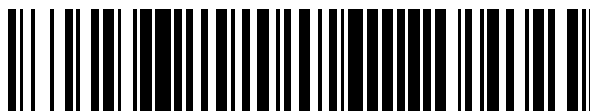


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 267**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/48** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2008** **E 08868000 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2013** **EP 2231869**

54 Título: **Detección de Staphylococcus aureus resistente a meticilina**

30 Prioridad:

**21.12.2007 US 8680 P**

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

**14.10.2013**

73 Titular/es:

**BIOMERIEUX SA (100.0%)  
100 RODOPHE STREET  
DURHAM, NC 27712, US**

72 Inventor/es:

**JAY, CORINNE;  
DEIMAN, BIRGIT;  
VAN STRIJP, DIANNE y  
VAN DE WIEL, PAUL**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 425 267 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Detección de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

## Campo de la invención

La presente invención se refiere a la detección molecular de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA).  
 5 Más particularmente, la presente invención se refiere a una detección mejorada de MRSA que reduce los resultados falsos positivos.

## Antecedentes de la invención

El *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) es un patógeno intrahospitalario, pero también  
 10 extrahospitalario, importante que puede causar graves infecciones tales como infecciones de heridas quirúrgicas, neumonía, endocarditis y septicemia. La resistencia a meticilina es debida a la presencia del gen *mecA* que codifica una proteína de unión a penicilina modificada, PBP2a o PBP2', con afinidad reducida por fármacos  $\beta$ -lactámicos. El gen *mecA* está portado por un módulo llamado SCCmec ("Staphylococcal Cassette Chromosome mec"; Ito *et al.*, 2001, Antimicrob. Agents Chemother. 5(5): 1323-1336; Hiramatsu, *et al.*, 2001, Trends Microbiol. oct; 9(10): 486-93), un elemento móvil que puede incorporarse al cromosoma de *S. aureus* y otros estafilococos negativos de coagulasa,  
 15 principalmente *S. epidermidis* y *S. haemolyticus*. SCCmec se caracteriza por la presencia de repeticiones terminales inversas y directas, un conjunto de genes de recombinasa específicos de sitio (*ccrA* y *ccrB*) y el complejo del gen *mecA* (Ito *et al.*, 1999, Antimicrob. Agents Chemother. 43: 1449-1458; Katayama *et al.*, 2000, Antimicrob. Agents Chemother. 44: 1549-1555). El sitio de inserción de este módulo SCCmec del gen *mecA* en el genoma de *Staphylococcus aureus* es conocido y la secuencia está conservada (Ito *et al.*, 2001, Antimicrob. Agents Chemother. 45: 1323-1336). Después de la inserción en el cromosoma de *S. aureus*, el SCCmec tiene una región de conexión del extremo izquierdo y una región de conexión del extremo derecho (véase la FIGURA 1), donde la secuencia de SCCmec es contigua a la secuencia cromosómica de *S. aureus*. Se ha analizado anteriormente la secuencia nucleotídica de las regiones que rodean los límites izquierdo y derecho del ADN de SCCmec (concretamente, *attL* y *attR*, respectivamente), así como aquellas de las regiones alrededor del sitio de integración de ADN de SCCmec  
 20 (concretamente, *attBsc*, el sitio de enlazamiento de cromosoma bacteriano para ADN de SCCmec). El análisis de secuencia de estos sitios de integración reveló que *attBsc* está localizado en el extremo 3' de un marco de lectura abierto (ORF) novedoso, *orfX*. *orfX* codifica un presunto polipéptido de 159 aminoácidos que exhibe homología de secuencia con algunos polipéptidos anteriormente identificados de función desconocida (Ito *et al.*, 1999, Antimicrob. Agents Chemother. 43: 1449-1458). Se ha estudiado adicionalmente la organización de la región *mecA* de SCCmec  
 25 (Oliveira, D.C., *et al.*, 2000, Antimicrob. Agents Chemother. 44(7): 1906-1910).

El MRSA puede portarse por personas sanas sin causar la enfermedad, pero estos portadores sanos, cuando entran en un hospital, pueden contaminar a pacientes hospitalizados. Adicionalmente, un paciente puede contaminarse a sí mismo, por ejemplo, si experimenta cirugía aumenta el riesgo de infección. Los portadores sanos de MRSA constituyen un reservorio de MRSA y debe efectuarse el cribado de estos portadores para erradicar las cepas  
 35 mediante descontaminación local. El cribado de MRSA está reconocido actualmente como una herramienta importante para reducir la prevalencia de MRSA en el mundo. Típicamente, en un ensayo de MRSA en un paciente, se toma un frotis nasal del paciente y se cultiva repetidamente, para determinar si está presente una cepa de MRSA. La necesidad de cultivar podría obviarse mediante un ensayo para identificar MRSA directamente del frotis nasal. Los procedimientos de identificación de cultivo requieren típicamente como mínimo 24 horas, y más típicamente 72  
 40 horas, para obtener resultados. Los nuevos medios cromogénicos (que tienen uno o varios sustratos en los medios y, típicamente, antibiótico (por ejemplo cefoxitina) para seleccionar las cepas resistentes a meticilina) pueden limitar potencialmente este tiempo hasta el resultado a un periodo de tiempo de 24-48 horas. Sin embargo, en el caso de infección por MRSA, se requieren resultados en cuestión de horas, puesto que el paciente debería aislarse hasta obtener los resultados. Por lo tanto, es altamente deseable una prueba de MRSA molecular fiable que pueda  
 45 proporcionar resultados en cuestión de 2-4 horas.

