG GTA-3' (AR *mec* Fluo 4) y en la que la segunda sonda, que incluye el segundo marcaje, es LC-Red 610-5'-ATG CGT TGG TTC GAT TCT TG-3' (AR *mec* 610 4MM2). Una pareja de sondas preferente alternativa es una en la que la primera sonda, que incluye el primer
 20 marcaje, es fluoresceína-5'-AAG TCG CTT TGC CCT TGG G-3' (AR *mec* Fluo 4-GV) y en la que la segunda sonda, que incluye el segundo marcaje, es LC-Red 610-5'-CAT GCG TTG GTT CGA TTC TTG-3' (AR *mec* 610 4MM2-GV). Una pareja de sonda todavía más preferente es una en la que la primera sonda, que incluye el primer marcaje, es 5'-AAG TCG CTT TGC CCT TGG G-3' (SARM Fluos directo) y en la que la segunda sonda, que incluye el segundo marcaje, es LC-Red 610-5'-CAT GCG TTG GTT CGA TTC TTG-3' (SARM Red 610 directo).

25 En otro aspecto, la sonda comprende o consiste de una fracción fluorescente y una variante funcionalmente activa de cualquiera de las sondas de SEC ID nº 45 a nº 76, nº 96 ó nº 97, particularmente en la que:

30 (a) la variante funcionalmente activa es una parte funcionalmente activa de una sonda de las secuencias de SEC ID nº 45 a nº 76, nº 96 ó nº 97, comprendiendo la parte por lo menos 70%, preferentemente por lo menos 80%, más preferentemente por lo menos 90%, todavía más preferentemente por lo menos 95% de cualquiera de las secuencias de SEC ID nº 45 a nº 76, nº 96 ó nº 97,

35 (b) la variante funcionalmente activa es una variante funcionalmente activa que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 70%, preferentemente de por lo menos 80%, más preferentemente de por lo menos 90%, todavía más preferentemente de por lo menos 95%, respecto a cualquiera de las secuencias de SEC ID nº 45 a nº 76, nº 96 ó nº 97,

(c) la variante funcionalmente activa es una sonda de SEC ID nº nº 45 a nº 76, nº 96 ó nº 97, que comprende por lo menos un ácido nucleico químicamente modificado, y/o

40 (d) la variante funcionalmente activa es una parte funcionalmente activa complementaria a cualquiera de las secuencias de SEC ID nº nº 45 a nº 76, nº 96 ó nº 97 ó una variante funcionalmente activa de (a), (b) y/o (c).

Puede identificarse una variante funcionalmente activa de cualquiera de dichas sondas mediante la utilización de la variante y la sonda respectiva en el método de la invención. Una variante funcionalmente activa de una sonda que comprende cualquiera de entre SEC ID nº 45 a nº 76, nº 96 ó nº 97, se refiere a una sonda que presenta una
 45 especificidad y una sensibilidad similares o más altas que la secuencia correspondiente de SEC ID nº 45 a nº 76, nº 96 ó nº 97. Los términos "especificidad" y "sensibilidad" se han definido anteriormente para los cebadores y pueden determinarse tal como se ha detallado para las variantes de cebadores.

50 La parte de la sonda puede obtenerse mediante delección terminal de nucleótidos (en el extremo 5' y/o en el extremo 3'). La identidad de secuencia puede determinarse mediante alineación de secuencias. Los métodos de alineación de secuencias para la comparación son bien conocidos de la técnica. Se han descrito diversos programas y algoritmos de alineación en, por ejemplo, Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482, 1981, o en Pearson y Lipman, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85: 2444-2448, 1988.

55 La herramienta de búsqueda de alineaciones locales básicas (BLAST) del NCBI (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990) se encuentra disponible de varias fuentes, incluyendo el National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD) y en Internet, para la utilización en relación con los programas de análisis de secuencias blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx. Las variantes de una sonda que comprende cualquiera de las secuencias de SEC ID nº 45 a nº 76, nº 96 ó nº 97 se caracterizan típicamente utilizando Blast 2.x del NCBI.

60 La variante puede variar, por ejemplo, respecto a la secuencia de SEC ID nº 45 a nº 76, nº 96 ó nº 97 en una o más adiciones, delecciones o sustituciones de nucleótidos, particularmente una o más adiciones, delecciones o sustituciones de nucleótidos en el extremo 5' y/o 3' de la secuencia correspondiente de SEC ID nº 45 a nº 76, nº 96 ó nº 97.

65 Además, se hace referencia a los datos anteriormente indicados con respecto a las variantes de cebadores, que

pueden aplicarse análogamente a las variantes de las sondas.

En un aspecto de la exposición, el conjunto de cebadores comprende o consiste de:

- 5 a) AR *mec* 11 sentido, AR *mecA* 3/8, AR *mec* 5/2 y opcionalmente AR *mec* 6-2 inv. y en la que la primera sonda es fluoresceína 5'-AAG TCG CTT TGC CCT TGG GTA -3' (AR *mec* Fluo 4) y en la que la segunda sonda es LC-Red 610-5'-ATG CGT TGG TTC GAT TCT TG -3' (AR *mec* 610 4-MM2) o
- 10 b) AR *mec* 12 sentido, AR *mecA* 3/13, AR *mec* 5/16 y opcionalmente JU1 inv. y en la que la primera sonda es fluoresceína 5'-AAG TCG CTT TGC CCT TGG G -3' (AR *mec* Fluo 4-GV) y en la que la segunda sonda es LC-Red 610-5'-CAT GCG TTG GTT CGA TTC TTG -3' (AR *mec* 610 4-MM2-GV) o
- 15 c) SARM directo RE2 sentido, SARM directo RE3 sentido, SARM directo RE7 sentido y opcionalmente SARM directo inv. y en el que el primer marcaje es 5'-AAG TCG CTT TGC CCT TGG G -3'-fluoresceína (SARM directo Fluos) y en el que la segunda sonda es LC-Red 610-5'-CAT GCG TTG GTT CGA TTC TTG -3' (SARM directo Red 610).

El diseño de oligonucleótidos que deben utilizarse como sondas (de hibridación) puede llevarse a cabo de una manera similar al diseño de cebadores, aunque los elementos de una pareja de sondas preferentemente se hibridan con un producto de amplificación separados por no más de 5 nucleótidos en la misma cadena, de manera que puede producirse la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) (por ejemplo separados por no más de 1, 2, 3 ó 4 nucleótidos). Este grado mínimo de separación típicamente acerca las fracciones fluorescentes respectivas lo suficiente para que se produzca la FRET (ver posteriormente). Sin embargo, debe entenderse que resultan posibles otras distancias de separación (por ejemplo 6 ó más nucleótidos), con la condición de que las fracciones fluorescentes se sitúen correctamente unas respecto a las otras (por ejemplo con un brazo conector), de manera que pueda producirse la FRET. Además, pueden diseñarse sondas para hibridarse con dianas que contienen una mutación o polimorfismo, permitiendo de esta manera la detección diferencial de SARM basándose en la hibridación absoluta de diferentes parejas de sondas correspondientes a cada subtipo particular de SARM que debe distinguirse o en temperaturas de fusión diferentes en, por ejemplo, los elementos de una pareja de sondas y cada producto de amplificación generado a partir de un SARM. Al igual que con los cebadores oligonucleótidos, las sondas oligonucleótidas habitualmente presentan temperaturas de fusión similares, y la longitud de cada sonda debe ser suficiente para que se produzca la hibridación específica de secuencia, pero no tan larga que se reduzca la fidelidad durante la síntesis. Las sondas oligonucleótidas presentan una longitud de 8 a 50 nucleótidos (una longitud de por ejemplo 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 ó 50 nucleótidos).

La invención proporciona métodos para detectar la presencia o ausencia del SARM en una muestra. Los métodos proporcionados por la invención evitan los problemas de contaminación de las muestras, los falsos negativos y los falsos positivos. Entre los métodos se incluye llevar a cabo por lo menos una etapa de amplificación y por lo menos una etapa de hibridación. Una etapa de amplificación incluye poner en contacto la muestra con un conjunto de cebadores adecuados con el fin de producir un producto de amplificación en el caso de que una molécula de ácidos nucleicos de SARM se encuentre presente en la muestra. Cada uno de los cebadores se hibrida con una diana dentro de la molécula diana de ácidos nucleicos de SARM, de manera que por lo menos una parte del producto de amplificación contiene una secuencia de ácidos nucleicos correspondiente al ácido nucleico correspondiente del SARM, en el que se selecciona el conjunto de cebadores para permitir la detección de SARM de tipos I a V. La etapa de hibridación incluye poner en contacto la muestra con una pareja de sondas de SARM. Generalmente, los elementos de la pareja de sondas de SARM se hibridan con el producto de amplificación apropiado separados por no más de cinco nucleótidos. Según la invención, la primera sonda de SARM de la pareja de sondas de SARM se marca con una fracción fluorescente donante y la segunda sonda de SARM de la pareja de sondas de SARM se marca con la fracción fluorescente aceptora correspondiente. El método incluye además detectar la presencia o ausencia de FRET entre la fracción fluorescente donante de la primera sonda de SARM y la fracción fluorescente aceptora correspondiente de la segunda sonda de SARM. Pueden llevarse a cabo múltiples etapas de amplificación e hibridación, preferentemente en un termociclador.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "amplificación" se refiere al procedimiento de síntesis de moléculas de ácidos nucleicos que son complementarias a una o ambas cadenas de un ácido nucleico molde (por ejemplo moléculas de ácidos nucleicos de SARM). La amplificación de una molécula de ácidos nucleicos típicamente incluye la desnaturalización del ácido nucleico molde, la hibridación de cebadores con el ácido nucleico molde a una temperatura que es inferior a las temperaturas de fusión de los cebadores y el alargamiento enzimático a partir de los cebadores con el fin de generar un producto de amplificación. Cada una de las etapas de desnaturalización, hibridación y alargamiento puede llevarse a cabo una vez. Sin embargo, generalmente las etapas de desnaturalización, apareamiento y alargamiento se llevan a cabo múltiples veces, de manera que se incrementa la cantidad de producto de amplificación, con frecuencia exponencialmente, aunque los presentes métodos no requieren la amplificación exponencial. La amplificación típicamente requiere la presencia de desoxirribonucleósidos trifosfato, un enzima ADN polimerasa (por ejemplo la polimerasa Taq) y un tampón apropiado y/o cofactores para la actividad óptima del enzima polimerasa (por ejemplo MgCl₂ y/o KCl).

En el caso de que se produzca la amplificación del ácido nucleico de SARM y se produzca un producto de amplificación, la etapa de hibridación resulta en una señal detectable basada en la FRET entre los elementos de la

pareja de sondas. Tal como se utiliza en la presente memoria, "hibridación" se refiere al apareamiento de sondas con un producto de amplificación. Entre las condiciones de hibridación típicamente se incluyen una temperatura que es inferior a la temperatura de fusión de las sondas pero que evita la hibridación no específica de las sondas.

5 En el método de la invención, la presencia o ausencia de SARM se detecta utilizando la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) (ver, por ejemplo, las patentes US nº 4.996.143, nº 5.565.322, nº 5.849.489 y nº 6.162.603). FRET es una técnica para medir las interacciones entre dos moléculas, en el presente caso dos sondas. En esta técnica, se fusionan genéticamente dos moléculas fluorescentes diferentes (fluoróforos o marcajes) con una pareja de sondas adecuada para la detección del SARM.

10 La transferencia de energía resonante es un mecanismo por el que la energía se transfiere directamente de una molécula a otra. El principio de la FRET se basa en las características combinadas de los dos marcajes. En el caso de que un marcaje se excite con una luz de una longitud de onda particular (frecuencia de absorción), reemite esa energía con una longitud de onda diferente (la frecuencia de emisión). En la FRET, el primer marcaje se excita, con lo que a su vez emite luz que presenta la frecuencia de emisión. En el caso de que el pico de emisión del primer marcaje (donante) se solape con el pico de excitación del segundo marcaje (aceptor), puede determinarse la proximidad de los dos marcajes, ya que el primer marcaje transfiere energía al segundo marcaje y el segundo marcaje emite luz a su propia frecuencia de emisión. El resultado neto es que el donante emite menos energía de lo que emitiría normalmente (ya que parte de la energía que radiaría en forma de luz es transferida por el contrario al aceptor), mientras que el aceptor emite más energía luminica a su frecuencia de excitación (porque obtiene una entrada adicional de energía procedente del fluoróforo donante).

25 El beneficio de la tecnología de FRET es que presenta una resolución excelente. La física de la transferencia de energía por FRET entre donante y aceptor (que es no radioactiva) es tal que la eficiencia cae drásticamente con la sexta potencia de la distancia entre moléculas. De esta manera, la FRET generalmente se produce cuando dos fluoróforos se encuentran separados por 20 a 100 Å (0,002 a 0.01 µm), lo que implica que los fluoróforos deben aproximarse hasta bastante poca distancia.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, dos sondas oligonucleótidas, conteniendo cada una fracción fluorescente, pueden hibridarse con un producto de amplificación en posiciones particulares determinadas por la complementariedad de las sondas oligonucleótidas con la secuencia de ácidos nucleicos diana, es decir, el ácido nucleico de SARM. Al hibridarse las sondas oligonucleótidas con el producto de amplificación en las posiciones apropiadas, se genera una señal de FRET. En una realización preferente, los elementos de la pareja de sondas de SARM (sondas de detección) se hibridan con el producto de amplificación separados por no más de cinco, cuatro o tres nucleótidos, particularmente no más de dos nucleótidos, especialmente no más de un nucleótido.

40 Tal como se ha detallado anteriormente, cada sonda de la pareja de sondas se marca con un marcaje/fluoróforo/fracción fluorescente adecuada. Los "marcajes", con frecuencia denominados "grupos informadores", "fluoróforo" o "fracción fluorescente" son generalmente grupos que señalan o marcan un ácido nucleico diana para distinguirlo del resto (los ácidos nucleicos que presentan unido un "marcaje" también pueden denominarse compuestos de unión a ácido nucleico marcados, sondas marcadas o simplemente sondas).

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "relación de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia" y expresiones similares se refieren a la hibridación contigua de una "sonda" marcada con una "fracción fluorescente donadora" y otra "sonda" marcada con una "fracción fluorescente aceptora" con un "ácido nucleico diana", de manera que el "marcaje fluorescente donador" puede transferir la energía resonante al "marcaje fluorescente aceptor", de manera que el "marcaje fluorescente aceptor" produce una emisión fluorescente medible. En el caso de que el "marcaje fluorescente donador" y el "marcaje fluorescente aceptor" se encuentren separados por una distancia excesiva, el "marcaje fluorescente donador" no podrá transferir energía por resonancia al "marcaje fluorescente aceptor", de manera que el "marcaje fluorescente aceptor" pueda emitir fluorescencia medible, y por lo tanto el "marcaje fluorescente donador" y el "marcaje fluorescente aceptor" no se encontrarán en una relación de transferencia de energía por resonancia.

55 Los marcajes adecuados son conocidos de la técnica y el experto en la materia podrá seleccionar una combinación adecuada de marcajes para ambas sondas. Tal como se utiliza en la presente memoria con respecto a las fracciones fluorescentes donante y aceptora correspondiente, "correspondiente" se refiere a una fracción fluorescente aceptora que presenta un espectro de emisión que se solapa con el espectro de excitación de la fracción fluorescente donadora. Sin embargo, ambas señales deben ser mutuamente separables. Por consiguiente, el máximo de longitud de onda del espectro de emisión de la fracción fluorescente aceptora preferentemente deber ser de por lo menos 30 nm, más preferentemente por lo menos 50 nm, tal como por lo menos 80 nm, por lo menos 100 nm o por lo menos 140 nm superior al máximo de longitud de onda del espectro de excitación de la fracción fluorescente donadora. De acuerdo con lo anterior, puede producirse la transferencia eficiente de energía no radiativa entre las fracciones.

65 Las fracciones fluorescente donadora y la aceptora correspondiente generalmente se seleccionan para: (a) una transferencia de energía de Förster altamente eficiente, (b) un desplazamiento de Stokes final elevado (>100 nm),

(c) un desplazamiento máximo de la emisión hacia dentro de la parte roja del espectro visible (>600 nm), y (d) un desplazamiento de la emisión a una longitud de onda más alta que la emisión fluorescente de Raman del agua producida por la excitación a la longitud de onda de excitación del donador. Por ejemplo, puede seleccionarse una fracción fluorescente donadora que presente su máximo de excitación próximo a una línea láser (por ejemplo Helio-Cadmio 442 nm o Argón 488 nm), un elevado coeficiente de extinción, un rendimiento cuántico elevado y un buen solapamiento de su emisión fluorescente con el espectro de excitación de la fracción fluorescente aceptora correspondiente. Puede seleccionarse una fracción fluorescente aceptora correspondiente que presente un elevado coeficiente de extinción, un rendimiento cuántico elevado, un buen solapamiento de su excitación con la emisión de la fracción fluorescente donadora y emisión en la parte roja del espectro visible (>600 nm). Sin embargo, el objetivo principal es obtener señales mutuamente separables.