La amplificación es una técnica bien conocida, y se han desarrollado diversos procedimientos que incluyen amplificación basada en la transcripción, tal como amplificación mediada por la transcripción (TMA; patentes de EE.UU. nº 5.766.849, 5.399.491, 5.480.784, 5.766.849 y 5.654.142) y amplificación basada en secuencias de ácido nucleico (NASBA; documentos 5.130.238, 5.409.818, 5.654.142 y 6.312.928), y tecnologías de amplificación de  
 50 ácidos nucleicos por ciclado (termociclado) tales como reacción en cadena de la polimerasa (PCR; patentes de EE.UU. nº 4.683.195, 4.965.188, 4.683.202) y reacción en cadena de la ligasa (LCR; patente de EE.UU. nº 5.792.607). Los procedimientos de amplificación conocidos incluyen también la amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), la replicación de secuencia automantenida (3SR), la replicasa Q- $\beta$  y la amplificación en círculo rodante en cascada (CRCA).

Los procedimientos de detección que utilizan ácidos nucleicos son también bien conocidos en la materia. Los ácidos nucleicos a menudo se marcan con diversos fines de detección. Por ejemplo, los procedimientos descritos en las patentes de EE.UU. nº 4.486.539 (Kourlisky), 4.411.955 (Ward), 4.882.269 (Schneider) y 4.213.893 (Carrico), ilustran la preparación de sondas de detección marcadas para detectar secuencias de ácido nucleico específicas. Se han descrito también diseños de sonda para diferentes procedimientos de detección, tales como captura de diana,

HPA, TAQman, balizas moleculares e hibridación de tipo sándwich (por ejemplo, patentes de EE.UU. nº 4.486.539 y 4.751.177, 5.210.015, 5.487.972, 5.804.375, 5.994.076). Las técnicas y condiciones de hibridación de ácidos nucleicos son conocidas por el experto en la materia y se han descrito, por ejemplo, en Sambrook *et al.* "Molecular Cloning A Laboratory Manual", 2ª Ed. Cold Spring Lab. Press, diciembre de 1989; patentes de EE.UU. nº 4.563.419 (Ranki) y 4.851.330 (Kohne) y en Dunn, *et al.*, Cell 12, pág. 23-26 (1978) entre otras muchas publicaciones. Son también conocidos diseños de sonda para diferentes procedimientos de detección, tales como de captura de diana, HPA, TaqMan, balizas moleculares e hibridación de tipo sándwich (por ejemplo, patentes de EE.UU. nº 4.486.539 y 4.751.177, 5.210.015, 5.487.972, 5.804.375, 5.994.076).

Se han descrito procedimientos moleculares anteriores para detectar e identificar MRSA basándose en la detección del gen *mecA* y de secuencias cromosómicas específicas de *S. aureus* (Saito *et al.*, 1995, J. Clin. Microbiol. 33: 2498-2500; Ubukata *et al.*, 1992, J. Clin. Microbiol. 30: 1728-1733; Murakami *et al.*, 1991, J. Clin. Microbiol. 29: 2240-2244; Hiramatsu *et al.*, 1992, Microbiol. Immunol. 36: 445-453). Sin embargo, los resultados positivos de la presencia en una muestra tanto del gen *mecA* como de secuencias cromosómicas de *S. aureus* no pueden garantizar que el MRSA esté presente puesto que, por ejemplo, en pruebas basadas en la detección de *mecA* y marcadores específicos de *S. aureus*, pueden observarse falsos positivos en presencia de MSSA y estafilococos negativos de coagulasa resistentes a meticilina que poseen el gen *mecA*. Además, en pruebas basadas en la detección de solo la conexión del módulo, se han observado falsos positivos con aislamientos de *S. aureus* sensibles a meticilina que contienen un pequeño fragmento del extremo derecho de SCC*mec* (véase Rupp, J. *et al.*, J. Clin. Microbiol. 44(6): 2317 (2006)). Adicionalmente, Ramakrishnan y Riccelli describen un procedimiento para la detección de MRSA que utiliza sondas oligonucleotídicas que tienen secuencias que son complementarias de regiones cercanas a la conexión izquierda del sitio de inserción del módulo SCC*mec*, incluyendo parte de la secuencia del módulo SCC*mec* y parte de la secuencia de *S. aureus* en la región de inserción (la región de conexión del extremo izquierdo) (publicación de patente de EE.UU. nº US20060057613). Zhang *et al.* J. Clin. Microbiol. 43(10): 5026-5033 (2005) describen un procedimiento de PCR múltiple para detectar MRSA usando cebadores orientados al gen *mecA* y al módulo SCC*mec* de tipo I, II, III, IV y V.

Sin embargo, los intentos anteriores de determinar MRSA mediante procedimientos moleculares han tenido dificultades por los resultados falsos positivos. Dichos resultados se ha postulado que son el resultado de cualquiera de: la presencia de una población mixta en las frotis, la presencia en un MSSA de un fragmento del extremo derecho de SCC*mec* residual después de la delección del gen *mecA* y/o amplificación no específica. Hasta la fecha, se han publicado dos conceptos para determinar la resistencia a meticilina portada específicamente por *S. aureus*:

- el concepto de amplificación de la conexión del extremo derecho de SCC*mec* (Hiramatsu *et al.* WO97/31125; EP 0.887.424; patente de EE.UU. nº 6.156.507 y además Huletsky y Roszbach WO02/099034 (2002); Huletsky *et al.* J. Clin. Microbiol. 42(5): 1875-1884 (2004));

- el concepto de inmunoenriquecimiento descrito por François y colaboradores (François, P *et al.* J. Clin. Microbiol. 41(1): 254-260 (2003); WO02/082086), en que el inmunoenriquecimiento es seguido por la amplificación de tres marcadores (gen *mecA*, marcador específico de *S. aureus* y marcador específico de *S. epidermidis*).

El concepto de conexión del extremo derecho de SCC*mec* está basado en la amplificación de la región que cubre la región de conexión del extremo derecho del sitio de integración de SCC*mec*. El principio es el siguiente: el módulo SCC*mec* integra siempre el cromosoma de *S. aureus* en 5' de un marco de lectura abierto específico de *S. aureus* llamado *orfX*; el ensayo de PCR combina múltiples cebadores de codificación localizados en la parte derecha del módulo, un cebador inverso y una sonda de baliza, ambos localizados en el *orfX* cromosómico de *S. aureus*, concretamente, en 5' de la conexión del extremo derecho de SCC*mec* con *orfX* ("región de conexión del extremo derecho" de *orfX*). Hiramatsu *et al.* describen una prueba con dos cebadores de codificación en la región de conexión del extremo derecho del módulo para amplificar los tipos de SCC*mec* principales descritos en ese momento (un cebador para los tipos I y II de SCC*mec* y un segundo cebador para el tipo III). Huletsky *et al.* exponen que no se detectaban varias cepas de MRSA si se usaban solo los dos cebadores de codificación descritos por Hiramatsu, y determinaron nuevos tipos de módulos llamados tipos de MREJ que tienen variaciones de secuencia en la parte derecha del módulo SCC*mec*. Una prueba comercialmente disponible (Infectio Diagnostics Inc.) combina (véase la figura 1) cinco cebadores de codificación localizados en la parte derecha del módulo (un cebador se diseñó para la detección de los tipos i y ii de MREJ y los otros cuatro para los tipos iii, iv, v y vi de MREJ), un cebador inverso localizado en el *orfX* y tres balizas genéricas que cubren la misma porción de la región *orfX* y son necesarias para identificar las variantes de *orfX* identificadas. Esta prueba se efectúa por PCR instantánea. Sin embargo, la especificidad de esta prueba como se ha reseñado (Huletsky *et al.* 2004) muestra que un 4,6% de MSSA (26 de 569 ensayados) se identificaban erróneamente. Se han reseñado también resultados falsos positivos con otra prueba comercial que usa un ensayo de PCR de un solo locus (conexión del extremo derecho del módulo SCC*mec-orfX*) (Rupp, J, *et al.*, J. Clin. Microbiol. (44)6: 2317 (2006)).

Por tanto, los falsos positivos siguen siendo un problema, y existe una gran necesidad de una prueba de MRSA mejorada para reducir los resultados falsos positivos obtenidos con las pruebas actuales. El reto de dicha prueba es que, debido a la presencia de una población mixta en los frotis nasales, pueden estar presentes las siguientes mezclas: uno o más de (1) MRSA, (2) estafilococos negativos de coagulasa sensibles a meticilina (por ejemplo, *Staphylococcus epidermidis* sensibles a meticilina (MSSE)), (3) *Staphylococcus aureus* sensibles a meticilina