Entre las fracciones fluorescentes donadoras representativas que pueden utilizarse con diversas fracciones fluorescentesceptoras en la tecnología FRET se incluyen fluoresceína, amarillo Lucifer, B-ficoeritrina, 9-acridin-isotiocianato, amarillo Lucifer VS, ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbén-2,2'-disulfónico, 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcoumarina, 1-pirenbutirato de succinimidilo y derivados de ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbén-2,2'-disulfónico. Entre las fracciones fluorescentesceptoras representativas, dependiendo de la fracción fluorescente donadora utilizada, se incluyen LC-Red 610, LC-Red 640, LC-Red 670, LC-Red 705, Cy5, Cy5.5, cloruro de rodamina B de lisamina sulfonilo, isotiocianato de tetrametil-rodamina, rodamina x isotiocianato, isotiocianato de eritrosina, fluoresceína, pentaacetato de dietilentriamina u otros quelatos de iones lantánidos (por ejemplo europio o terbio). Pueden obtenerse fracciones fluorescentes donadoras yceptoras de, por ejemplo, Molecular Probes (Junction City, OR) o de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Los marcajes preferentes según la invención son los marcajes fluorescentes, que son, por ejemplo, pigmentos fluorescentes tales como el pigmento fluoresceína, el pigmento rodamina, el pigmento cianina y el pigmento coumarina. Por ejemplo, la fracción fluorescente donadora puede ser fluoresceína y/o la fracción fluorescente aceptora puede seleccionarse de entre el grupo que consiste de LC-Red 610, LC-Red 640, LC-Red 670, LC-Red 705, Cy5 y Cy5.5, preferentemente LC-Red 610 ó LC-Red 640. Más preferentemente, la fracción fluorescente donadora es la fluoresceína y la fracción fluorescente aceptora es LC-Red 640 ó LC-Red 610.

Para la pareja de donador-aceptor de fluoresceína-rodamina, podría utilizarse un filtro de excitación de 470-490 nm y un filtro de emisión de 500-520 nm para recoger la luz procedente del donante fluoresceína. A continuación podría utilizarse un filtro de emisión de 600-650 nm para recoger la luz del aceptor rodamina. Estos filtros de emisión necesitan recoger únicamente el rango de longitudes de onda más cortas del donador, y únicamente la cola de emisión larga del aceptor, para evitar la interferencia entre los dos canales de imagen. Es decir, debería evitarse la recogida de emisión procedente de la fluoresceína en el canal de la rodamina y viceversa. El problema es que para que FRET funcione, los espectros de emisión del donador y de excitación del aceptor deben solaparse (un buen nivel de solapamiento es bueno), pero para la obtención de imágenes con una buena proporción de señal-a-ruido debe evitarse la recogida de fotones "erróneos" a través de un filtro.

Las fracciones fluorescentes donadora y aceptora pueden unirse a la sonda oligonucleótida apropiada mediante un brazo conector. La longitud de cada brazo conector puede resultar importante, ya que los brazos conectores afectan a la distancia entre las fracciones fluorescentes donadora y aceptora. La longitud de un brazo conector para el propósito de la presente invención es la distancia en Angstroms entre la base nucleótida y la fracción fluorescente. En general, un brazo conector presenta entre aproximadamente 10 y aproximadamente 25 Å. El brazo conector puede ser del tipo descrito en el documento WO nº 84/03285. El documento WO nº 84/03285 da a conocer además métodos para unir los brazos conectores a bases nucleótidas particulares, y también para unir fracciones fluorescentes a un brazo conector.

Una fracción fluorescente aceptora tal como LC-Red 640(éster de NHS), LC-Red 610(éster de NHS) o LC-Red 670 (éster de NHS) puede combinarse con C6-fosforamiditas (disponibles de ABI (Foster City, CA) o de Glen Research (Sterling, VA)) para producir, por ejemplo, LC-Red 640-fosforamidita. Entre los conectores utilizados con frecuencia para acoplar una fracción fluorescente donadora, tal como fluoresceína, a un oligonucleótido se incluyen conectores tiourea (derivados de FITC, por ejemplo fluoresceína-CPG de Glen Research o de ChemGene (Ashland, MA)), conectores amida (derivados de éster de NHS de fluoresceína, tal como fluoresceína-CPG de BioGenex (San Ramon, CA)) ó 3'-amino-CPG, que requieren el acoplamiento de un éster de NHS de fluoresceína tras la síntesis de oligonucleótido.

En una realización de la invención, la etapa de detección comprende excitar la muestra a una longitud de onda absorbida por la fracción fluorescente donadora y visualizar y/o medir la longitud de onda emitida por la fracción fluorescente aceptora. Preferentemente la detección comprende cuantificar la FRET. El análisis fluorescente puede llevarse a cabo utilizando, por ejemplo, un sistema de microscopía epifluorescente de recuento de fotones (que contiene el espejo dicróico apropiado y filtros para el seguimiento de la emisión fluorescente en un intervalo particular), un sistema fotomultiplicador de recuento de fotones o un fluorímetro.

La excitación para iniciar la transferencia de energía puede llevarse a cabo con un láser de ión argón, una lámpara de arco de mercurio de alta intensidad (Hg), una fuente lumínica de fibra óptica u otra fuente lumínica de alta intensidad apropiadamente filtrada para la excitación en el intervalo deseado.

Otro objetivo de la presente invención se refiere a un método alternativo para detectar la presencia o ausencia de *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) en una muestra, comprendiendo el método:

- 5 (a) la realización de una etapa de amplificación que comprende poner en contacto la muestra con un conjunto de cebadores de SARM con el fin de producir un producto de amplificación en el caso de que SARM se encuentre presente en la muestra,
 (b) la realización de una etapa de hibridación que comprende poner en contacto el producto de amplificación de la etapa (a) con una sonda de SARM, en la que la sonda de SARM se marca con una fracción fluorescente donadora y con una fracción fluorescente aceptora correspondiente, y
 10 (c) la detección de la presencia o ausencia de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) entre la fracción fluorescente donadora y la fracción fluorescente aceptora de la sonda de SARM, en la que la ausencia de FRET es indicativa de la presencia de SARM en la muestra, y en la que la presencia de FRET es indicativa de la ausencia de SARM en la muestra,

15 en el que el método es capaz de detectar cada uno de los casetes cromosómicos estafilocócicos (*SSCmec*) tipos I a V del SARM, y en el que el conjunto de cebadores es tal como se define en las reivindicaciones 1 a 6 adjuntas.

20 Un formato común de la tecnología FRET utiliza dos sondas de hibridación, en la que cada sonda puede marcarse con una fracción fluorescente diferente y generalmente se diseñan para hibridarse en estrecha proximidad entre sí en una molécula de ADN diana (por ejemplo un producto de amplificación) (ver el método anterior descrito en primer lugar). Sin embargo, un formato alternativo de FRET utiliza sondas de hidrolización (segundo método de la invención) para detectar la presencia o ausencia de un producto de amplificación y, por lo tanto, la presencia o ausencia de SARM. Esta tecnología utiliza una sonda de hibridación de cadena sencilla marcada con dos fracciones fluorescentes. Al excitarse una primera fracción fluorescente con luz de una longitud de onda adecuada, la energía absorbida se transfiere a una segunda fracción fluorescente según los principios de la FRET. La segunda fracción fluorescente es generalmente una molécula extintora. Durante la etapa de hibridación de la reacción de PCR, la sonda de hidrolización marcada se une al ADN diana (es decir, el producto de amplificación) y es degradada por la actividad de exonucleasa 5' a 3' de la polimerasa Taq durante la etapa de alargamiento posterior. Por consiguiente, la fracción fluorescente excitada y la fracción extintora quedan espacialmente separadas entre sí. En consecuencia, al excitarse la primera fracción fluorescente en ausencia del extintor, puede detectarse la emisión fluorescente procedente de la primera fracción fluorescente. A título de ejemplo, un sistema de detección de secuencias ABI PRISM[®] 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) utiliza tecnología de sondas de hibridación y resulta adecuada para llevar a cabo los métodos descritos en la presente memoria para la detección de SARM. Puede encontrarse información sobre la amplificación y detección mediante PCR utilizando un sistema ABI PRISM[®] 770 en <http://www.appliedbiosystems.com/products>.

Son ejemplos de sondas de hidrolización adecuadas:

- 40 TP mec 1: 5'-AAG TCG CTT TGC CCT TGG GTC AT -3' (SEC ID n° 87) y
 TP mec 2: 5'-TGC TCA ATT AAC ACA ACC CGC ATC A -3'(SEC ID n° 88).

En una realización preferente de la invención, el método puede definirse adicionalmente a partir de una o más de las características siguientes:

- 45 a) el conjunto de cebadores es tal como se ha definido anteriormente en el contexto del primer método de la invención, comprendiendo o consistiendo de un cebador específico para SARM tipo RE2, un cebador específico para SARM tipo RE3 y un cebador específico para SARM tipo RE7.
 b) la sonda comprende o consiste de dos fracciones fluorescentes, preferentemente tal como se ha definido anteriormente en el contexto del primer método de la invención y una secuencia de ácidos nucleicos de cualquiera de las SEC ID n° 45 a n° 76, n° 96 ó n° 97, o una variante funcionalmente activa de las mismas tal como se ha definido en el contexto del primer método de la invención,
 c) la etapa de amplificación utiliza un enzima polimerasa que presenta actividad de exonucleasa 5' a 3',
 50 d) las fracciones fluorescentes donadora y aceptora se encuentran separadas por no más de 5 nucleótidos en la sonda,
 e) la sonda comprende una secuencia de ácidos nucleicos que permite la formación de estructuras secundarias, en la que la formación de estructura secundaria resulta en proximidad espacial entre la fracción fluorescente donadora y la aceptora,
 f) la fracción fluorescente aceptora es un extintor.

60 Las balizas moleculares conjuntamente con FRET también pueden utilizarse para detectar la presencia de un producto de amplificación utilizando los métodos de PCR en tiempo real de la invención (segundo método alternativo de la invención). La tecnología de balizas moleculares utiliza una sonda de hibridación marcada con una primera fracción fluorescente y con una segunda fracción fluorescente. La segunda fracción fluorescente es generalmente un extintor, y los marcajes fluorescentes típicamente se localizan en cada extremo de la sonda. La tecnología de balizas moleculares utiliza una sonda oligonucleótida que presenta secuencias que permiten la formación de estructura

secundaria (por ejemplo una horquilla). Como resultado de la formación de estructura secundaria en la sonda, ambas fracciones fluorescentes se encuentran espacialmente próximas cuando la sonda se encuentra en solución. Tras la hibridación con los ácidos nucleicos diana (es decir, los productos de amplificación), se interrumpe la estructura secundaria de la sonda y las fracciones fluorescentes se separan una de otra de manera que, tras la
 5 excitación con luz de una longitud de onda adecuada, puede detectarse la emisión de la primera fracción fluorescente.

Son ejemplos de balizas moleculares adecuadas:

10 MB mec 1: 5'-GCC GCG CTG CTC AAT TAA CAC AAC CCG CGC GGC-3' (SEC ID nº 89) y
 MB mec 2: 5'-GCC GCG CAT GCG TTG GTT CAA TTC TGC GCG GC-3' (SEC ID nº 90).

Se indica que los datos anteriores referentes al primer método de la invención resultan aplicables análogamente al segundo método de la invención, con la excepción de que en el segundo método de la invención se utiliza
 15 únicamente una sonda marcada con una fracción fluorescente donadora y con una fracción fluorescente aceptora correspondiente.

Por consiguiente, tal como se utiliza en la presente memoria, "relación de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia" y expresiones similares se refieren a una "sonda" marcada con una "fracción fluorescente donadora" y una "fracción fluorescente aceptora", de manera que el "marcaje fluorescente donador" puede transferir energía de resonancia al "marcaje fluorescente aceptor" de manera que el "marcaje fluorescente donador" y el "marcaje fluorescente aceptor" produce una emisión de fluorescencia medible. En el caso de que el "marcaje fluorescente donador" y el "marcaje fluorescente aceptor" se encuentren separados por una distancia excesiva, el "marcaje fluorescente donador" no podrá transferir energía por resonancia al "marcaje fluorescente aceptor", de manera que el "marcaje fluorescente aceptor" emitirá fluorescencia medible, y por lo tanto el "marcaje fluorescente donador" y el "marcaje fluorescente aceptor" no se encontrarán en una relación de transferencia de energía por resonancia. Preferentemente, la fracción fluorescente aceptora es un extintor que absorbe la energía emitida por la fracción fluorescente donadora.
 20
 25

El primer método (utilizando (a) una o más sondas de hibridación) y el segundo método (utilizando (a) una o más sondas de hibridación o (a) una o más balizas moleculares) según la invención pueden llevarse a cabo en un formato para la utilización en el instrumento LightCycler[®], el cual se describe en la patente US nº 6.174.670. Este formato comprende la amplificación y detección, en la que ésta última utiliza la detección de la fluorescencia para la detección del producto de unión entre una pareja de sondas o de una única sonda y el ácido nucleico diana. Estos formatos aplican la tecnología FRE (ver, por ejemplo, las patentes US nº 4.996.143, nº 5.565.322, nº 5.849.489 y nº 6.162.603). Tal como se utiliza en la presente memoria, dos sondas, conteniendo cada una un marcaje fluorescente, o una única sonda que contiene ambos marcajes fluorescentes pueden hibridarse con un producto de amplificación en posiciones particulares determinadas por la complementariedad de las sondas oligonucleótidas con el ácido nucleico diana. El marcaje fluorescente puede ser un marcaje fluorescente donador o aceptor. Al hibridarse la sondas o sondas con el producto de amplificación en las posiciones apropiadas, se genera una señal de FRET. Pueden utilizarse los componentes ejemplificados tal como se ha detallado anteriormente (por ejemplo los dispositivos de detección, las fuentes de luz, etc.).
 30
 35
 40

En una realización preferente de la invención, la etapa de amplificación a) en el primer método según la invención comprende poner en contacto la muestra con el conjunto de cebadores y opcionalmente con una polimerasa adecuada, especialmente mediante PCR, con el fin de producir un producto de amplificación en caso de encontrarse presentes ácidos nucleicos de SARM en dicha muestra, en el que dicha etapa de hibridación b) comprende poner en contacto dicha muestra con la pareja de sondas, en el que los elementos de dicha pareja de sondas se hibridan con dicho producto de amplificación separados por no más de cinco nucleótidos, en el que la primera sonda de dicha pareja de sondas se marca con un marcaje fluorescente donador y en el que la segunda sonda de dicha pareja de sondas se marca con un marcaje fluorescente aceptor correspondiente, y detectar el producto de unión entre el ácido nucleico de SARM y la pareja de sondas en la etapa c) mediante la detección de la presencia o ausencia de FRET entre dicho marcaje fluorescente donador de dicha primera sonda y dicho marcaje fluorescente aceptor de dicha segunda sonda, en el que la presencia de FRET es indicativa de la presencia del ácido nucleico diana en la muestra, y en el que la ausencia de FRET es indicativa de la ausencia del ácido nucleico diana en la muestra.
 45
 50
 55

En una realización preferente alternativa de la invención, la etapa de amplificación a) en el segundo método según la invención comprende poner en contacto la muestra con el conjunto de cebadores y opcionalmente con una polimerasa adecuada, especialmente mediante PCR, con el fin de producir un producto de amplificación en caso de encontrarse presentes ácidos nucleicos de SARM en dicha muestra, en el que dicha etapa de hibridación b) comprende poner en contacto dicha muestra con la sonda, en el que la sonda se marca con un marcaje fluorescente donador y un marcaje fluorescente aceptor correspondiente, por ejemplo un extintor, y en el que la sonda se hibrida con dicho producto de amplificación, y detectar el producto de unión entre el ácido nucleico de SARM y la sonda en la etapa c) mediante la detección de la presencia o ausencia de FRET entre dicho marcaje fluorescente donador de la sonda y el marcaje fluorescente aceptor, en el que la presencia o ausencia de FRET es indicativa de la presencia o ausencia del ácido nucleico diana en la muestra.
 60
 65

Las patentes US nº 4.683.202, nº 4.683.195, nº 4.800.159 y nº 4.965.188 dan a conocer técnicas de PCR convencional. La PCR típicamente utiliza dos cebadores oligonucleótidos que se unen a un ácido nucleico molde seleccionado (por ejemplo de ADN o ARN). Entre los cebadores útiles en la presente invención se incluyen oligonucleótidos capaces de actuar como punto de inicio de la síntesis de ácidos nucleicos dentro de una secuencia de ácidos nucleicos de SARM.

Puede purificarse un cebador a partir de un digerido de restricción mediante métodos convencionales, o puede producirse sintéticamente. El cebador preferentemente es de cadena sencilla, para una eficiencia máxima de la amplificación. El cebador puede producirse mediante síntesis química.

Los ensayos de PCR pueden utilizar un molde de ácidos nucleicos (ADN o ARN) en ADN general. El ácido nucleico de molde no necesita purificarse, puede ser una fracción menor de una mezcla compleja, tal como ácido nucleico de toxina de SARM contenido en células humanas. El ADN (o ARN) puede extraerse de cualquier muestra, tal como líquidos corporales o hisopos mediante técnicas rutinarias, tales como las descritas en Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications (Persing *et al.* (editores), 1993, American Society for Microbiology, Washington D.C.).