(MSSA) y (4) estafilococos negativos de coagulasa resistentes a meticilina (MR-CNS) (principalmente *Staphylococcus epidermidis* resistentes a meticilina (MRSE)). Además, se ha informado de aislamientos clínicos de MSSA que retienen elementos de SCCmec sin el gen *mecA*. (Donnio, P. -Y., et al., J. Clin. Microbiol. agosto de 2005; 43(8): 4191-4193). Debido a que solo la presencia de MRSA conducirá a la descontaminación del portador, la prueba debe asegurar que la resistencia a meticilina es portada por *S. aureus* y no por *S. epidermidis* (o cepa de estafilococos negativa de coagulasa). Por tanto, no es apropiada la amplificación y detección del gen *mecA* (asociado o no con un marcador específico de *S. aureus*) directamente en la población mixta presente en los frotis; es más, en ambas situaciones (MRSA+MSSE o MSSA+MRSE), se detectarán ambos marcadores (*mecA* y marcador específico de *S. aureus*), mientras que se desea que solo la primera situación con un MRSA sea detectada específicamente por el facultativo. La presente invención trata las fuentes primarias de falsos positivos de MRSA y proporciona por tanto una prueba mejorada muy necesitada para detectar MRSA que no se ha tratado por las pruebas actualmente disponibles.

### Sumario de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento de detección en una muestra de un *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) que tiene una inserción de un módulo SCCmec en el ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, que comprende efectuar en la muestra una reacción de amplificación y detección que utiliza

- a. un primer cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo del módulo SCCmec,
- b. un segundo cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo de ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* y
- c. una sonda capaz de hibridar específicamente con una región del módulo SCCmec entre la región con que el primer cebador es capaz de hibridar y la conexión,

en el que cada uno del primer cebador y el segundo cebador está orientado de tal modo que, en las condiciones de amplificación, se amplifica la conexión, y

- en el que, si la muestra contiene MRSA, se detecta la hibridación de la sonda. En dichos procedimientos como se exponen en la presente memoria, "un/a" cebador, sonda, etc. puede significar uno o más cebadores o sondas, a menos que se afirme otra cosa o el contexto dicte otra cosa.

La presente invención se refiere adicionalmente a un procedimiento de detección en una muestra de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) que tiene una inserción de un módulo SCCmec en el ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, que comprende

- (a) efectuar en la muestra una reacción de amplificación y detección que detecta la presencia de una conexión de un módulo SCCmec insertado y ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* utilizando
  - 1) un primer cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo del módulo SCCmec,
  - 2) un segundo cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, y
  - 3) una primera sonda capaz de hibridar específicamente con una región del módulo SCCmec entre la región con que el primer cebador es capaz de hibridar y la conexión,

en el que cada uno del primer cebador y el segundo cebador está orientado de tal modo que, en las condiciones de amplificación, se amplifica la conexión, y

- (b) efectuar en la muestra una reacción de amplificación y detección que detecte la presencia del gen *mecA*,

en el que si la muestra contiene MRSA, se detecta la presencia tanto de la conexión diana como de *mecA* en la muestra.

La presente invención se refiere además a un procedimiento de detección en una muestra de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) que tiene una inserción de un módulo SCCmec en el ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, que comprende

efectuar en la muestra una reacción de amplificación múltiple en la que la reacción comprende

a. amplificar y detectar la presencia de una conexión de un módulo SCCmec insertado y ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* utilizando

- 1) un primer cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo del módulo

SCCmec,

2) un segundo cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo de ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, y

5 3) una primera sonda capaz de hibridar específicamente con una región del módulo SCCmec entre la región con que el primer cebador es capaz de hibridar y la conexión,

en el que cada uno del primer cebador y el segundo cebador está orientado de tal modo que, en las condiciones de amplificación, se amplifica la conexión y

b. amplificar y detectar la presencia del gen *mecA*,

10 en el que si la muestra contiene MRSA, se detecta la presencia tanto de la conexión diana como de *mecA* en la muestra.

Adicionalmente, la presente invención proporciona un procedimiento de detección en una muestra de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) que tiene una inserción de un módulo SCCmec en el ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, comprendiendo el procedimiento

15 a. efectuar en una muestra una reacción de amplificación que puede amplificar simultáneamente tanto (1) una conexión de un módulo SCCmec insertado y ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* como (2) una región de *mecA*,

en el que se efectúa la amplificación de la conexión utilizando

1) un primer cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo del módulo SCCmec,

20 2) un segundo cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo de ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, y

3) una primera sonda capaz de hibridar específicamente con una región del módulo SCCmec entre la región con que el primer cebador es capaz de hibridar específicamente y la conexión,

25 en el que cada uno del primer cebador y el segundo cebador está orientado de tal modo que, en las condiciones de amplificación, se amplifica la conexión y

b. detectar, en los productos de la amplificación, la presencia o ausencia de cada uno de la conexión y *mecA*,

en el que si la muestra contiene MRSA, se detecta la presencia tanto de la conexión como de *mecA* en la muestra.

30 La presente invención proporciona además un procedimiento de identificación de la presencia en una muestra de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) que tiene una inserción de un módulo SCCmec en el ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, que comprende las etapas de:

poner en contacto en un solo recipiente la muestra biológica con

(a) un primer conjunto de oligonucleótidos que comprende

(1) un primer oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico que hibrida específicamente con una región de conexión del extremo de un módulo SCCmec, y

35 (2) un segundo oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico que hibrida específicamente con una región de ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* que flanquea dicho módulo SCCmec, formando un primer producto de reacción de la muestra y el primer y segundo oligonucleótidos, y

(b) un segundo conjunto de nucleótidos que comprende

40 (3) un tercer oligonucleótido que tiene una secuencia nucleotídica que hibrida específicamente con una primera región del ácido nucleico de *mecA*, y

(4) un cuarto oligonucleótido que tiene una secuencia nucleotídica que hibrida específicamente con una segunda región del ácido nucleico de *mecA*, formando un segundo producto de reacción de la muestra y el tercero y cuarto oligonucleótidos; e

45 identificar la presencia de MRSA detectando tanto el primero como el segundo productos de reacción. La etapa de identificación puede comprender, en una realización, poner en contacto el primer y segundo productos de reacción con (1) una primera sonda capaz de hibridar específicamente con el primer producto de reacción y (2) una segunda sonda capaz de hibridar específicamente con el segundo producto de reacción.

La presente invención proporciona adicionalmente kits para uso en dichos procedimientos. Específicamente, la presente invención proporciona un kit para la detección de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) que tiene una inserción de un módulo SCCmec en el ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, que comprende

(a) un primer cebador capaz de hibridar específicamente con una conexión del extremo del módulo SCCmec,

5 (b) un segundo cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo derecho de ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, y

(c) una sonda seleccionada del grupo consistente en (1) una sonda capaz de hibridar específicamente principalmente con una región del módulo SCCmec entre la región con que el primer cebador es capaz de hibridar y la conexión y (2) una sonda capaz de hibridar específicamente del todo con una región del módulo SCCmec entre la  
10 región con que el primer cebador es capaz de hibridar y la conexión,

en el que cada uno del primer cebador y el segundo cebador está orientado de tal modo que, en las condiciones de amplificación, se amplifica la conexión. Además, el kit puede comprender:

a) un primer conjunto de oligonucleótidos de amplificación y detección que comprende

15 1) un primer cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo del módulo SCCmec,

2) un segundo cebador capaz de hibridar específicamente con el ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* en una región de la conexión del extremo y

3) una primera sonda capaz de hibridar específicamente del todo con una región del módulo SCCmec entre la región con que el primer cebador es capaz de hibridar y la conexión,

20 en el que cada uno del primer cebador y el segundo cebador está orientado de tal modo que, en las condiciones de amplificación, se amplifica la conexión, y

b) un segundo conjunto de oligonucleótidos de amplificación y detección que comprende

4) un tercer cebador capaz de hibridar específicamente con una primera región de *mecA*,

5) un cuarto cebador capaz de hibridar específicamente con una segunda región de *mecA*, y

25 6) una segunda sonda capaz de hibridar específicamente con una región de *mecA* entre la primera y la segunda regiones de *mecA*,

en el que cada uno del tercer cebador y el cuarto cebador está orientado de tal modo que, en las condiciones de amplificación, se amplifica la región de *mecA* entre la primera y segunda regiones de *mecA*.

La presente invención proporciona adicionalmente una composición oligonucleotídica que comprende:

30 (1) un primer oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico que hibrida específicamente con una región de conexión del extremo del módulo SCCmec,

(2) un segundo oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico que hibrida específicamente con una región de ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* que flanquea dicho módulo SCCmec; y

35 (3) una primera sonda capaz de hibridar específicamente con una región del módulo SCCmec entre la región con que el primer cebador es capaz de hibridar y la conexión.

La composición nucleotídica puede comprender además:

(4) un tercer oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico que hibrida específicamente con una primera región del ácido nucleico de *mecA*;

40 (5) un cuarto oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico que hibrida específicamente con una segunda región del ácido nucleico de *mecA*, y

(6) una segunda sonda capaz de hibridar específicamente con una región de *mecA* entre la primera y la segunda regiones de *mecA*.

### Breve descripción de los dibujos

45 La figura 1 muestra en general la región del cromosoma de MRSA con el módulo SCCmec insertado, indicando las conexiones del extremo izquierdo y derecho.

La figura 2 demuestra en general la localización de cebadores y sondas en la región de conexión del extremo derecho de *SCCmec/orfX*, en la que cinco cebadores 2 ("5P2", flechas) están localizados en la parte derecha del módulo, un cebador 1 genérico ("P1T7") está localizado en el *orfX* de *S. aureus* y una baliza genérica ("MB") está localizada en el *orfX* de *S. aureus* ("enfoque 1").