Los cebadores oligonucleótidos se combinan con otros reactivos de PCR bajo condiciones de reacción que inducen la extensión de los cebadores. Por ejemplo, las reacciones de extensión de cadena generalmente incluyen KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), MgCl₂ 1,5 mM, gelatina al 0,001% (p/v), 0,5 a 1,0 µg de ADN molde desnaturalizado, 50 pmoles de cada cebador oligonucleótido, 2,5 U de polimerasa Taq y DMSO al 10%. Las reacciones habitualmente contienen 150 a 320 mM de cada uno de dATP, dCTP, dTTP, dGTP o uno o más análogos de los mismos. En determinadas circunstancias, dUTP 300 a 640 mM puede sustituirse por dTTP en la reacción.

Las cadenas recién sintetizadas forman una molécula de doble cadena que pueden utilizarse en las siguientes etapas de la reacción. Las etapas de separación, hibridación y alargamiento de cadena pueden repetirse con la frecuencia necesaria para producir la cantidad deseada de productos de amplificación correspondiente a la molécula diana de ácido nucleico de SARM. Los factores limitantes de la reacción son las cantidades de cebadores, enzima termoestable y nucleósidos trifosfato presentes en la reacción. La etapa de amplificación y la etapa de hibridación preferentemente se repiten por lo menos una vez. Para la utilización en la detección, el número de etapas de amplificación e hibridación dependerá, por ejemplo, de la naturaleza de la muestra. En el caso de que la muestra sea una mezcla compleja de ácidos nucleicos, pueden resultar necesarias más etapas de amplificación e hibridación para amplificar la secuencia diana en grado suficiente para la detección. Generalmente, las etapas de amplificación e hibridación se repiten por lo menos aproximadamente 20 veces, pero pueden repetirse hasta 40, 60 ó incluso 100 veces. En una realización preferente de la invención, la presencia de FRET en 55, 45 ó 35 ciclos de amplificación e hibridación es indicativa de la presencia de SARM en la muestra.

La reacción en cadena de la polimerasa puede comprender las etapas de añadir una polimerasa termoestable, nucleótidos y cebadores, en las que un cebador es preferentemente un cebador según la invención, para el ácido nucleico diana a la muestra y ciclar térmicamente la muestra entre por lo menos una temperatura de desnaturalización y una temperatura de alargamiento; excitar la muestra con luz a una longitud de onda absorbida por el marcaje fluorescente donador y detectar la emisión fluorescente de la pareja de transferencia de energía fluorescente.

La expresión "polimerasa termoestable" se refiere a un enzima polimerasa que es termoestable, es decir, el enzima cataliza la formación de productos de extensión de cebador complementarios a un molde y no se desnaturaliza irreversiblemente al ser sometido a temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para llevar a cabo la desnaturalización de los ácidos nucleicos molde de doble cadena. Generalmente, la síntesis se inicia en el extremo 3' de cada cebador y transcurre en la dirección 5' a 3' a lo largo de la cadena de molde. Se han aislado polimerasas termoestables de *Thermus flavus*, *T. ruber*, *T. thermophilus*, *T. aqualicus*, *T. lacteus*, *T. rubens*, *Bacillus stearothermophilus* y *Methanothermus fervidus*. Sin embargo, también pueden utilizarse polimerasas que no son termoestables en la PCR, con la condición de que se reponga el enzima.

En otra realización preferente de la invención, un método para la detección de un ácido nucleico de SARM comprende las etapas de amplificar el ácido nucleico mediante reacción en cadena de la polimerasa en presencia de dos sondas de ácidos nucleicos que se hibridan con regiones contiguas del ácido nucleico, marcando una de dichas sondas con un marcaje fluorescente aceptor y la otra sonda con marcaje fluorescente donador de una pareja de transferencia de energía fluorescente, de manera que, al hibridarse las dos sondas con el ácido nucleico diana, los marcajes fluorescentes donador y aceptor se encuentran separados por 25 ó menos nucleótidos, comprendiendo dicha reacción en cadena de la polimerasa las etapas de adición de una polimerasa termoestable, nucleótidos y cebadores, en las que los cebadores son los definidos anteriormente, para el ácido nucleico diana, a la muestra, y el ciclado térmico de la muestra entre por lo menos una temperatura de desnaturalización y una temperatura de alargamiento; excitar la muestra con luz de una longitud de onda absorbida por el marcaje donador y realizar un seguimiento de la fluorescencia dependiente de la temperatura procedente de la pareja de transferencia de energía fluorescente.

En otra realización preferente alternativa de la invención, un método para la detección de un ácido nucleico de SARM comprende las etapas de amplificar el ácido nucleico mediante reacción en cadena de la polimerasa en presencia de una sonda de ácidos nucleicos que se marca con un marcaje fluorescente aceptor, por ejemplo un extintor, y un marcaje fluorescente donador de una pareja de transferencia de energía fluorescente, hibridar la sonda con el ácido nucleico diana, comprendiendo dicha reacción en cadena de la polimerasa las etapas de adición de una polimerasa que opcionalmente presenta actividad de exonucleasa 5' a 3', nucleótidos y cebadores, en la que los cebadores son los definidos anteriormente, para el ácido nucleico diana, a la muestra, y el ciclado térmico de la muestra entre por lo menos una temperatura de desnaturalización y una temperatura de alargamiento; excitar la muestra con luz de una longitud de onda absorbida por el marcaje donador y realizar un seguimiento de la fluorescencia dependiente de la pareja de marcajes de transferencia de energía fluorescente.

Para los métodos anteriormente descritos, los ácidos nucleicos pueden encontrarse presentes en forma de doble cadena o de cadena sencilla. En el caso de que el ácido nucleico molde sea de doble cadena resulta necesario separar las dos cadenas antes de que pueda utilizarse como molde en la PCR. La separación de las cadenas puede llevarse a cabo mediante cualquier método de desnaturalización adecuado, incluyendo por medios físicos, químicos o enzimáticos. Un método de separación de las cadenas de ácidos nucleicos implica el calentamiento del ácido nucleico hasta que se encuentre predominantemente desnaturalizado (por ejemplo desnaturalizado más del 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ó 95%). Las condiciones de calentamiento necesarias para desnaturalizar el ácido nucleico molde dependerá, por ejemplo, de la concentración salina del tampón y de la longitud y composición de nucleótidos de los ácidos nucleicos que se desnaturalizan, aunque típicamente se encuentran comprendidas entre aproximadamente 90°C y aproximadamente 105°C durante un tiempo dependiente de características de la reacción tales como la temperatura y la longitud del ácido nucleico. La desnaturalización típicamente se lleva a cabo durante aproximadamente 0 segundos a 4 minutos.

En una realización de la invención, la etapa de detección se lleva a cabo tras cada etapa de amplificación e hibridación y/o en tiempo real. Puede encontrarse una descripción detallada del seguimiento en tiempo real y en línea de la PCR en <http://biochem.roche.com/lightcycler>. Las solicitudes de patente siguientes describen PCR en tiempo real utilizada en la tecnología LightCycler: WO n° 97/46707, WO n° 97/46714 y WO n° 97/46712. El instrumento LightCycler es un ciclador térmico rápido combinado con un fluorímetro de microvolumen que utiliza óptica de alta calidad. Esta técnica de termociclado rápido utiliza cubetas de vidrio delgadas como recipientes de reacción. El calentamiento y el enfriamiento de la cámara de reacción se controlan mediante el alternado de aire caliente y aire ambiente. Debido a la reducida masa de aire y la elevada proporción de área superficial a volumen de las cubetas, pueden conseguirse velocidades de transición de la temperatura muy rápidas dentro de la cámara térmica del LightCycler. La adición de pigmentos fluorescentes seleccionados a los componentes de reacción permite realizar un seguimiento de la PCR en tiempo real y en línea. Además, las cubetas sirven como elemento óptico para la recogida de señales (de manera similar a la óptica de la fibra de vidrio). El efecto es la iluminación eficiente y el seguimiento de la fluorescencia de microvolúmenes de muestra. Se describen protocolos de PCR a título de ejemplo en el Ejemplo 3.

El carrusel del LightCycler® que aloja las cubetas puede ser extraído del instrumento. Por lo tanto, las muestras pueden cargarse en el exterior del instrumento (en una sala estéril para PCR, por ejemplo). Además, esta característica permite que el carrusel de muestras se limpie y esterilice fácilmente. El fluorímetro, como parte del aparato LightCycler®, aloja la fuente lumínica. La luz emitida se filtra y se enfoca mediante una lente de epiluminación sobre la parte superior de la cubeta. A continuación, la luz fluorescente emitida por la muestra es enfocada por la misma luz, pasada a través de un espejo dicróico, filtrada apropiadamente y enfocada sobre fotohíbridos colectores de datos. La unidad óptica disponible actualmente en el instrumento LightCycler® (Roche Diagnostics GmbH, n° de catálogo 03531414001) incluye seis filtros de paso de banda (530 nm, excitación de Hex, 610 nm, 640 nm, 670 nm y 705 nm) que proporcionan la detección en cuatro colores y varias opciones de captación de la fluorescencia. Entre las opciones de recolección de datos se incluyen el seguimiento de una vez por cada etapa de ciclado, la captación de muestras individuales totalmente continua para el análisis de curvas de fusión, el muestreo continuo (en el que la frecuencia de muestreo depende del número de muestras) y/o la medición en etapas de todas las muestras tras un intervalo de temperatura definido.

El LightCycler® puede operarse utilizando una estación de trabajo PC y puede utilizar un sistema operativo Windows, por ejemplo Windows XP, Windows NT o Windows 2000. Las señales de las muestras se obtienen a medida que el aparato sitúa los capilares secuencialmente sobre la unidad óptica. El software puede mostrar las señales de fluorescencia en tiempo real inmediatamente después de cada medición. El tiempo de captación de la fluorescencia es de 10 a 100 milisegundos (ms). Tras cada etapa de ciclado, una visualización cuantitativa de la fluorescencia vs. el número de ciclo puede actualizarse continuamente para todas las muestras. Los datos generados pueden almacenarse para el análisis posterior.

En todavía otra realización de la invención, el método comprende además determinar la temperatura de fusión entre una de las dos sondas y el producto de amplificación de la etapa (a), en la que la temperatura de fusión confirma la presencia o la ausencia de SARM. El análisis de curvas de fusión es una etapa adicional que puede incluirse en un perfil de ciclado. El análisis de curvas de fusión se basa en el hecho de que el ADN se funde a una temperatura característica denominada temperatura de fusión (T_m), que se define como la temperatura a la que la mitad de los

dúplex de ADN se han separado en cadenas sencillas. La temperatura de fusión de un ADN depende principalmente de su composición de nucleótidos y de su longitud. De esta manera, las moléculas de ADN ricas en nucleótidos G y C y/o que son más largas, presentan una T_m más alta que las que presentan una abundancia de nucleótidos A y T y/o que son más cortas. Mediante la detección de la temperatura a la que se pierde la señal, puede determinarse la temperatura de fusión de las sondas. De manera similar, mediante la detección de la temperatura a la que se genera la señal, puede determinarse la temperatura de hibridación de las sondas. La temperatura o temperaturas de fusión de las sondas de SARM del producto de amplificación respectivo pueden confirmar la presencia de SARM en la muestra.

En todavía otra realización de la invención, el método comprende además bloquear la amplificación de un ácido nucleico contaminante, comprendiendo particularmente la realización de la etapa de amplificación (a) en presencia de uracilo, comprendiendo especialmente el tratamiento de la muestra con uracil-ADN-glucosilasa previamente a la primera etapa de amplificación. Por ejemplo, se describe un método enzimático que utiliza la uracil-ADN-glucosilasa en las patentes US n° 5.035.996, n° 5.683.896 y n° 5.945.313 para reducir o eliminar la contaminación entre una operación del termociclador y la siguiente. Además, resultan deseables prácticas y procedimientos estándares de contención de laboratorio durante la ejecución de los métodos de la invención. Entre las prácticas y procedimientos de contención se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, áreas de trabajo separadas para diferentes etapas de un método, campanas de contención, puntas de pipeta de filtro de barrera y pipetas de desplazamiento por aire dedicadas. Las prácticas y procedimientos de contención consistentes del personal resultan deseables para una mayor exactitud en un laboratorio diagnóstico que manipule muestras clínicas.

Antes de que los ácidos nucleicos de la muestra puedan analizarse en uno de los ensayos anteriormente indicados, posiblemente deberían aislarse o purificarse a partir de las muestras (biológicas) que contienen mezclas complejas de diferentes componentes. Con frecuencia, para las primeras etapas, se utilizan procedimientos que permiten el enriquecimiento de los ácidos nucleicos.

En una realización preferente de los métodos de la invención, la muestra puede utilizarse como lisado crudo, que puede prepararse de la manera siguiente:

la muestra, por ejemplo un hisopo, puede transferirse a un tampón adecuado y opcionalmente puede tratarse con el fin de inactivar las bacterias. Para liberar el contenido de las células, pueden tratarse con enzimas o con compuestos químicos para disolver, degradar o desnaturalizar las paredes celulares. Este procedimiento se denomina comúnmente lisis o lisis mecánica. La solución resultante que contiene dicho material lisado se denomina lisado. El lisado puede purificarse mediante, por ejemplo centrifugación del mismo, descartando el pellet (residuos). El sobrenadante puede utilizarse directamente como muestra en una reacción de amplificación.

Particularmente, el kit S.E.T.S. (Roche Diagnostics Corporation, n° de catálogo 03753158001) puede resultar de utilidad para preparar un lisado crudo. El método puede describirse a título de ejemplo de la manera siguiente: la muestra, por ejemplo un hisopo, se rompe del asa y la punta del hisopo se inserta en los tubos internos del S.E.T.S. (tubo de 0,5 ml que contiene un orificio en el fondo y que se ajusta en el interior de los tubos externos de S.E.T.S., en estado cerrado). Los tubos se sitúan en tubos de S.E.T.S. externos que contienen perlas de sílice y tampón de neutralización (TN). El TN neutraliza el medio de transporte derivado del dispositivo de obtención de hisopos. El material adherente en el hisopo se retira de la punta del hisopo y es transferido al interior del tubo externo del S.E.T.S. por la fuerza gravitatoria (centrifugación). Se cierra el tubo del S.E.T.S. y se calienta a 95°C para la inactivación por calor de las bacterias. Se rompen las células mediante fuerza mecánica en un dispositivo de agitación, por ejemplo el instrumento MagNALyser[®]. Se recogen residuos del fondo del tubo mediante una centrifugación corta y el sobrenadante se utiliza directamente como muestra en una reacción de amplificación. El método se describe en mayor detalle en Uhl *et al.*, J. Clin. Microbiol. 8:4046-51, 2005.

Un problema observado durante la lisis es que otros enzimas degradantes del componente de interés, por ejemplo las desoxirribonucleasas o ribonucleasas que degradan los ácidos nucleicos, entran en contacto con el componente de interés durante la lisis. Estos enzimas degradativos también pueden encontrarse presente en el exterior de las células o pueden haber sido separados espacialmente en diferentes compartimientos celulares antes de la lisis y de esta manera entrar en contacto con el componente de interés. Otros componentes liberados durante este procedimiento pueden ser, por ejemplo, endotoxinas pertenecientes a la familia de los lipopolisacáridos, que son tóxicos para las células y pueden provocar problemas para los productos destinados a la utilización en terapia humana o animal.

Existe una diversidad de medios para tratar este problema, mencionado anteriormente. Es común utilizar agentes caotrópicos tales como, por ejemplo, tiocianato de guanidinio o detergentes aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos o no iónicos en el caso de que se pretenda liberar los ácidos nucleicos. También es una ventaja utilizar proteasas que degradan rápidamente estos enzimas o proteínas no deseadas. Sin embargo, esto puede producir otro problema, ya que dichas sustancias o enzimas pueden interferir con reactivos o componentes en etapas posteriores.

Los enzimas que pueden utilizarse ventajosamente en dichos procedimientos de lisis o de preparación de muestras mencionados anteriormente son enzimas que cortan los enlaces amida en los sustratos proteína y que se clasifican

como proteasas o (intercambiamente) como peptidasas (ver Walsh, *Enzymatic Reaction Mechanisms*, W.H. Freeman and Company, San Francisco, 1979, capítulo 3). Las proteasas que han sido utilizadas en la técnica anterior son, por ejemplo, las proteasa alcalinas (documento WO n° 98/04730) o las proteasas ácidas (patente US n° 5.386.024). La ptoeasa que se ha utilizado ampliamente en la técnica anterior para la preparación de muestras para el aislamiento de ácidos nucleicos es la proteinasa K de *Tritirachium album* (ver, por ejemplo, Sambrook J. *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989), el cual se encuentra activo a un pH aproximadamente neutro y pertenece a una familia de proteasas conocida por el experto en la materia como subtilisinas.

En las siguientes etapas de la preparación de muestras que siguen a la etapa de lisis, el componente de interés puede enriquecerse adicionalmente. En el caso de que los componentes de interés no proteicos sean, por ejemplo, ácidos nucleicos, se extraen normalmente de las mezclas complejas de lisis antes de utilizarse en un ensayo basado en sondas.