- 5 La figura 3 demuestra en general la localización de cebadores y sondas para un procedimiento de la invención para la detección de la conexión del extremo derecho de la inserción de *SCCmec* en MRSA: se usan cinco cebadores 2 ("P2", flechas) localizados en la región de conexión del extremo derecho de *SCCmec*, un cebador 1 ("P1", línea en ángulo) localizado en *orfX* y cinco sondas específicas (líneas) localizadas en la parte derecha del módulo *SCCmec* ("enfoque 2").
- 10 La figura 4 demuestra la amplificación múltiple de *mecA* y la conexión del extremo derecho con los siguientes cebadores y sondas: en *mecA*, cebador 1 ("P1"), cebador 2 ("P2") y sonda ("baliza"); en la "región de conexión derecha de *SCCmec*-cromosoma", región de conexión del extremo derecho, cebador 1 ("P1", línea con ángulo), cinco cebadores 2 ("5P2", flechas) y cinco sondas específicas de *SCCmec* ("5 balizas específicas", líneas con ángulo en ambos extremos).

## 15 Descripción detallada de la invención

- Como se discute en la presente memoria, la presente invención proporciona que la identificación de falsos positivos mediante los procedimientos moleculares anteriores pueda explicarse en algunos casos por la presencia en cepas de MSSA de un fragmento del extremo derecho de *SCCmec* residual después de la delección de la región cromosómica que contiene *mecA* o por la presencia de un SCC que no contiene *mecA*. Adicionalmente, como se da a conocer además en la presente memoria, la presente invención proporciona que cierta parte de los falsos positivos pueda ser debida a una amplificación no específica, es más (como se muestra en la figura 2), debido a que el cebador inverso y las balizas están localizadas en el *orfX*, que es común tanto a MRSA como a MSSA, la asociación no específica del cebador o cebadores de codificación en el cromosoma de MSSA conducirá a la amplificación y detección de MSSA. La presente invención trata ambas fuentes de falsos positivos y proporciona una prueba mejorada.

- A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen los mismos significados que se entienden comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece la invención dada a conocer. Aunque pueden usarse cualquier procedimiento y material similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria para la práctica o ensayo de la presente invención, los procedimientos, dispositivos y materiales preferidos son como se describen.

- Como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen las referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente otra cosa.

- Como se afirma anteriormente, la presente invención proporciona soluciones para reducir la falta de especificidad debida a la detección de MSSA reseñada con los procedimientos de detección anteriores, pudiendo utilizarse dichas soluciones individualmente o, idealmente, en la misma prueba. Por tanto, la presente invención describe el uso de balizas específicas (específicas del módulo *SCCmec*) en lugar de balizas genéricas; esta configuración suprimirá la detección de MSSA amplificado debido a amplificación no específica. Además, la presente invención describe la ventaja de combinar en una reacción múltiple la detección del gen *mecA* con la detección de la región de inserción del módulo (por ejemplo, la región de conexión derecha de *SCCmec*-cromosoma), en comparación con la detección de la región de inserción del módulo sola; este aspecto de la invención puede reducir la detección de MSSA debida a la presencia de un fragmento del extremo derecho de *SCCmec* residual después de la delección de la región cromosómica que contiene *mecA* o a la presencia de un SCC que no contiene *mecA*.

- En una realización preferida, la presente invención proporciona un procedimiento de detección en una muestra de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) que tiene una inserción de un módulo *SCCmec* en el ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, que comprende

efectuar en la muestra una reacción de amplificación y detección utilizando

- a. un primer cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo del módulo *SCCmec*,
- b. un segundo cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo de ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* y
- c. una sonda capaz de hibridar específicamente con una región del módulo *SCCmec* entre la región con que el primer cebador es capaz de hibridar y la conexión,

- en el que cada uno del primer cebador y segundo cebador está orientado de tal modo que, en las condiciones de amplificación, se amplifica la conexión, y en el que, si la muestra contiene MRSA, se detecta la hibridación de la sonda.

La estructura genómica del MRSA se ha caracterizado anteriormente. Como se usa en las reivindicaciones, el “módulo SCCmec” (al que a veces se hace referencia como “mecDNA”, por ejemplo en Hiramatsu, patente de EE.UU. nº 6.156.507) tiene la definición conocida en la materia, concretamente, un ADN fortuito integrado existente en un cromosoma de MRSA o MR-CNS y que incluye el complejo del gen *mec*, un conjunto de genes de recombinasa específicos de sitio (*ccrA* y *ccrB*) y repeticiones terminales inversas y directas (en ambos extremos 3' y 5'). “Gen *mecA*” incluye todas las secuencias necesarias para codificar PBP2a o PBP' (proteína de unión a penicilina) que confieren resistencia a meticilina.

Como es conocido en la materia, la inserción del módulo SCCmec en el cromosoma de *S. aureus* crea dos conexiones, y dos regiones de conexión correspondientes, del ADN de SCCmec con el ADN cromosómico de *S. aureus*, en la que la secuencia de SCCmec está contigua a la secuencia cromosómica de *S. aureus*. Las conexiones, por lo tanto, están localizadas en los extremos izquierdo y derecho del módulo SCCmec (véase la FIGURA 1). Estas dos regiones se llaman “conexión derecha de SCCmec-cromosoma” y “conexión izquierda de cromosoma-SCCmec” por Ito *et al.* (Antimicrob. Agents Chemother. mayo de 2001 45(5): 1323-1336, “Structural Comparison of three Types of Staphylococcal Cassette Chromosome mec Integrated in the chromosome in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus”). En la conexión del extremo derecho, la secuencia genómica de *S. aureus* que linda con el módulo SCCmec es el gen *orfX*, al que se hace referencia en alguna bibliografía como “IntM”. Como se usa en las reivindicaciones, “región de conexión del extremo” es una región del módulo SCCmec o del ácido nucleico cromosómico de *S. aureus* a una distancia de la conexión del extremo derecho o izquierdo, o del sitio de inserción, tal que un cebador pueda, en una primera reacción de extensión o reacción de tipo transcripción (por ejemplo, NASBA o TMA), extenderse a lo largo de esa conexión, por ejemplo, a 600 nt, 550 nt, 500 nt, 450 nt, 400 nt, 350 nt, 300 nt, 250 nt, 200 nt, 150 nt, 100 nt o 50 nt (en cualquier dirección) de la conexión. Las distancias útiles pueden variar dependiendo de la tecnología de amplificación usada (por ejemplo, pueden ser distancias más largas cuando se desarrollen tecnologías nuevas). “Región de conexión del extremo”, por lo tanto, dependiendo del contexto usado, puede hacer referencia a una región en el ADN de SCCmec o a una región en el ADN cromosómico de *S. aureus*; ambos usos hacen referencia a aquel ADN a una distancia de la conexión tal que un cebador seleccionado apropiadamente pueda, en condiciones de extensión o amplificación estándares, extenderse o transcribirse a partir de la misma en la dirección de la conexión a lo largo de la conexión. Es decir, una “región de conexión del extremo del módulo SCCmec” sería una región en el ADN de SCCmec cerca de su linde, o sitio de integración, con el ADN cromosómico de *S. aureus* y “una región de conexión del extremo de *orfX*” sería una región en el ADN de *orfX* cerca de la linde con el ADN de SCCmec (sitio de integración de SCCmec). De forma similar, una “región de conexión del extremo de ADN cromosómico de *S. aureus*” sería una región en el ADN cromosómico de *S. aureus* cerca de la linde con el ADN de SCCmec. Como alternativa, puede hacerse referencia a esta región también como “ADN cromosómico de *S. aureus* en la región de conexión del extremo de SCCmec”. Por tanto, “región de conexión del extremo derecho” hace referencia a la región que rodea la conexión en el lado derecho del módulo SCCmec, y “región de conexión del extremo izquierdo” hace referencia a la región que rodea la conexión en el lado izquierdo del módulo SCCmec (véase la figura 1).

Para proporcionar además un procedimiento útil para detectar MRSA, la presente invención se refiere a una amplificación y una detección que detecta tanto la presencia de una conexión de inserción de SCCmec como de secuencias de *mecA*. Más específicamente, la presente invención se refiere adicionalmente a un procedimiento de detección en una muestra de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) que tiene una inserción de un módulo SCCmec en el ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, que comprende

(a) efectuar en la muestra una reacción de amplificación y detección que detecta la presencia de una conexión de un módulo SCCmec insertado y ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* utilizando

1) un primer cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo del módulo SCCmec,

2) un segundo cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo de ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* y

3) una primera sonda capaz de hibridar específicamente con una región del módulo SCCmec entre la región con la que el primer cebador es capaz de hibridación y la conexión,

en el que cada uno del primer cebador y segundo cebador está orientado de tal modo que, en las condiciones de amplificación, se amplifica la conexión, y

(b) efectuar en la muestra una reacción de amplificación y detección que detecta la presencia del gen *mecA*,

en el que si la muestra contiene MRSA, se detecta la presencia tanto de la conexión diana como de *mecA* en la muestra.

Dicho procedimiento es particularmente útil para discriminar MRSA de aquellos, bastante raros, MSSA de los que se ha eliminado *mecA*, pero no el módulo SCCmec completo.