Existen varios métodos para la extracción de ácidos nucleicos:

- métodos dependientes de la secuencia o bioespecíficos, tales como, por ejemplo:

- la cromatografía de afinidad
- la hibridación con sondas inmovilizadas

- métodos independientes de la secuencia o físicoquímicos, tales como, por ejemplo:

- extracción líquido-líquido con, por ejemplo, fenol-cloroformo
- precipitación con, por ejemplo, etanol puro
- extracción con papel de filtro
- extracción con agentes formadores de micelas, tales como bromuro de cetiltrimetilamonio
- unión a pigmentos intercalantes inmovilizados, por ejemplo derivados de acridina
- adsorción a gel de sílice o a tierras diatomáceas
- adsorción a partículas magnéticas de vidrio (PMV) o partículas de organosilano, bajo condiciones caotrópicas

Resulta particularmente interesante para los fines de extracción la adsorción de los ácidos nucleicos a una superficie de vidrio, aunque resultan posibles otras superficies. En los últimos años se han propuesto muchos procedimientos para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de su ambiente natural, a partir de la utilización de su comportamiento de unión a las superficies de vidrio. En el caso de que los ácidos nucleicos no modificados sean la diana, resulta preferente una unión directa de los ácidos nucleicos a un material con una superficie de sílice debido a que no resulta necesario modificar los ácidos nucleicos e incluso pueden unirse a ácidos nucleicos nativos. Estos procedimientos se han descrito en detalle en diversos documentos. En Vogelstein *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76: 615-169, 1979, por ejemplo, se propone un procedimiento para la unión de ácidos nucleicos de geles de agarosa en presencia de yoduro sódico a vidrio blanco molido. La purificación del plásmido de ADN a partir de bacterias sobre vidrio molido en presencia de perclorato sódico se describe en Marko *et al.*, *Anal. Biochem.* 121: 382-387, 1982. En el documento n° DE A 37 34 442 se describe el aislamiento de ADN de fago M13 de cadena sencilla sobre filtros de fibra de vidrio mediante precipitación de las partículas fágicas con ácido acético y lisis de las partículas fágicas con perclorato. Los ácidos nucleicos unidos a los filtros de fibra de vidrio se lavan y después se eluyen con un tampón Tris/EDTA que contiene metanol. Se describe un procedimiento similar para purificar ADN a partir de fagos lambda en Jakobi R. *et al.*, *Anal. Biochem.* 175:196-201, 1988. El procedimiento comprende la unión selectiva de ácidos nucleicos a superficies de vidrio en soluciones salinas caotrópicas y la separación de los ácidos nucleicos de contaminantes tales como agarosa, proteínas o residuos celulares. Para separar las partículas de vidrio de los contaminantes, las partículas pueden centrifugarse o aspirarse líquidos a través de filtros de fibra de vidrio. Ésta es, sin embargo, una etapa limitante que impide que el procedimiento sea utilizado para procesar grandes cantidades de muestras. La utilización de partículas magnéticas para inmovilizar ácidos nucleicos tras la precipitación mediante adición de sal y etanol resulta más ventajosa y se describe en, por ejemplo, Alderton *et al.*, *Anal. Biochem.* 201: 166-169, 1992. En este procedimiento, los ácidos nucleicos se aglutinan conjuntamente con las partículas magnéticas. Se separa el aglutinado del solvente original mediante la aplicación de un campo magnético y realizando una etapa de lavado. Tras una etapa de lavado, se disuelven los ácidos nucleicos en un tampón Tris. Sin embargo, este procedimiento presenta una desventaja en que la precipitación no es selectiva para los ácidos nucleicos. Antes bien, también se aglutina una diversidad de sustancias sólidas y disueltas. En consecuencia, este procedimiento no puede ser utilizado para eliminar cantidades significativas de cualesquiera inhibidores de reacciones enzimáticas específicas que podrían encontrarse presentes. También se encuentra disponible en el mercado vidrio poroso magnético que contiene partículas magnéticas en una matriz vítrea porosa particular y que se recubre con una capa que contiene estreptavidina. Este producto puede utilizarse para aislar materiales biológicos, por ejemplo proteínas o ácidos nucleicos, en el caso de que se modifiquen en una etapa preparativa compleja de manera que se unan covalentemente a la biotina. Los adsorbentes magnetizables particulares demostraron ser muy eficientes y adecuados para la preparación automática de muestras. Con este fin se utilizan pigmentos ferrimagnéticos y ferromagnéticos, así como superparamagnéticos. Las PVM y métodos más preferentes con partículas vítreas magnéticas son las descritas en el documento n° WO 01/37291.

Tras la purificación o aislamiento de los ácidos nucleicos, incluyendo el ácido nucleico diana de su medio natural, puede detectarse el ácido nucleico diana, el ácido nucleico específico para SARM.

5 En cada operación del termociclador, también pueden ciclarse muestras de control. Por consiguiente, en una realización adicional de la invención, el método de la invención incluye una muestra de control, particularmente en la que la muestra de control comprende una molécula de ácidos nucleicos de SARM. El ácido nucleico molde de control puede amplificarse a partir de una muestra de control positivo (control de reactivo) utilizando, por ejemplo, cebadores de control y sondas de control. También pueden utilizarse muestras de control positivas para amplificar, por ejemplo, un constructo plásmido que contenga moléculas de ácido nucleico de SARM. Dicho plásmido de control puede amplificarse internamente (por ejemplo dentro de cada muestra biológica) (control interno) o en muestras separadas analizadas en paralelo con las muestras de los pacientes. Cada operación del termociclador también debería incluir un control negativo que no contenga, por ejemplo, ácido nucleico de SARM. Dichos controles son indicadores del éxito o fracaso de la amplificación, hibridación y/o reacción de FRET. Por lo tanto, las reacciones de FRET pueden determinar fácilmente, por ejemplo, la capacidad de los cebadores de aparearse con especificidad de secuencia y de iniciar el alargamiento, así como la capacidad de las sondas de hibridarse con especificidad de secuencia y de que se produzca la FRET.

20 Un concepto preferente de control comprende un control positivo (que detecta un ADN de SARM conocido), un control de reactivo (que detecta un plásmido que comprende la secuencia diana de SARM) y un control interno (que detecta un plásmido que comprende la secuencia diana de SARM, en el que el sitio de unión de la sonda, por ejemplo el de la sonda detectora de SARM, ha sido sustituida por otra secuencia que no se une a la sonda detectora de SARM pero que resulta reconocida por la sonda detectora de control interno; alternativamente, los sitios de unión para ambas sondas pueden intercambiarse). El control interno puede ser parte de cada una de las reacciones, es decir, el control positivo, control de reactivo, control negativo y cada muestra.

Un ejemplo de una sonda adecuada para el control interno (CI) es:

30 CI de SARM 4: 5'-CCA GCA GAA TGC CAA CCA -3' (SEC ID nº 91), por ejemplo marcado en el extremo 5' con LC-Red 670, o
 CI directo de SARM: 5'-CCA GCA GAA TGC CAG CCA AT -3' (SEC ID nº 98), por ejemplo marcado en el extremo 5' con LC-Red 670.

35 La muestra que debe analizarse puede ser cualquier muestra. Sin embargo, la muestra en general será una muestra biológica, preferentemente una muestra procedente de un sujeto humano. Entre las muestras biológicas representativas que pueden utilizarse en la práctica de los métodos de la invención se incluyen hisopos o líquidos corporales, tales como una muestra seleccionada de entre el grupo que consiste de un hisopo de una herida infectada, un hisopo de piel, un hisopo nasal, un hisopo de garganta, un hisopo de ingle, un hisopo de axila, un hisopo del sitio de un dispositivo invasivo, un hisopo del sitio de posible infección, una muestra de sangre, una muestra de orina y un hisopo de perineo. Los métodos de recolección y almacenamiento de muestras biológicas son conocidos por el experto en la materia. La recolección inadecuada de especímenes, los retrasos en el transporte, las condiciones de transporte inadecuadas o la utilización de determinados hisopos de recolección (por ejemplo alginato cálcico o varilla de aluminio) son todas condiciones que pueden afectar al éxito y/o precisión del resultado del ensayo. Las muestras biológicas pueden procesarse (por ejemplo mediante métodos estándares de extracción de ácidos nucleicos y/o utilizando kits comerciales) para liberar el ácido nucleico de SARM; la muestra biológica se pone en contacto directamente con los componentes de reacción de PCR y los oligonucleótidos apropiados.

50 Un objeto adicional de la exposición se refiere a un cebador, un conjunto de cebadores, una sonda y/o una pareja de sondas tal como se define en cualquiera de las realizaciones anteriormente indicadas de la invención.

Todavía un objeto adicional de la presente invención se refiere a un kit que comprende:

- (a) un conjunto de cebadores tal como se define en cualquiera de los de tipo RE7, reivindicaciones 1 a 5 adjuntas,
- 55 (b) una pareja de sondas o una sonda según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 8 adjuntas, o una sonda según la reivindicación 10, y
- (c) una fracción fluorescente donadora y una fracción fluorescente correspondiente, de marcaje de la sonda o sondas,

60 en el que el kit es capaz de detectar cada uno de los casetes cromosómicos estafilocócicos (SCC*mec*) de tipos I a V del SARM.

65 El conjunto de cebadores, sonda y/o pareja de sondas pueden ser tales como los indicados para las realizaciones (preferentes) anteriormente indicadas o los adecuados para cualquiera de los métodos de la invención descritos anteriormente. Además, el kit puede comprender una etiqueta en el paquete o material impreso en el mismo con instrucciones de utilización del conjunto de cebadores de SARM y de la pareja de sondas de SARM para detectar la

presencia o ausencia del mismo en una muestra. Son componentes opcionales adicionales del kit de la invención por lo menos un enzima adecuado, particularmente uracil-ADN-glucosilasa y/o una ADN polimerasa y/o un tampón adecuado. El kit también puede contener una polimerasa dependiente de molde con actividad exonucleolítica 3' a 5', preferentemente la polimerasa Taq, nucleótidos y oligonucleótidos. En otra realización de la invención se proporciona un kit que comprende una ADN polimerasa dependiente de molde, nucleótidos y un oligonucleótido o una pareja de cebadores según la invención.

Dichos kits conocidos de la técnica comprenden además material de plástico que puede utilizarse durante el procedimiento de amplificación, tales como, por ejemplo, placas de microtitulación en el formato de 96 ó 384 pocillos o simplemente tubos de reacción ordinarios fabricados por, por ejemplo, Eppendorf, Hamburg, Alemania, y todos los demás reactivos para llevar a cabo el método según la invención.

En otra realización de la invención, el kit contiene reactivos adicionales para aislar el ácido nucleico. Por lo tanto, el kit puede contener además un material con una afinidad para ácidos nucleicos, preferentemente el material con una afinidad para los ácidos nucleicos comprende un material con una superficie de sílice. Preferentemente, el material con una superficie de sílice es un vidrio. Más preferentemente, el material con una afinidad para los ácidos nucleicos es una composición que comprende partículas vítreas magnéticas tal como se describe en los documentos n° WO 96/41811 y n° WO 01/37291. El kit puede comprender además o adicionalmente un tampón de lisis que contiene, por ejemplo, agentes caotrópicos, detergentes o alcoholes, o mezclas de los mismos, que permitan la lisis de las células y, separadamente, una proteasa, por ejemplo proteinasa K, para las digestiones de proteínas no deseadas. Estos componentes del kit según la invención pueden proporcionarse separadamente en tubos o recipientes de almacenamiento. Dependiendo de la naturaleza de los componentes, estos pueden proporcionarse incluso en un único tubo o recipiente de almacenamiento. El kit puede comprender además o adicionalmente una solución de lavado que resulte adecuada para la etapa de lavado de las partículas vítreas magnéticas cuando se encuentra unido a las mismas ADN o ARN. Esta solución de lavado puede contener etanol y/o agentes caotrópicos en una solución o soluciones tamponadas con un pH ácido sin etanol y/o agentes caotrópicos tal como se ha indicado anteriormente. Con frecuencia, la solución de lavado u otras soluciones se proporcionan en forma de soluciones madre que deben diluirse antes de la utilización. El kit puede comprender además o adicionalmente un eluyente o tampón de elución, es decir una solución o un tampón (por ejemplo Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) o agua pura para eluir el ADN o ARN unido a las partículas vítreas magnéticas. Además, pueden encontrarse presentes reactivos o soluciones tamponadas adicionales que pueden utilizarse para el procedimiento de purificación de un ácido nucleico, es decir, ADN o ARN.

En una realización preferente de la invención el kit contiene tubos de S.E.T.S. internos, externos y/o el tampón de neutralización como reactivos de preparación de muestras. Preferentemente, el método de la invención se lleva a cabo sin purificación de las muestras mediante preparación de lisados crudos, por ejemplo tal como se ha detallado anteriormente. Por consiguiente, el kit puede adaptarse a este método en el aspecto de que los medios para el aislamiento o purificación adicional de ácidos nucleicos no se incluyen en el kit.

Una realización preferente de la presente invención es utilizar el método o el kit de la presente invención en métodos automatizables, tal como se describe en, por ejemplo, el documento n° WO 99/16781. La expresión "método automatizable" se refiere a que las etapas del método resultan adecuadas para su realización con un aparato o máquina capaz de funcionar con poco o ningún control o influencia externo de un ser humano. La expresión "método automatizado" se refiere a que las etapas del método automatizable se llevan a cabo con un aparato o máquina capaz de funcionar con poco o ningún control o influencia externo de un ser humano. Únicamente las etapas de preparación para el método podría ser necesario que se realizasen manualmente, por ejemplo los recipientes de almacenamiento deben rellenarse y colocarse, la elección de las muestras debe ser realizada por un ser humano y etapas adicionales conocidas por el experto en la materia, por ejemplo la operación del ordenador de control. El aparato o máquina puede, por ejemplo, añadir automáticamente líquidos, mezclar las muestras o llevar a cabo etapas de incubación a temperaturas específicas. Típicamente, dicha máquina o aparato es un robot controlado por un ordenador que ejecuta un programa en el que se encuentran especificados las etapas y comandos individuales. Los métodos automatizados preferentes son aquellos que se llevan a cabo en un formato de alto rendimiento, lo que implica que los métodos y la máquina o aparato utilizado han sido optimizados para un rendimiento elevado de muestras en un tiempo corto. En otra realización de la invención, los métodos o los kits según la presente invención se utilizan en un procedimiento semiautomatizado, lo que implica que algunas etapas de reacción puede resultar necesario realizarlas manualmente. En una realización preferente de la invención, se extrae una suspensión que contiene PVM según la presente invención de un recipiente de almacenamiento y se añaden volúmenes parciales a diferentes recipientes de reacción. Los recipientes de reacción pueden ser tubos de reacción realizados en plástico, finalmente en formato de placa de microtitulación de 96 ó 384 ó más pocillos en los que se lleva a cabo una reacción. Sin embargo, estos recipientes pueden realizarse en otro material, por ejemplo en acero.

En realizaciones preferentes de la invención, el kit según la invención se utiliza para investigación, bioanálisis o diagnóstico. En realizaciones preferentes según la invención, el kit según la invención o el método según la invención se utiliza en un formato de alto rendimiento, es decir, en un método automatizado que permite el análisis de un número elevado de diferentes muestras en un tiempo muy corto.

5 Debe entenderse que, aunque la invención se ha descrito conjuntamente con la descripción detallada de la misma, la descripción anteriormente proporcionada pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se está definida por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones se encuentran comprendidas dentro del alcance según las reivindicaciones, posteriormente. Además, se entiende que la presente invención no se encuentra limitada por la configuración de uno o más instrumentos disponibles comercialmente, particularmente los indicados en la presente memoria.

FIGURAS

10 La fig. 1 muestra secuencias de amplicón para SARM, particularmente RE2, RE3 y RE7 (incluyendo cada uno el inicio de orfX (CC)), así como orfX.

15 ----- cebador
 primera sonda (sonda de anclaje)
 ----- segunda sonda (sonda detectora)
 indica un apareamiento incorrecto

20 La fig. 2 muestra la secuencia de alineación de RE2 de 93 cepas de SARM diferentes. Se indican mutaciones puntuales, incluyendo el número de mutaciones y el tipo de la alteración. Se identifica una duplicación de 102 pb presente en SCCmec de tipo I. La transición de SCCmec a la parte SA de la secuencia se identifica mediante CC.

25 La fig. 3 muestra las curvas de amplificación (fig. 3A) y las curvas de fusión (fig. 3B) para la detección de RE2. En experimentos analíticos, un rango dinámico de 5 saltos log y una sensibilidad en el rango de 10 copias genómicas demostró satisfacer los requisitos para el uso diagnóstico. Estos experimentos demuestran la funcionalidad del ensayo.

30 La fig. 4 muestra curvas de amplificación (fig. 4A) y curvas de fusión (fig. 4B) para la detección de RE3. En experimentos analíticos, un rango dinámico de 5 saltos log y una sensibilidad en el rango de 10 copias genómicas demostró satisfacer los requisitos para el uso diagnóstico. Estos experimentos demuestran la funcionalidad del ensayo.

35 La fig. 5 muestra las curvas de amplificación (fig. 5A) y las curvas de fusión (fig. 5B) para la detección de RE7. En experimentos analíticos, un rango dinámico de 5 saltos log y una sensibilidad en el rango de 10 copias genómicas demostró satisfacer los requisitos para el uso diagnóstico. Estos experimentos demuestran la funcionalidad del ensayo.

Ejemplos

40 EJEMPLO 1: ENSAYO DIAGNÓSTICO IN VITRO DE SARM

45 El ensayo directo de SARM LightCycler® es un ensayo diagnóstico *in vitro* cualitativo para la detección directa de Staphylococcus aureus resistente a meticilina (SARM) de ayuda en la prevención y control de la colonización por SARM en, por ejemplo, el ámbito clínico. El ensayo llevado a cabo en el instrumento LightCycler® 2.0 con especímenes de pacientes que se sospecha que han sido colonizados utiliza la extracción de hisopo y la lisis mecánica para la preparación de especímenes, seguido de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de ADN de SARM y sondas de hibridación específicas de diana fluorogénicas para la detección del ADN amplificado.

50 Requisitos del instrumento: para este ensayo se especifica LightCycler® 2.0.

55 Requisitos de reactivo: el ensayo consistía de reactivos de prep. de muestras y reactivos de amplificación. La preparación de muestras se llevó a cabo mediante extracción de bacterias de hisopos y una posterior etapa de lisis. La lisis puede llevarse a cabo enzimática o mecánicamente. Para SA la lisis mecánica ha proporcionado buenos resultados en el pasado. Además, la lisis mecánica puede llevarse a cabo con independencia de las bacterias o fenotipo bacteriano presente en la muestra. Por lo tanto, la lisis mecánica fue el método favorecido. Para el procesamiento adicional del lisado se dispone de dos opciones.

- 60 1. Lisis de las muestras con la posterior extracción del ADN
- 2. Lisis de las muestras y utilización de los extractos crudos

Debido a que el tiempo hasta el resultado era importante y la lisis por sí sola es rápida, preferentemente no se llevó a cabo ninguna purificación del ADN, sino que se generó únicamente un lisado crudo y se utilizó directamente para la PCR.

65 El ensayo utilizó la amplificación mediante PCR y la detección con sondas de FRET. Se incluyeron controles para la amplificación y controles internos, con el fin de controlar la amplificación y la hibridación. La detección se realizó a

partir del análisis de las curvas de amplificación o de las curvas de fusión. **Requisitos de software:** Se utilizó el software SW 4.05 para el análisis de los datos para el ensayo directo de SARM. Para el análisis de los datos pueden utilizarse dos posibles algoritmos.

- 5 Al utilizar curvas de amplificación (módulo de detección cualitativa), se consiguieron los datos con el LightCycler SW sin etapas manuales adicionales. La programación, los controles y la visualización de los resultados se dirigieron mediante un macro. Para esta solución, la obtención de datos se basó en el algoritmo intrínseco SW. Los datos obtenidos no fueron controlados mediante análisis experto.
- 10 El análisis de curvas de fusión requirió la realización de una etapa manual de análisis por parte del cliente. La ventaja fue una mayor especificidad.

Descripción del flujo de trabajo. El flujo de trabajo para el ensayo directo de SARM comprendió:

- 15 1. Extracción de hisopo utilizando el tampón de neutralización, tubos de S.E.T.S. internos y externos.
 2. Lisis de las bacterias, incluyendo la adición del control interno (CI) mediante tampón de neutralización (rotura térmica y mecánica).
 3. Transferencia del lisado crudo (extracto de espécimen) a la mezcla de reacción (MR). La MR consistía del cebador y las sondas, el enzima FastStart (polimerasa Taq), UNG (uracil-N-glucosilasa) y tampón.
 20 4. Amplificación y detección utilizando cebador y sondas específicas (PCR).
 5. Análisis de los datos en dos etapas. Primera validación del experimento mediante el control respectivo. Segunda identificación de la presencia o ausencia del analito diana.

EJEMPLO 2: diseño de cebador y sondas

- 25 El cebador y las sondas se diseñaron de manera que el cebador inverso y la pareja de sondas (sondas de detección) se encontrasen localizadas en la parte de *S. aureus* de la región diana. Por lo tanto, este elemento siguió siendo el mismo para todos los tipos de RE. Los tipos de RE describen las variaciones de secuencia de la unión del extremo derecho del trasposón *SCCmec*. El amplicón de RE2 que representa la mayoría de los tipos de RE ha sido
 30 evaluado mediante secuenciación de 93 especímenes no relacionados (fig. 2). Para este tipo predominante de RE (que representa *SCCmec* de tipo I, II, III (algunos) y algunos IV) se han diseñado cebadores y sondas (ver la Tabla 19. Este diseño representa el ensayo central. Se añadieron cebadores adicionales con el fin de cubrir los tipos I a V de SCC en caso apropiado (ver la Tabla 1). Para el diseño de cebadores y sondas se utilizó el software de diseño de sondas de LightCycler® versión 2.0. Se diseñaron variantes de dichos cebadores y sondas con el fin de optimizar la
 35 salida de la señal (ver la Tabla 1).

Tabla 1: diseño de cebadores y sondas para la detección de *SCCmec* RE2, RE3 y RE7

ID	Marcaje	Secuencia (sin marcaje)	(SEC ID n°)
Cebadores cebador/sonda para la detección de RE2			
AR <i>mec</i> 1 sentido	ninguno	5'-GCA ATT CAC ATA AAC CTC ATA TGT TC -3'	(1)
AR <i>mec</i> 2 sentido	ninguno	5'-ACC TCA TAT GTT CTG ATA CAT TCA -3'	(2)
AR <i>mec</i> 3 sentido	ninguno	5'-GCA ATT CAC ATA AAC CTC ATA T -3'	(3)
AR <i>mec</i> 4 sentido	ninguno	5'-CAT AAC AGC AAT TCA CAT AAA CCT C -3'	(4)
AR <i>mec</i> 5 sentido	ninguno	5'-TAA CAG CAA TTC ACA TAA ACC T -3'	(5)
AR <i>mec</i> 6 sentido	ninguno	5'-CGC TAT TAT TTA CTT GAA ATG AAA GAC -3'	(6)
AR <i>mec</i> 7 sentido	ninguno	5'-CTT GAA ATG AAA GAC TGC GGA -3'	(7)
AR <i>mec</i> 8 sentido	ninguno	5'-TTG CTT CAC TAT AAG TAT TCA GTA TAA AGA -3'	(8)
AR <i>mec</i> 9 sentido	ninguno	5'-ATT TAC TTG AAA TGA AAG ACT GCG -3'	(9)
AR <i>mec</i> 10 sentido	ninguno	5'-AAA GAA TAT TTC GCT ATT ATT TAC TTG AA -3'	(10)
AR <i>mec</i> 11 sentido	ninguno	5'-TCA GTA TAA AGA ATA TTT CGC TAT TAT TT -3'	(11)
AR <i>mec</i> 12 sentido	ninguno	5'-TGA AAT GAA AGA CTG CGG AG -3'	(12)
JU1 sentido	ninguno	5'-AAC CTC ATA TGT TCT GAT ACA TTC AAA -3'	(13)
JU2 sentido	ninguno	5'-TAT GTC AAA AAT CAT GAA CCT CAT TAC T -3'	(14)
JU3 sentido	ninguno	5'-CAT AAC AGC AAT TCA CAT AAA CCT C -3'	(15)
JU4 sentido	ninguno	5'-GAC TGC GGA GGC TAA CT -3'	(16)
JU5 sentido	ninguno	5'-ATC CCT TTA TGA AGC GGC -3'	(17)
SARM directo RE2 sentido	ninguno	5'-TGA AAT GAA AGA CTG CGG AG -3'	(92)
Cebadores para la detección de RE3			
AR <i>mecA</i> 3/1	ninguno	5'-GCA AGG TAT AAT CCA ATA TTT CAT ATA TGT -3'	(18)
AR <i>mecA</i> 3/2	ninguno	5'-AGT TCC ATA ATC AAT ATA ATT TGT ACA GT -3'	(19)
AR <i>mecA</i> 3/3	ninguno	5'-ACA TCG TAT GAT ATT GCA AGG TA -3'	(20)
AR <i>mecA</i> 3/4	ninguno	5'-CTT TCA TTC TTT CTT GAT TCC ATT AG -3'	(21)
AR <i>mecA</i> 3/5	ninguno	5'-CAC TCT ATA AAC ATC GTA TGA TAT TGC -3'	(22)

ES 2 403 587 T3

AR <i>mecA</i> 3/6	ninguno	5'-TTC TTA ATT TAA TTG TAG TTC CAT AAT CAA -3'	(23)
AR <i>mecA</i> 3/7	ninguno	5'-AAT TAT ACA CAA CCT AAT TTT TAG TTT TAT -3'	(24)
AR <i>mecA</i> 3/8	ninguno	5'-AAT TTT TAG TTT TAT TTA TGA TAC GCT TC -3'	(25)
AR <i>mecA</i> 3/9	ninguno	5'-ACA CAA CCT AAT TTT TAG TTT TAT TTA TGA -3'	(26)
AR <i>mecA</i> 3/10	ninguno	5'-TTT ATT AAA CAC TCT ATA AAC ATC GTA TGA -3'	(27)
AR <i>mecA</i> 3/13	ninguno	5'-CCA CAT CTC ATT AAA TTT TTA AAT TAT ACA C -3'	(28)
MRSA directo RE3 sentido	ninguno	5'-CCA CAT CTC ATT AAA TTT TTA AAT TAT ACA C -3'	(93)
Cebadores para la detección de RE7			
AR <i>mec</i> 5/1	ninguno	5'-ATA TTA TAC ACA ATC CGT TTT TTA GTT TTA -3'	(29)
AR <i>mec</i> 5/2	ninguno	5'-ACA CAA TCC GTT TTT TAG TTT TAT TTA TG -3'	(30)
AR <i>mec</i> 5/3	ninguno	5'-TTC TAA TTT ATT TAA CAT AAA ATC AAT CCT -3'	(31)
AR <i>mec</i> 5/16	ninguno	5'-CAA TCC TTT TTA TAT TTA AAA TAT ATT ATA CAC -3'	(32)
MRSA directo RE7 sentido	ninguno	5'-CAA TCC TTT TTA TAT TTA AAA TAT ATT ATA CAC -3'	(94)
Cebadores específicos para SARM/SASM			
AR <i>mec</i> 1 inv.	ninguno	5'-AGG AAA GAT GCT ATC TTC CGA -3'	(33)
AR <i>mec</i> 2 inv.	ninguno	5'-GAA AGA TGC TAT CTT CCG AAG -3'	(34)
AR <i>mec</i> 3 inv.	ninguno	5'-GAT GCT ATC TTC CGA AGG -3'	(35)
AR <i>mec</i> 4 inv.	ninguno	5'-GTC ATT ACA TTA GAA ATA CAA GGA AAG AT -3'	(36)
AR <i>mec</i> 5 inv.	ninguno	5'-GCC AAC GAA TAC TAG CC -3'	(37)
AR <i>mec</i> 6-2 inv.	ninguno	5'-ACG AAT ACT AGC CAA AAT TAA ACC -3'	(38)
AR <i>mec</i> 7 inv.	ninguno	5'-CAC AAT CCA CAG TCA TTA CAT TAG A -3'	(39)
JU1 inv.	ninguno	5'-CAA GGA AAG ATG CTA TCT TCC G -3'	(40)
JU2 inv.	ninguno	5'-AGT CAT TAC ATT AGA AAT ACA AGG AAA GA -3'	(41)
JU3 inv.	ninguno	5'-AGGAAAGATGCTATCTTCCGA -3'	(42)
JU4 inv.	ninguno	5'-AGG AAA GAT GCT ATC TTC CGA -3'	(43)
JU5 inv.	ninguno	5'-ACA ATC CAC AGT CAT TAC ATT AGA A -3'	(44)
SARM directo inv.	ninguno	5'-CAA GGA AAG ATG CTA TCT TCC G -3'	(95)
Sondas específicas para orfX			
AR <i>mec</i> Fluo 1	Fluos	5'-AAG TCG CTT TGC CTT TGG GTC A -3'	(45)
AR <i>mec</i> Fluo 2	Fluos	5'-TAC AAA GTC GCT TTG CCT TTG GGT CA -3'	(46)
AR <i>mec</i> Fluo 3	Fluos	5'-GGC CGT TTG ATC CGC CAA T -3'	(47)
AR <i>mec</i> Fluo 4	Fluos	5'-AAG TCG CTT TGC CCT TGG GTA -3'	(48)
AR <i>mec</i> Fluo 4-2	Fluos	5'-AAG TCG CTT TGC CCT TGG GT -3'	(49)
AR <i>mec</i> Fluo 4-3	Fluos	5'-AAG TCG CTT TGC CCT TGG GTC A -3'	(50)
AR <i>mec</i> Fluo 4-GV	Fluos	5'-AAG TCG CTT TGC CCT TGG G -3'	(51)
Sondas específicas para orfX			
AR <i>mec</i> Fluo 4k	Fluos	5'-CAA GAA TTG AAC CAA CGC AT -3'	(52)
AR <i>mec</i> Fluo 5	Fluos	5'-CAA TGA CGA ATA CAT AGT CGC TTT GCC CTT -3'	(53)
AR <i>mec</i> Fluo 6	Fluos	5'-CGT TTG ATC CGC CAA TGA CGA -3'	(54)
AR <i>mec</i> Fluo 7	Fluos	5'-GCC AAT CCT TCG GAA GAT AGC A -3'	(55)
AR <i>mec</i> Fluo UR	Fluos	5'-ATT AAC ACA ACC CGC ATC -3'	(56)
JU1 sonda 1	Fluos	5'-GTC GCT TTG CCC TTG GGT C -3'	(57)
JU2 sonda 1	Fluos	5'-TCG CTT TGC CCT TGG GTC AT -3'	(58)
JU3 sonda 1	Fluos	5'-GGC CGT TTG ATC CGC CAA T -3'	(59)
JU4 sonda 1	Fluos	5'-GTC CTT GTG CAG GCC GTT TGA T -3'	(60)
JU5 sonda 1	Fluos	5'-CTT GGG TCA TGC GTT GGT TCA ATT -3'	(61)
SARM directo Fluos	Fluos	5'-AAG TCG CTT TGC CCT TGG G -3'	(96)
AR <i>mec</i> 640 3	LC Red LC	5'-CGA ATA CAA AGT CGC TTT GCC CTT GGG -3'	(62) 640
AR <i>mec</i> 640 4	Red 640 LC	5'-ATG CGT TGG TTC AAT TCT TG -3'	(63) 640
AR <i>mec</i> 610 4-3	Red 610 LC	5'-GCG TTG GTT CAA TTC TTG GG -3'	(64)
AR <i>mec</i> 640 4k	Red 640 LC	5'-ACC CAA GGG CAA AGC GAC TT -3'	(65)
AR <i>mec</i> 640 5	Red 640 LC	5'-GGT AA T GCG TTG GTT CAA TTC TTG -3'	(66)
AR <i>mec</i> 640 6	Red 640 LC	5'-ACA AAG TCG CTA TGC CCT TGG GTC A -3'	(67)
AR <i>mec</i> 640 7	Red 640 LC	5'-CTT TCC TTG TAT TTC T AA TGT AA T GAC TG -3'	(68)
AR <i>mec</i> 640 UR	Red 640	5'-TTG ATG TGG GAA TGT CAT TTT GCT GAA -3'	(69)
JU1 sonda 2	LC Red 640	5'-GCG TTG GTT CAA TTC TTG GGC CAA T -3'	(70)
JU2 sonda 2	LC Red 640	5'-GTT GGT TCA ATT CTT GGG CCA ATC CTT CG -3'	(71)
JU3 sonda 2	LC Red 640	5'-CGA ATA CAA AGT CGC TTT GCC CTT GG -3'	(72)
JU4 sonda 2	LC Red 640	5'-GCC AAT GAC GAA TAC AAA GTC GCT TTG CC -3'	(73)
JU5 sonda 2	LC Red 640	5'-TGG GCC AAT CCT TCG GAA GAT AGC A -3'	(74)
AR <i>mec</i> 610 4-MM2	LC Red 640	5'-ATG CGT TGG TTC GAT TCT TG -3'	(75)

AR <i>mec</i> 610 4-MM2-GV	LC Red 610	5'-CAT GCG TTG GTT CGA TTC TTG -3'	(76)
MRSA directo Red610	LC Red 610	5'-CAT GCG TTG GTT CGA TTC TTG -3'	(97)

EJEMPLO 3: análisis de cebadores y sondas particulares

5 Para RE2, RE3 y RE7 se establecieron ensayos individuales con las mismas sondas y el mismo cebador inverso pero cebadores sentido diferentes (ver la Tabla 1). Estos ensayos individuales se analizaron para el rango dinámico entre aproximadamente 10⁶ copias genómicas/PCR y 10 copias/PCR en diluciones de diez veces (figuras 3 a 5). Para el análisis de los datos se utilizó un módulo de detección cualitativa e identificación manual de Tm ("Tm calling").

10 Concentraciones de reactivo:

cebadores sentido: 0,2 a 0,5 µM

cebador inverso: 0,3 a 0,5 µM

sondas: 0,1 a 0,4 µM

15 MgCl₂: 3,0 a 4,5 µM (la concentración final necesita adaptarse según la concentración de MgCl₂ presente en la mezcla de reacción respectiva)

Uracil-ADN-glucosilasa LightCycler®: 1 unidad/reacción

LightCycler® 480 Probes Master resp. LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe resp.

LightCycler® Fast Start DNA Master^{PLUS} HybProbe

20

	Protocolo de PCR:			
	temperatura	Choque	Tasa de	captura
desnaturalización (1	95°C	térmico	cambio	ninguna
ciclo): amplificación (45	95°C	10 min	20	ninguna
ciclos):	52-55°C	10 s	20	única
	72°C	10 s 12-	20	ninguna
		22 s	20	
curva de fusión (1 ciclo):	95°C	0 s	20	ninguna
	54°C	20 s	20	ninguna
	45°C	20 s	0.2	ninguna
	80°C	0 s	0.1	cont.
enfriamiento (1 ciclo):	40°C	30 s	20	ninguna

Tabla 2: Cebadores y sondas utilizadas en las figuras 3 a 5 para la detección de SCCmec RE2, RE3 y RE7

Nombre	Función	Marcaje	Secuencia (SEC ID n°)
AR <i>mec</i> 12 sentido	detección de RE2		5'- TGA AAT GAA AGA CTG CGG AG -3' (12)
AR <i>mecA</i> 3/13	detección de RE3		5'- CCA CAT CTC ATT AAA TTT TTA AAT TAT ACA C -3' (28)
AR <i>mec</i> 5/16	detección de RE7		5'- CAA TCC TTT TTA TAT TTA AAA TAT ATT ATA CAC -3' (32)
JU1 inv.:	Especificidad para SA		5'- CAA GGA AAG ATG CTA TCT TCC G -3' (40)
AR <i>mec</i> Fluo 4-GV:	Especificidad para SARM	Fluos	5'- AAG TCG CTT TGC CCT TGG G - 3' (51)
AR <i>mec</i> 610 4-MM2-GV:	Especificidad para SARM	LC-Red 610	5'- CAT GCG TTG GTT CGA TTC TTG -3' (76)
RSA CI 4	Control interno	LC-Red 670	5'-CCA GCA GAA TGC CAA CCA -3' (91)

25 Concentraciones de reactivo utilizadas en las figuras 3 a 5:

AR *mec* 12 sentido: 0,5 µM

AR *mecA* 3/13: 0,3 µM

AR *mec* 5/16: 0,3 µM

30 JU1 inv.: 0,5 µM

AR *mec* Fluo 4-GV: 0,2 µM

AR *mec* 610 4-MM2-GV: 0,2 µM

Uracil-ADN-glucosilasa LightCycler®: 1 unidad/reacción

LightCycler® 480 Probes Master (concentración final en la reacción de PCR es de MgCl₂ 3,2 mM)

Protocolo de PCR utilizado en las figuras 3 a 5:

	temperatura	choque térmico	tasa de cambio	captura
desnaturalización (1 ciclo):	95°C	10 min	20	ninguno
amplificación (45 ciclos):	95°C	10 s 10 s 18 s	20	ninguno
	52 °C		20	único
	72°C		20	ninguno
curva de fusión (1 ciclo):	95°C	0 s 20 s	20	ninguno
	54°C		20	ninguno
	45°C		20 s	0.2
enfriamiento (1 ciclo):	80°C	0 s	0.1	cont.
	40°C	30 s	20	ninguno

5 Se realizó un ejemplo adicional tal como se ha indicado anteriormente, con la excepción de que se utilizaron los cebadores y sondas siguientes:

AR <i>mec</i> 11 sentido:	para la detección de RE2
AR <i>mecA</i> 3/8:	para la detección de RE3
AR <i>mec</i> 5/2:	para la detección de RE7
AR <i>mec</i> 6-2 inv.:	especificidad para SA
AR <i>mec</i> Fluo 4:	especificidad para SARM
AR <i>mec</i> 610 4-MM2:	especificidad para SARM

10 En el presente ejemplo se obtuvieron curvas similares a las de las figuras 3 a 5 y se calcularon valores de Tm de 57,21°C, 56,71°C y 56,89°C para RE2, RE3 y RE7, respectivamente.

EJEMPLO 4: análisis del sistema de ensayo de CL de SARM de la invención

15 Se desarrolló un ensayo de PCR para *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (SARM) presente en especímenes de hisopo nasal con cebadores para la amplificación y sondas de hibridación de FRET para la detección con el instrumento LightCycler de los ácidos nucleicos diana amplificados. El ensayo se llevó a cabo tal como se ha descrito en los Ejemplos 1 a 3 anteriores, a menos que se indique lo contrario.

20 El presente ejemplo describe la evaluación del rendimiento de un conjunto preferente de cebadores y sondas (sistema de ensayo de CL de Roche de SARM (PCR)).

Nombre de oligo	Marcaje	Secuencia (5' -3')	SEC ID n°
Cebador, SARM directo RE2 sentido	Ninguno	TGA AAT GAA AGA CTG CGG AG	92
Cebador, SARM directo RE3 sentido	Ninguno	CCA CAT CTC ATT AAA TTT TTA AAT TAT ACA C	93
Cebador, SARM directo RE7 sentido	Ninguno	CAA TCC TTT TTA TAT TTA AAA TAT ATT ATA CAC	94
Cebador, SARM directo inv.	Ninguno	CAA GGA AAG ATG CTA TCT TCC G	95
Sonda, SARM directo Fluos	3' Fluoresceína	AAG TCG CTT TGC CCT TGG G	96
Sonda, SARM directo Red 610	5' LC Red 610, 3' Fosfato	CAT GCG TTG GTT CGA TTC TTG	97
Sonda, SARM directo Cl Red 670	5' LC Red 670, 3' Fosfato	CCA GCA GAA TGC CAG CCA AT	98

Flujo de trabajo:

5 Los hisopos nasales enviados al laboratorio se rompieron e introdujeron en un tubo de lisis con tapa enroscable que contenía 600 ml de tampón de neutralización y aproximadamente 50 ml de perlas de vidrio de 0,1 mm. El tubo se tapó, se calentó durante 2 minutos en un bloque calefactor a una temperatura de entre 95°C y 100°C y se procesó en un lisador MagNA durante 70 segundos a un ajuste de velocidad de 5.000. El tubo se centrifugó a 20.000xg durante 1 minuto y se utilizaron 5 ml del líquido sobre el hisopo para la PCR del SARM.

10 PCR:

15 Se detectaron tres tipos de SARM (RE2, RE3 y RE7) con el ensayo de PCR. Se utilizó el análisis de curvas de fusión de la señal de 640 nm para detectar el SARM. Los tres tipos de SARM proporcionaron la misma temperatura de fusión de la curva de fusión. Las curvas de fusión superiores a la línea base con una Tm en +/-2°C del control positivo se consideraron positivas. Se incluyó un control interno (CI) en el ensayo utilizando la detección de la sonda de hibridación a 710 nm. La detección del control positivo en los especímenes negativos resulta necesaria para demostrar la falta de inhibición de la PCR.

20 • Especificidad

25 El *Staphylococcus* negativo para coagulasa puede presentar una parte de la diana de PCR. Para confirmar que los aislados de estas bacterias no reaccionaban cruzadamente en la PCR, se sometió a ensayo ADN procedente de cultivos lisados de estafilococos negativos para coagulasa de los cuales 29 eran negativos para mecA y 75 positivos para mecA. Ninguno de los estafilococos negativos para coagulasa proporcionó un resultado positivo.

30 Se sometieron a ensayo mediante PCR cien aislados clínicos de *S. aureus* que eran sensibles a meticilina (SASM) para determinar si proporcionaban un resultado falso positivo en la PCR. Ninguno de los aislados de *S. aureus* proporcionó un resultado de PCR positivo.

35 • Inclusividad

40 Se sometió a ensayo mediante PCR el ADN procedente de colonias lisadas de aislados de SARM procedentes de EEUU (207) y de Sudáfrica (105). No se detectaron mediante PCR cuatro aislados de SARM (1,3%). Se detectaron cinco aislados de SARM con sensibilidad reducida.

45 • Interferencia exógena

50 Se sometió a ensayo la inhibición de PCR mediante la adición de diversas cantidades de sangre completa a un hisopo y el procesamiento según el flujo de trabajo. La adición de 5 ó 10 ml de sangre completa no demostró inhibición del control interno. La adición de 20 ml de sangre proporcionó una inhibición inferior al 10% en réplicas de ensayo. La adición de 70 ml de sangre completa al hisopo produjo la inhibición de la PCR del control interno en la mayoría de réplicas de ensayo.

55 • Sensibilidad

Se evaluó la sensibilidad de la PCR para las dianas de SARM RE2, RE3 y RE7 mediante el ensayo en 5 réplicas del número de resultados positivos de PCR para diluciones de ADN de cada tipo de SARM.

n° de copias de ADN	Tipo de SARM		
	RE2	RE3	RE7
20	5	5	5
10	5	4	5
5	3	4	3
2,5	0	1	1

50 La sensibilidad era $\geq 90\%$ para los tres tipos de SARM al utilizar 10 copias de ADN para la PCR.

• Sensibilidad y especificidad clínicas

55 Se llevó a cabo un ensayo clínico con 165 especímenes de hisopo nasal. La estándar de oro para la comparación fue el método de detección basado en cultivos con CHROMagar de SARM (BD, Becton Dickinson and Company, NJ, USA). Se encontró que tres hisopos eran inhibidores de la PCR. Se obtuvieron los resultados siguientes en los 162 hisopos restantes.

		CHROMagar de SARM	
		Pos	Neg
SARM	Pos	33	10*
PCR	Neg	1	118
* 5 de 10 se encontraban bajo tratamiento antibiótico en el momento del ensayo.			

	Todos los pacientes	Pacientes no bajo tratamiento antibiótico [#]
Sensibilidad	97,1%	98,0%
Especificidad	92,2%	95,2%
PPV	76,7%	90,9%
NPV	99,2%	99,0%
# Excluyendo los pacientes no bajo tratamiento antibiótico que podrían proporcionar un resultado falso negativo en el CHROMagar de SARM basado en cultivos		

• Tipos de hisopo

5 Se evaluaron tres tipos de hisopo para la utilización con PCR de SARM. Se encontró que los hisopos líquido de Stuart (Copan), en gel Amies (Copan) y en gel Amies (Copan) de carbono proporcionaban resultados equivalentes para la sensibilidad e inhibición de la PCR.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Roche Diagnostics GmbH, Mayo Foundation for Medical Education and Research, F. Hoffmann-La Roche AG, Roche Molecular system Inc.

15 <120> Métodos de detección de *S. aureus* resistente a metilicina, así como cebadores, sondas y kits para los mismos

<130> R64410PC

20 <160> 98

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

25 <211> 26

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

30 <223> AR mec 1 sentido

<400> 1

gcaattcaca taaacctcat atgttc 26

35 <210> 2

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

40 <220>

<223> AR mec 2 sentido

<400> 2

acctcatatg ttctgataca ttca 24

45 <210> 3

<211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> AR mec 3 sentido

<400> 3
 gcaattcaca taaacctcat at 22

10 <210> 4
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> AR mec 4 sentido

<400> 4
 cataacagca attcacataa acctc 25

<210> 5
 <211> 22
 <212> ADN
 25 <213> Artificial

<220>
 <223> AR mec 5 sentido

30 <400> 5
 taacagcaat tcacataaac ct 22

<210> 6
 <211> 27
 35 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> AR mec 6 sentido

40 <400> 6
 cgctattatt tacttgaaat gaaagac 27

<210> 7
 <211> 21
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 50 <223> AR mec 7 sentido

<400> 7
 ctgaaatga aagactgagg a 21

55 <210> 8
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> AR mec 8 sentido

<400> 8
 ttgcttcaact ataagtattc agtataaaga 30

65 <210> 9

<211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> AR mec 9 sentido
 <400> 9
 atttactga aatgaaagac tgcg 24
 10 <210> 10
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> AR mec 10 sentido
 <400> 10
 20 aaagaatatt tcgctattat ttactgaa 29
 <210> 11
 <211> 29
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> AR mec 11 sentido
 30 <400> 11
 tcagtataaa gaatatttcg ctattatt 29
 <210> 12
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> AR mec 12 sentido
 40 <400> 12
 cactctataa acatcgtatg atattgc 27
 <210> 23
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> JU1 sentido
 <400> 13
 aacctcatat gttctgatac attcaaa 27
 55 <210> 14
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> JU2 sentido
 <400> 14
 65 tatgtcaaaa atcatgaacc tcattact 28
 <210> 15

<211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> JU3 sentido
 <400> 15
 cataacagca attcacataa acctc 25
 10 <210> 16
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> JU4 sentido
 <400> 16
 20 gactgaggag gctaact 17
 <210> 17
 <211> 18
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> JU5 sentido
 30 <400> 17
 atcccttat gaagcggc 18
 <210> 18
 <211> 30
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> AR mecA 3/1
 40 <400> 18
 gcaaggtata atccaatatt tcatatatgt 30
 <210> 19
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> AR mecA 3/2
 <400> 19
 agtccataa tcaatataat ttgtacagt 29
 55 <210> 20
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> AR mecA 3/3
 <400> 20
 acatcgtatg atattgcaag gta 23
 65 <210> 21

<211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> AR mecA 3/4
 <400> 21
 ctttcattct ttcttgattc cattag 26
 10 <210> 22
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> AR mecA 3/5
 <400> 22
 20 cactctataa acatcgtatg atattgc 27
 <210> 23
 <211> 30
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> AR mecA 3/6
 30 <400> 23
 ttcttaattt aattgtagtt ccataatcaa 30
 <210> 24
 <211> 30
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> AR mecA 3/7
 40 <400> 24
 aattatacac aacctaattt ttagttttat 30
 <210> 25
 <211> 29
 45 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> AR mecA 3/8
 <400> 25
 aatttttagt ttatttatg atacgctc 29
 55 <210> 26
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> AR mecA 3/9
 <400> 26
 65 acacaaccta attttagtt ttatttatga 30
 <210> 27

<211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> AR mecA 3/10
 <400> 27
 tttattaaac actctataaa catcgtatga 30
 10 <210> 28
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> AR mecA 3/13
 <400> 28
 20 ccacatctca ttaaattttt aaattataca c 31
 <210> 29
 <211> 30
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> AR mec 5/1
 30 <400> 29
 atattataca caatccggtt ttagtttta 30
 <210> 30
 <211> 29
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> AR mec 5/2
 40 <400> 30
 acacaatccg ttttttagtt ttatttatg 29
 <210> 31
 <211> 30
 45 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> AR mec 5/3
 <400> 31
 ttctaattta ttaacataa aatcaatcct 30
 55 <210> 32
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> AR mec 5/16
 <400> 32
 caatcctttt tatatttaa atatattata cac 33
 65 <210> 33

<211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> AR mec 1 inv.

<400> 33
 aggaaagatg ctatctccg a 21

10 <210> 34
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> AR mec 2 inv.

<400> 34
 gaaagatgct atctccgaa g 21

20 <210> 35
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> AR mec 3 inv.

30 <400> 35
 gatgctatct tccgaagg 18

<210> 36
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> AR mec 4 inv.

40 <400> 36
 gtcattacat tagaaataca aggaaagat 29

<210> 37
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> AR mec 5 inv.

<400> 37 17
 gccaacgaat actagcc 17

50 <210> 38
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> AR mec 6-2 inv.

<400> 38
 acgaatacta gccaaaatta aacc 24

60 <210> 39

<211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> AR mec 7 inv.
 <400> 39
 10 cacaatccac agtcattaca ttaga 25
 <210> 40
 <211> 22
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> JU1 inv.
 20 <400> 40
 caaggaaaga tgctatcttc cg 22
 <210> 41
 <211> 29
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> JU2 inv.
 30 <400> 41
 agtcattaca ttagaaatac aaggaaaga 29
 <210> 42
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> JU3 inv.
 <400> 42
 aggaaagatg ctatcttccg a 21
 45 <210> 43
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> JU4 inv.
 <400> 43
 aggaaagatg ctatcttccg a 21
 55 <210> 44
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> JU5 inv.
 <400> 44
 65 acaatccaca gtcattacat tagaa 25

<210> 45
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> AR mec Fluo 1 sin marcaje
 <400> 45
 10 aagtcgcttt gccttggt ca 22
 <210> 46
 <211> 26
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> AR mec Fluo 2 sin marcaje
 20 <400> 46
 taaaaagtcg cttgcttt ggtca 26
 <210> 47
 <211> 19
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> AR mec Fluo 3 sin marcaje
 30 <400> 47
 ggccgttga tccccaat 19
 <210> 48
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> AR mec Fluo 4 sin marcaje
 <400> 48
 aagtcgcttt gcccttggt a 21
 <210> 49
 45 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> AR mec Fluo 4-2 sin marcaje
 <400> 49
 aagtcgcttt gcccttggt 20
 <210> 50
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> AR mec Fluo 4-3 sin marcaje
 <400> 50
 aagtcgcttt gcccttggt ca 22
 65 <210> 51

<211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> AR mec Fluo 4-GV sin marcaje

 <400> 51
 aagtcgcttt gcccttggg 19
 10 <210> 52
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> AR mec Fluo 4k sin marcaje

 <400> 52
 20 caagaattga accaacgcat 20

 <210> 53
 <211> 30
 <212> ADN
 25 <213> Artificial

 <220>
 <223> AR mec Fluo 5 sin marcaje
 30 <400> 53
 caatgacgaa tacatagtcg cttgccctt 30

 <210> 54
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> AR mec Fluo 6 sin marcaje
 40 <400> 54
 cgttgatcc gccaatgacg a 21

 <210> 55
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> AR mec Fluo 7 sin marcaje
 50 <400> 55
 gccaatcctt cggaagatag ca 22

 <210> 56
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> AR mec Fluo UR sin marcaje

 <400> 56
 60 attaacacaa cccgcatc 18

 <210> 57
 65

<211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> JU1 sonda 1 sin marcaje
 <400> 57
 gtcgctttgc ccttggtc 19
 10 <210> 58
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> JU2 sonda 1 sin marcaje
 <400> 58
 20 tcgctttgcc cttgggtcat 20
 <210> 59
 <211> 19
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> JU3 sonda 1 sin marcaje
 30 <400> 59
 ggccgtttga tccccaat 19
 <210> 60
 <211> 22
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> JU4 sonda 1 sin marcaje
 40 <400> 60
 gtccttgc aggccgttg at 22
 <210> 61
 <211> 24
 45 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> JU5 sonda 1 sin marcaje
 <400> 61
 cttgggtcat gcgttggttc aatt 24
 55 <210> 62
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> AR mec 640 3 sin marcaje
 <400> 62
 65 cgaatacaaaa gtcgctttgc ccttggg 27
 <210> 63

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> AR mec 640 4 sin marcaje
 <400> 63
 atgctgtgtg tcaattcttg 20
 10 <210> 64
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> AR mec 610 4-3 sin marcaje
 <400> 64
 20 gcgttggtc aattctggg 20
 <210> 65
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> AR mec 640 4k sin marcaje
 30 <400> 65
 acccaagggc aaagcgactt 20
 <210> 66
 <211> 24
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> AR mec 640 5 sin marcaje
 40 <400> 66
 ggtaatgcgt tgggtcaatt cttg 24
 <210> 67
 <211> 25
 45 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> AR mec 640 6 sin marcaje
 50 <400> 67
 acaaagtcgc tatgcccttg ggtca 25
 <210> 68
 55 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 60 <223> AR mec 640 7 sin marcaje
 <400> 68
 ctttccttgt atttctaag taatgactg 29
 65 <210> 69
 <211> 27

<212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> AR mec 640 UR sin marcaje

 <400> 69
 ttgatggtgg aatgtcattt tgctgaa 27

 10 <210> 70
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> JU1 sonda 2 sin marcaje

 <400> 70
 gcgttggttc aattcttggg ccaat 25
 20
 <210> 71
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> JU2 sonda 2 sin marcaje

 <400> 71
 30 gttggtcaa ttcttgggcc aatccttcg 29

 <210> 72
 <211> 26
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> JU3 sonda 1 sin marcaje

 <400> 72
 40 cgaatacaaaa gtcgctttgc ccttgg 26

 <210> 73
 <211> 29
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> JU4 sonda 2 sin marcaje
 50
 <400> 73
 gccaatgacg aatacaaagt cgctttgcc 29

 <210> 74
 55 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 60 <223> JU5 sonda 2 sin marcaje

 <400> 74
 tggccaatc cttcggaaga tagca 25

 65 <210> 75
 <211> 20

ES 2 403 587 T3

<212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> AR mec 610 4-MM2 sin marcaje

 <400> 75
 atgcgttgg tgcattctg 20

 10 <210> 76
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> AR mec 610 4-MM2-GV sin marcaje

 <400> 76
 20 catgcgttgg ttcgattctt g 21

 <210> 77
 <211> 255
 <212> ADN
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> orfx

 <400> 77
 30

	ccacgcataa tcttaaatgc tctgtacact tgttcaatta acacaaccg catcatttga	60
	tgtgggaatg tcattttgct gaatgatagt gcgtagttac tgcgttgtaa gacgtccttg	120
	tgcaggccgt ttgatccgcc aatgacgaat acaaagtcgc tttgcccttg ggtcatgcgt	180
	tggttcaatt cttgggcaa tccttcggaa gatagcatct ttccttgat ttctaata	240
	atgactgttg attgt	255

 <210> 78
 <211> 643
 35 <212> ADN
 <213> Staphylococcus aureus

 <400> 78

```

ttgcttcac tataagtatt cagtataaag aatatttcgc tattatttac ttgaaatgaa 60
agactgcgga ggctaactat gtcaaaaatc atgaacctca ttacttatga taagcttctt 120
aaaaacataa cagcaattca cataaacctc atatgttctg atacattcaa aatcccttta 180

tgaagcggct gaaaaaacg catcatttga tatgcttctt aaaaacataa cagcaattca 240
cataaacctc atatgttctg atacattcaa aatcccttta tgaagcggct gaaaaaacg 300
catcatttat gatatgcttc tccacgcata atcttaaatg ctctatacac ttgctcaatt 360
aacacaaccc gcatcatttg atgtgggaat gtcattttgc tgaatgatag tgcgtagtta 420
ctgcgttgta agacgtcctt gtgcaggccg tttgatccgc caatgacgaa tacaaagtcg 480
ctttgccctt gggtcatgcg ttggttcaat tcttgggcca atccttcgga agatagcatc 540
tttcttgta tttctaagt aatgactgtg gattgtggtt taattttggc tagtattcgt 600
tggccttctt tttcttttac ttgctcaatt tctttgtcgc tca 643

```

<210> 79
 <211> 513
 <212> ADN

5 <213> Staphylococcus aureus

<400> 79

```

ttgcttcac tataagtatt cagtataaag aatatttcgc tattatttac ttgaaatgaa 60
agactgcgga ggctaactat gtcaaaaatc atgaacctca ttacttatga taagcttctt 120
aaaaacataa cagcaattca cataaacctc atatgttctg atacattcaa aatcccttta 180
tgaagcggct gaaaaaacg catcatttat gatatgcttc tccacgcata atcttaaatg 240
ctctatacac ttgctcaatt aacacaaccc gcatcatttg atgtgggaat gtcattttgc 300
tgaatgatag tgcgtagtta ctgcgttgta agacgtcctt gtgcaggccg tttgatccgc 360
caatgacgaa tacaaagtcg ctttgccctt gggtcatgcg ttggttcaat tcttgggcca 420
atccttcgga agatagcatc tttcttgta tttctaagt aatgactgtg gattgtggtt 480
taattttggc tagtattcgt tggccttctt ttt 513

```

10 <210> 80
 <211> 411
 <212> ADN

<213> Staphylococcus aureus

15 <400> 80

```

ttgcttcac tataagtatt cagtataaag aatatttcgc tattatttac ttgaaatgaa 60
agactgcgga ggctaactat gtcaaaaatc atgaacctca ttacttatga taagcttctt 120
cacgcataat cttaaatgct ctatacactt gctcaattaa cacaaccgac atcatttgat 180
gtgggaatgt cattttgctg aatgatagtg cgtagtact gcgttgtaag acgtccttgt 240
gcaggccggt tgatccgcca atgacgaata caaagtcgct ttgcccttgg gtcatgctt 300
ggttcaattc ttgggccaat ccttcggaag atagcatctt tctttgtatt tctaagttaa 360
tgactgtgga ttgtggttta attttgcta gtattcgttg gccttctttt t 411

```

<210> 81

ES 2 403 587 T3

<211> 595
 <212> ADN
 <213> Staphylococcus aureus

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (39)..(39)
 <223> n e s a , c , g ó t

10 <400> 81

```

cattcttct tgattccatt agtttaaatt taaaattnt catacaattt cttaatttaa    60
ttgtagttcc ataatcaata taatttgtag agttattata tattctagat catcaatagt    120
tgaaaaatgg ttattaaac actctataaa catcgtatga tattgcaagg tataatccaa    180
tatttcatat atgtaattcc tccacatctc attaaatttt taaattatac acaacctaata  240
ttttagtttt atttatgata cgcttctcca cgcataatct taaatgctct gtacacttgt    300
tcaattaaca caaccgcat catttgatgt gggaaatgca ttttgctgaa tgatagtgcg    360

tagttactgc gttgtaagac gtccttgtgc aggccgtttg atccgccaat gacgaataca    420
aagtcgcttt gcccttgggt catgcgttgg ttcaattctt gggccaatcc ttcggaagat    480
agcatctttc cttgtatttc taatgtaatg actggtgatt gtggttgat tttggctagt    540
attcgttggc cttcttttcc ttttacttgc tcaatttgc tttgctctc atatt          595
  
```

<210> 82
 <211> 388
 <212> ADN
 <213> Staphylococcus aureus

15

<400> 82

```

tccatctcta ctttattggt ttcttcaaat attatctcgt aatttacctt gttcattaaa    60
caaaaaactg gataaaaaac cgcattcatt gtggtagcct tctccacgca taatcttaaa    120
tgctctgtac acttgttcaa ttaacacaac ccgcatcatt tgatgtggga atgtcatttt    180
gctgaatgat agtgcgtagt tactgcgttg taagacgtcc ttgtgcaggc cgtttgatcc    240
gccaatgacg aatacaaagt cgctttgccc ttgggtcatg cgttggttca attcttgggc    300
caatccttcg gaagatagca tctttccttg tatttctaata gtaatgactg ttgattgtgg    360
tttgattttg gctagtattc gttggcct
  
```

20

<210> 83
 <211> 479
 <212> ADN
 <213> Staphylococcus aureus

25

<400> 83

```

agatgcctat aaactaacia ttacaaatta ttatTTTgtg tttcacatta taatatatca      60
actagaatta attcTTaata aaaagtaatc attaaaattt aataaaactct gctttatatt      120
ataaaattac ggctgaaata accgcatcat ttatgatatg cttctcctcg cataatctta      180
aatgctctat acacttgTtc aattaacaca acccgcatca tttgatgtgg gaatgtcatt      240
ttgctgaatg atagtgcgta gttactgcgt tgtaagacgt ccttgtgcag gccgTTTgat      300
ccgccaataa cgaatacaaa gtcgctTtgc ccttgggtca tgcgTtggTt caattctTgg      360
gccaatcctt cggaaagatag catctTtctt tgtatttcta atgtaatgac tgtggattgt      420
ggTTTgattt tggctagtat tcgTtggcct tctTtTtctt ttactTgctc gatttctTt      479

```

<210> 84

<211> 475

<212> ADN

5 <213> Staphylococcus aureus

<400> 84

```

aaaaagaagt cgatttacac accatgtatt aaataatgga aattcTTaat ctttactTgt      60
acctaaatta tcaaactTaa tattcactTt ttattctTca aagattTgag ctaattTaat      120
aattTtctca tattTttag ttttattTgt ggtacgctTc tcctcgcata atctTaaatg      180
ctctatacac ttgttcaatt aacacaacc ccatcattTg atgtgggaat gtcattTtgc      240
tgaatgatag tgcgtagtta ctgcgTtTgta agacgTcctt gtgcaggccg tttgatccgc      300
caataacgaa taaaaagtcg cttTgcctTt gggTcatgCg ttggtTcaat tctTgggcca      360
atcctTcgga agatagcatc tttcctTgta tttctaattg aatgactTgT gattTgtgTt      420
tgattTtggc tagtattcgt tggcctTctt tttctTttac ttgctcgatt tctTt      475

```

10 <210> 85

<211> 477

<212> ADN

<213> Staphylococcus aureus

15 <400> 85

```

caaaaaatat atttactTta gtcaaatcat cttcactagt gtaattatcg aatgattTat      60
aactaacatt ttctaattta tttaacataa aatcaatcct ttttatattt aaaatatatt      120

atacacaatc cgTTTTttag ttttattTat gatacgctTc tccacgcata atctTaaatg      180
ctctatacac ttgttcaatt aacacaacc ccatcattTg atgtgggaat gtcattTtgc      240
taaatgatag tgcatagTta ctgcgTtTgta agacgTcctt gtgcaggccg tttgatccgc      300
caatgacgaa taaaaagtcg cttTgcctTt gggTcatgCg ttggtTcaat tctTgggcca      360
atcctTcgga agatagcatc tttcctTgta tttctaattg aatgactTgT gattTgtgTt      420
tgattTtggc tagtattcgt tggcctTctt tttctTttac ttgctcaatt tctTtgt      477

```

<210> 86

<211> 643

<212> ADN

20 <213> Staphylococcus aureus

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> n = c or g
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (322)..(322)
 <223> n = c ó t
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (323)..(323)
 <223> n = c ó g
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (339)..(339)
 <223> n = c ó t
 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (345)..(345)
 <223> n = a ó g
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (354)..(354)
 <223> n = c ó t
 <220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (387)..(387)
 <223> n = a ó g
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (402)..(402)
 <223> n = a ó g
 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (414)..(414)
 <223> n = a ó g
 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (423)..(423)
 <223> n = a ó g
 <220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (471)..(471)
 <223> n = a ó t
 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (516)..(516)
 <223> n = g ó t
 <220>
 <221> misc_feature
 60 <222> (570)..(570)
 <223> n = g ó t
 <220>
 <221> misc_feature
 65 <222> (582)..(582)
 <223> n = a ó g

ES 2 403 587 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (584)..(584)
 5 <223> n = t ó ninguno

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (627)..(627)
 10 <223> n = a ó g

 <400> 86

 tttgcttcac tataagtatt nagtataaag aatatttcgc tattatttac ttgaaatgaa 60
 agactgcgga ggctaactat gtcaaaaatc atgaacctca ttacttatga taagcttctt 120
 aaaaacataa cagcaattca cataaacctc atatgttctg atacattcaa aatcccttta 180
 tgaagcggct gaaaaaacg catcatttga tatgcttctt aaaaacataa cagcaattca 240
 cataaacctc atatgttctg atacattcaa aatcccttta tgaagcggct gaaaaaacg 300
 catcatttat gatatgcttc tnnacgcata atcttaaang ctctntacac ttgntcaatt 360
 aacacaaccc gcatcatttg atgtggnaat gtcattttgc tnaatgatag tgcntagtta 420
 ctncgttgta agacgtcctt gtgcaggccg tttgatccgc caatgacgaa nacaagtcg 480
 ctttgcctt gggcatgcg ttggttcaat tcttngcca atccttcgga agatagcatc 540
 tttccttgta tttctaattg aatgactgtn gattgtggtt tnannttggc tagtattcgt 600
 15 tggccttctt tttcttttac ttgctcnatt tctttgtcgc tca 643

 <210> 87
 <211> 23
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> TP mec 1
 25
 <400> 87
 aagtcgctt gcccttgggt cat 23

 <210> 88
 <211> 25
 30 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> TP mec 2
 35
 <400> 88
 tgctcaatta acacaaccg catca 25

 <210> 89
 <211> 33
 40 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> MB mec 1
 45
 <400> 89

gccgcgctgc tcaattaaca caacccgcg ggc 33

5 <210> 90
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> MB mec 2

<400> 90
 gccgcgcatg cgttggtca attctgcg gc 32

15 <210> 91
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> SARM CI 4

<400> 91
 ccagcagaat gccaacca 18

25 <210> 92
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> SARM directo RE2 sentido

<400> 92
 tgaaatgaaa gactgcgag 20

35 <210> 93
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> SARM directo RE3 sentido

<400> 93
 ccacatctca ttaaatttt aaattataca c 31

45 <210> 94
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> SARM directo RE7 sentido

55 <400> 94
 caatccttt tatatttaa atatattata cac 33

60 <210> 95
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> SARM directo inv.

65 <400> 95

caaggaaga tgctatcttc cg 22

<210> 96

<211> 19

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

10

<223> SARM directo Fluos sin marcaje

<400> 96

aagtcgcttt gcccttggg 19

<210> 97

15

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20

<223> SARM directo Red 610 sin marcaje

<400> 97

catgcgttgg ttcgattctt g 21

25

<210> 98

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

30

<223> SARM directo IC Red 670 sin marcaje

<400> 98

ccagcagaat gccagccaat 20

35

REIVINDICACIONES

1. Método de detección de la presencia o ausencia de *S. aureus* resistente a metilicina (SARM) en una muestra, comprendiendo el método:
- 5 (a) la realización de una etapa de amplificación que comprende poner en contacto la muestra con un conjunto de cebadores de SARM con el fin de producir un producto de amplificación en el caso de que SARM se encuentre presente en la muestra,
- 10 (b) la realización de una etapa de hibridación que comprende poner en contacto el producto de amplificación de la etapa (a) con una pareja de sondas de SARM, en la que una primera sonda de SARM se marca con una pareja de sondas de SARM con una fracción fluorescente donadora y en la que una segunda sonda de SARM de la pareja de sondas de SARM se marca con una fracción fluorescente aceptora correspondiente, y
- 15 (c) la detección de la presencia o ausencia de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) entre la fracción fluorescente donante de la primera sonda de SARM y la fracción fluorescente aceptora de la segunda sonda de SARM, en la que la presencia de FRET es indicativa de la presencia de SARM en la muestra, y en la que la ausencia de FRET es indicativa de la ausencia de SARM en la muestra,
- 20 en el que el método es capaz de detectar cada uno de los casetes cromosómicos estafilocócicos (*SCCmec*) de tipos I a V del SARM, y en el que el conjunto de cebadores comprende:
- (i) un cebador específico para SARM tipo RE2, es decir, un cebador que consiste de la secuencia de ácidos nucleicos 5'-TGA AAT GAA AGA CTG CGG AG -3' (SARM directo RE2 sentido; SEC ID nº 92);
- 25 y
- (ii) un cebador específico para SARM tipo RE3, es decir un cebador que consiste de la secuencia de ácidos nucleicos 5'-CCA CAT CTC ATT AAA TTT TTA AAT TAT ACA C -3' (SARM directo RE3 sentido; SEC ID nº 93);
- y
- 30 (iii) un cebador específico para SARM tipo RE7, es decir un cebador que consiste de la secuencia de ácidos nucleicos 5'-CAA TCC TTT TTA TAT TTA AAA TAT ATT ATA CAC -3' (SARM directo RE7 sentido; SEC ID nº 94).
2. Método según la reivindicación 1, en el que el conjunto de cebadores comprende además un cebador adicional específico para *S. aureus* resistente a la metilicina (SARM), así como *S. aureus* sensible a la metilicina (SASM).
3. Método según la reivindicación 2, en el que el cebador adicional comprende o consiste de la secuencia de ácidos nucleicos 5'-CAA GGA AAG ATG CTA TCT TCC G -3' (SARM directo inv.; SEC ID nº 95).
- 35 4. Método según la reivindicación 1 ó 3,
- en el que el conjunto de cebadores consiste de, como máximo, 4 ó 5 cebadores, y/o
- 40- en el que el conjunto de cebadores comprende o consiste de SARM directo RE2 sentido, SARM directo RE3 sentido y SARM directo RE7 sentido y un cebador inverso.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el cebador inverso es SARM directo inv.
- 45 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que por lo menos una sonda de la pareja de sondas comprende o consiste de una fracción fluorescente y una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada de entre el grupo que consiste de:
- 5'-AAG TCG CTT TGC CCT TGG G -3' (SARM directo Fluos sin marcaje; SEC ID nº 96), y
- 50- 5'-CAT GCG TTG GTT CGA TTC TTG -3' (SARM directo Red 610 sin marcaje; SEC ID nº 97).
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la primera sonda, que incluye el primer marcaje, es 5'-AAG TCG CTT TGC CCT TGG G -3'-fluoresceína (SARM directo Fluos), y en el que la segunda sonda, que incluye el segundo marcaje, es LC-Red 610-5'-CAT GCG TTG GTT CGA TTC TTG -3' (SARM Red 610 directo).
- 55 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7,
- en el que los elementos de la pareja de sondas de SARM se hibridan con el producto de amplificación separados por no más de cinco, cuatro o tres nucleótidos.
- 60- y/o en la que:
- (a) la fracción fluorescente donadora es fluoresceína, y/o
- (b) en la que la fracción fluorescente aceptora se selecciona de entre el grupo que consiste de LC-Red 610, LC-Red 640, LC-Red 670, LC-Red 705, Cy5 y Cy5.5
- 65 9. Método de detección de la presencia o ausencia de *S. aureus* resistente a metilicina (SARM) en una muestra,

comprendiendo el método:

- 5 (a) la realización de una etapa de amplificación que comprende poner en contacto la muestra con un conjunto de cebadores de SARM con el fin de producir un producto de amplificación en el caso de que SARM se encuentre presente en la muestra,
 (b) la realización de una etapa de hibridación que comprende poner en contacto el producto de amplificación de la etapa (a) con una sonda de SARM, en la que la sonda de SARM se marca con una fracción fluorescente donadora y con una fracción fluorescente aceptora correspondiente, y
 10 (c) la detección de la presencia o ausencia de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) entre la fracción fluorescente donadora y la fracción fluorescente aceptora de la sonda de SARM, en la que la presencia o ausencia de FRET es indicativa de la presencia o ausencia de SARM en la muestra,
 en el que el método es capaz de detectar cada uno de los casetes cromosómicos estafilocócicos (*SSCmec*) tipos I a V del SARM, y en el que el conjunto de cebadores es tal como se define en las reivindicaciones 1 a 6.

15 10. Método según la reivindicación 9,

- a) en el que la sonda comprende o consiste de dos fracciones fluorescentes,
 b) en el que la sonda comprende o consiste de dos fracciones fluorescentes,
 20 en la que la fracción fluorescente donadora es la fluoresceína, y/o en la que la fracción fluorescente aceptora se selecciona de entre el grupo que consiste de LC-Red 610, LC-Red 640, LC-Red 670, LC-Red 705, Cy5 y Cy5.5,
 c) en el que la etapa de amplificación utiliza un enzima polimerasa que presenta actividad de exonucleasa 5' a 3', d) en el que las fracciones fluorescentes donadora y aceptora se encuentran separadas por no más de 5 nucleótidos en la sonda, e) en el que la sonda comprende una secuencia de ácidos nucleicos que permite la formación de estructura secundaria, en la que la formación de estructura secundaria resulta en la proximidad espacial de las
 25 fracciones fluorescentes donadora y aceptora, y/o f) en el que la fracción fluorescente aceptora es un extintor.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10,

- a) en el que la etapa de detección comprende excitar la muestra a una longitud de onda absorbida por la fracción fluorescente donadora y visualizar y/o medir la longitud de onda emitida por la fracción fluorescente aceptora,
 30 b) en el que la detección comprende cuantificar la FRET,
 c) en el que la presencia de FRET en 55, 45 ó 35 ciclos es indicativa de la presencia de SARM en la muestra,
 d) en el que la etapa de detección se lleva a cabo tras cada etapa de amplificación e hibridación y/o en tiempo real,
 e) que comprende además determinar la temperatura de fusión entre una o ambas sondas y el producto de
 35 amplificación de la etapa (a), en la que la temperatura de fusión confirma la presencia o la ausencia de SARM,
 f) que comprende además:

prevenir la amplificación de un ácido nucleico contaminante,

40 g) que comprende además:

prevenir la amplificación de un ácido nucleico contaminante mediante la realización de la etapa de amplificación (a) en presencia de uracilo y tratar la muestra con uracil-ADN-glucosilasa previamente a una primera etapa de amplificación,

- 45 h) en el que el método se lleva a cabo en una muestra de control,
 i) en el que la muestra es una muestra biológica, y/o
 j) en el que la muestra se selecciona de entre el grupo que consiste de un hisopo de una herida infectada, un hisopo de piel, un hisopo nasal, un hisopo de garganta, un hisopo de ingle, un hisopo de axila, un hisopo del sitio de un dispositivo invasivo, un hisopo del sitio de posible infección, un líquido corporal, una muestra de sangre, una muestra de orina y un hisopo de perineo.

12. Composición que comprende un conjunto de cebadores según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

55 13. Composición según la reivindicación 12, que comprende además una sonda y/o una pareja de sondas según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 ó 12.

14. Kit que comprende:

- 60 (a) un conjunto de cebadores según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5,
 (b) una pareja de sondas según la reivindicación 6 ó 8 ó una sonda según la reivindicación 10, y (c) una fracción fluorescente donadora y una fracción fluorescente correspondiente de marcaje de la sonda o sondas, en el que el kit es capaz de detectar cada uno de los casetes cromosómicos estafilocócicos (*SCCmec*) de tipos I a V de SARM.

65 15. Kit según la reivindicación 14,

- 5 a) que resulta adecuado para llevar a cabo el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11,
 b) que comprende además una etiqueta en el paquete o material impreso en el mismo con instrucciones de utilización del conjunto de cebadores de SARM y de la pareja de sondas de SARM para detectar la presencia o ausencia del mismo en una muestra, y/o
 c) que comprende además uracil-ADN-glucosilasa y/o una ADN polimerasa y/o un tampón adecuado.

RE2:

TTTGCTTCACTATAAGTATTCAGTATAAAGAATATTTTCGCTATTATTTACTT
GAAATGAAAGACTGCGGAGGCTAACTATGTCAAAAATCATGAACCTCATTAC
 TTATGATAAGCTTCTTAAAAACATAACAGCAATTCACATAAACCTCATATGT
 TCTGATACATTCAAAATCCCTTTATGAAGCGGCTGAAAAAACCGCATCATTT
 GATATGCTTCTTAAAAACATAACAGCAATTCACATAAACCTCATATGTTCTG
 ATACATTCAAAATCCCTTTATGAAGCGGCTGAAAAAACCGCATCATTTATGA
 TATGCTTCTCC orfX →

RE3:

CATTCTTTCTTGATTCCATTAGTTTAAATTTAAAATTTTCATCATCAATTTCT
 TAATTTAATTGTAGTTCCATAATCAATATAATTTGTACAGTTATTATATATT
 CTAGATCATCAATAGTTGAAAAATGGTTTATTAAACACTCTATAAACATCGT
 ATGATATTGCAAGGTATAATCCAATATTTTCATATATGTAATTCCTCCACATC
 TCATTAAATTTTAAATTATACACAACCTAATTTTATAGTTTATTATGATA
CGCTTCTCC orfX →

RE7:

CAAAAATATATTTACTTTAGTCAAATCATCTTCACTAGTGTAATTATCGAA
 TGATTTATAACTAACATTTTCTAATTTATTTAACATAAAATCAATCCTTTTT
 ATATTTAAAATATATTATACACAATCCGTTTTTTAGTTTTATTATGATACG
 CCTCTCC orfX →

orfX (SEC ID nº 77):

CCACGCATAATCTTAAATGCTCTGTACACTTGTTCAATTAACACAACCCGCA
 TCATTTGATGTGGGAATGTCATTTTGCTGAATGATAGTGCGTAGTTACTGCG
 TTGTAAGACGTCTTGTGCAGGCCGTTTGATCCGCCAATGACGAATACAAAG
TCGCTTTGCCCTTGGGT CATGCGTTGGTTCAATTCTTGGGCCAATCCTTCGG
AAGATAGCATCTTTCCTTGTATTTCTAATGTAATGACTGTTGATTGT

Fig. 1

(SEC ID n° 86)

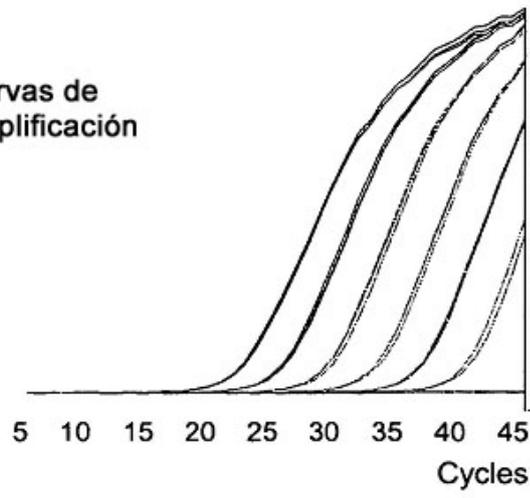
TTGCTTCAC TATAAGTATT CAGTATAAAG AATATTTTCG TATTATTAC
 G(1)
 TTGAAATGAA AGACTGCGGA GGCTAACTAT GTCAAAAATC ATGAACCTCA
 TTACTIONTATGA TAAGCTTCTT AAAAACATAA CAGCAATTCA CATAAACCTC
 ATATGTTCTG ATACATTCAA AATCCCTTTA TGAAGCGGCT GAAAAACCG
CATCATTGA TATGCTTCTT AAAAACATAA CAGCAATTCA CATAAACCTC
ATATGTTCTG ATACATTCAA AATCCCTTTA TGAAGCGGCT GAAAAACCG
CATCATTAT GATATGCTTC TCGACGCATA ATCTTAAATG CTCTATACAC
 (3)TG(1) C(1) G(7)
 TTGCTCAATT AACACAACCC GCATCATTG ATGTGGGAAT GTCATTTGC
 T(8) A(2)
 TGAATGATAG TCGTAGTTA CTGCGTTGTA AGACGTCCTT GTGCAGGCCG
 A(1) A(1) A(3)
 TTTGATCCGC CAATGACGAA TACAAAGTCG CTTTGCCTT GGGTCATCG
 A(3)
 TTGTTCAAT TCTTGGGCCA ATCCTTCGGA AGATAGCATC TTTCTTGTA
 T(1)
 TTTCTAATGT AATGACTGTG GATTGTGGTT TAATTTTGGC TAGTATTCTG
 T(3) (9)G : (1)
 TGGCCTTCTT TTTCTTTTAC TTGCTCAATT TCTTTGTCGC TCA
 G(2)

Fig. 2

Fig. 3

A

Curvas de
amplificación



B

Picos de fusión

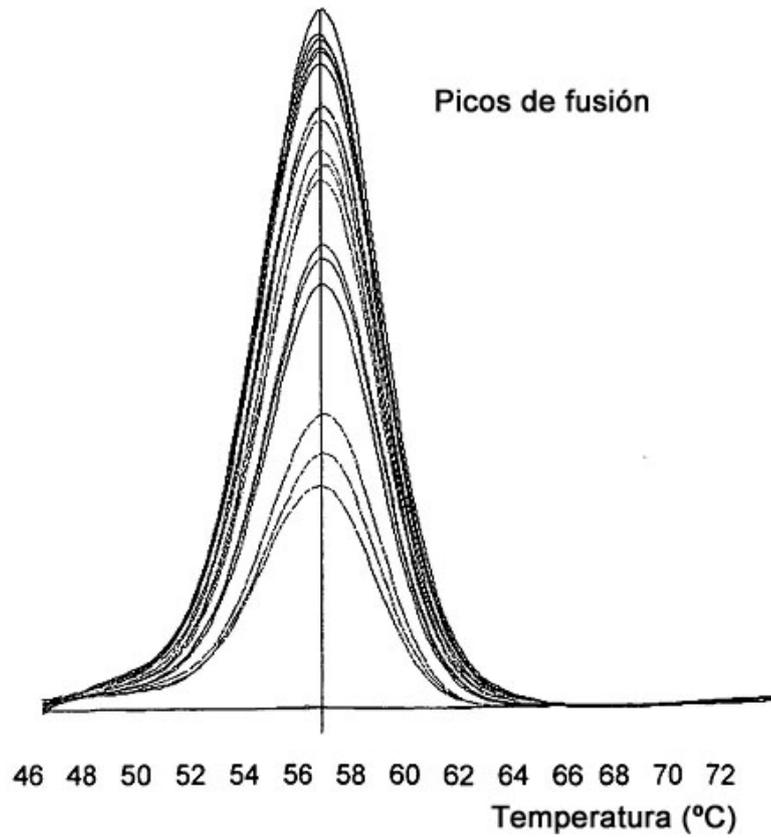
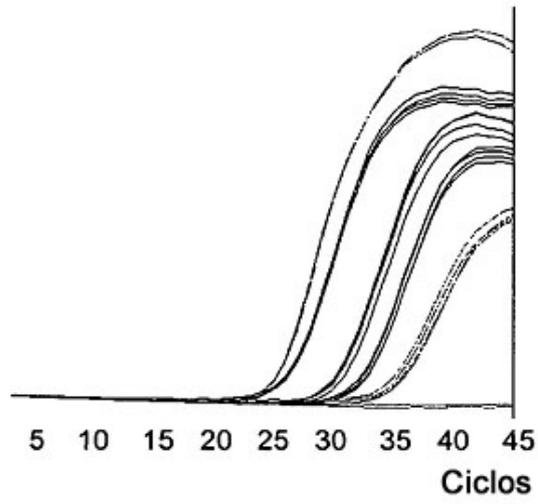


Fig. 4

A



B

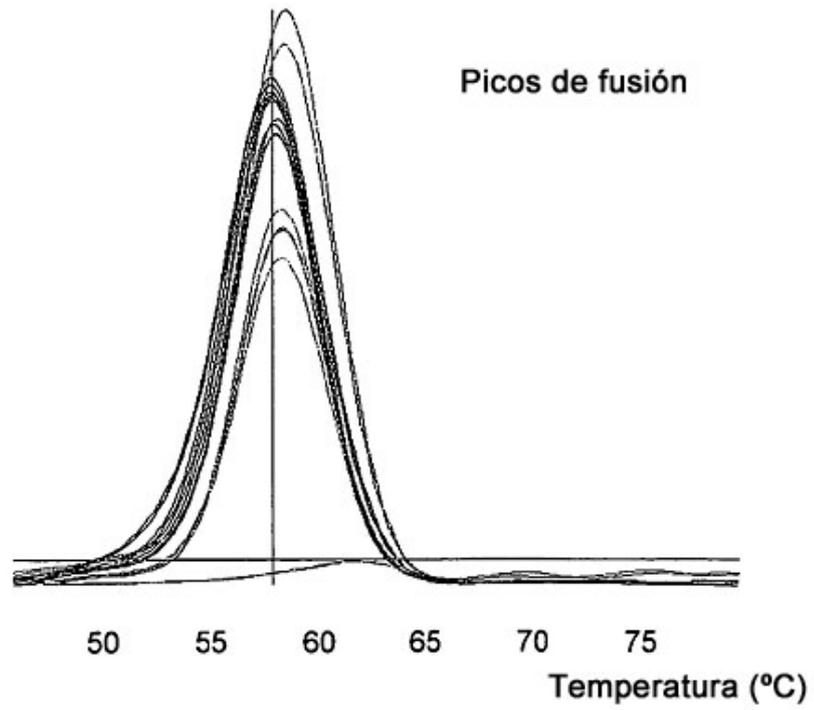
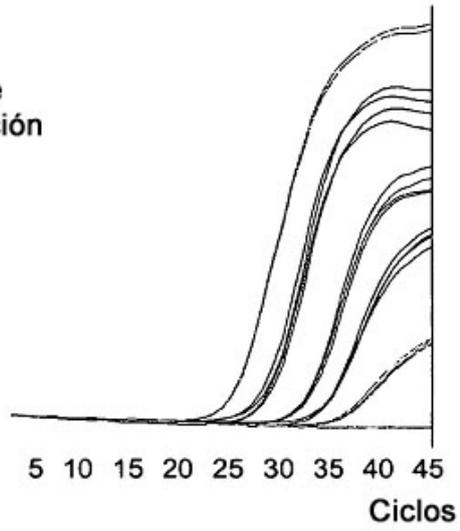


Fig. 5

A

Curvas de
amplificación



B

Picos de fusión