Ventajosamente, puede efectuarse una reacción de amplificación múltiple para detectar tanto la presencia de una

conexión de inserción de SCCmec como de secuencias de *mecA*. Por tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento de detección en una muestra de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) que tiene una inserción de un módulo SCCmec en el ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, que comprende

efectuar en la muestra una reacción de amplificación múltiple en la que la reacción de amplificación comprende

- 5 a. amplificar y detectar la presencia de una conexión de un módulo SCCmec insertado y ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* utilizando

1) un primer cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo del módulo SCCmec,

- 10 2) un segundo cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo de ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, y

3) una primera sonda capaz de hibridar específicamente con una región del módulo SCCmec entre la región con la que el primer cebador es capaz de hibridar y la conexión,

en el que cada uno del primer cebador y el segundo cebador está orientado de tal modo que, en las condiciones de amplificación, se amplifica la conexión, y

- 15 b. amplificar y detectar la presencia del gen *mecA*,

en el que si la muestra contiene MRSA, se detecta la presencia tanto de la conexión diana como de *mecA* en la muestra.

- Se entiende por “amplificar la conexión” efectuar una reacción de amplificación que produzca un producto de amplificación que incluya secuencias correspondientes a ácidos nucleicos tanto en SCCmec lindando con la conexión como en ADN cromosómico de *S. aureus* lindando con la misma conexión. Se entiende por “amplificar y detectar la presencia del gen *mecA*” amplificar y detectar en la muestra cualquier porción del gen *mecA*, por ejemplo, la región entre cebadores que comprende una secuencia de ácido nucleico expuesta en las SEQ ID NO: 15 y 16 (que puede detectarse, por ejemplo, utilizando una sonda que comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 14). Los cebadores y sondas pueden diseñarse fácilmente para hibridación con la secuencia de *mecA* conocida.
- 20  
25

- El término “reacción de amplificación múltiple” significa que se ponen en contacto entre sí reactivos específicos para la amplificación de más de una diana, de tal modo que pueda ocurrir más de una amplificación en el mismo recipiente de reacción. Adicionalmente, pueden incluirse reactivos de detección para más de una diana. Por tanto, puede realizarse una reacción de amplificación y detección múltiple poniendo en contacto todos los reactivos específicos para la amplificación y detección de más de una diana. Por tanto, en una reacción múltiple, pueden amplificarse múltiples regiones diana en la misma reacción. La “amplificación simultánea”, en la que se permiten evolucionar reacciones individuales al mismo tiempo, pero los reactivos para más de una reacción de amplificación no están necesariamente todos en el mismo recipiente o tubo de reacción, sino que pueden llevarse a cabo más de una reacción en recipientes de reacción separados, puede utilizarse también si no se desea o no es factible la múltiple. Se entiende que, incluso en una reacción de amplificación múltiple, cada reacción ocurrirá al ritmo que las reacciones individuales evolucionen en las condiciones proporcionadas. La detección puede ser también “simultánea”, lo que significa que, si se incluyen sondas apropiadas para cada reacción en el recipiente de reacción, en las condiciones apropiadas puede conseguirse la detección de más de una diana en un solo recipiente de reacción (múltiple) o en más de un recipiente de reacción (sondas apropiadas distribuidas en los recipientes de reacción relevantes). Dicha detección puede efectuarse, si se desea, en el mismo recipiente de reacción que la reacción de amplificación múltiple o simultánea, y además, puede efectuarse mientras continúan las reacciones de amplificación (concretamente, instantáneamente).
- 30  
35  
40

- Por tanto, la presente invención proporciona un procedimiento de detección en una muestra de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) que tiene una inserción de un módulo SCCmec en el ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, comprendiendo el procedimiento
- 45

a. efectuar en una muestra una reacción de amplificación múltiple que puede amplificar tanto (1) una conexión de un módulo SCCmec insertado y ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* como (2) una región de *mecA*,

en el que la amplificación de la conexión se efectúa utilizando

- 1) un primer cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo del módulo SCCmec,
- 50

2) un segundo cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo de ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, y

3) una primera sonda capaz de hibridar específicamente con una región del módulo SCCmec entre la región con la

que el primer cebador es capaz de hibridar y la conexión,

en el que cada uno del primer cebador y el segundo cebador está orientado de tal modo que, en las condiciones de amplificación, se amplifica la conexión, y

b. detectar, en los productos de amplificación, la presencia o ausencia de cada uno de la conexión y *mecA*,

- 5 en el que si la muestra contiene MRSA, se detecta la presencia tanto de la conexión como de *mecA* en la muestra.

Esta sonda puede seleccionarse para hibridar específicamente del todo con la región de *SCCmec*. La presencia o ausencia de conexión o *mecA* puede determinarse efectuando cualquier análisis que proporcione la detección del producto, por ejemplo, si se usa una sonda marcada, la detección del marcador hibridado por el dispositivo de detección apropiado. La falta de una señal detectable indica la ausencia de la diana, la percepción de una señal detectable indica la presencia de la diana.

Los cebadores y sondas usados en una reacción de esta invención son capaces de hibridar específicamente con un ácido nucleico diana. La hibridación específica es conocida en la materia y, típicamente, se consigue la hibridación específica mediante la identidad o alta similitud del ácido nucleico del cebador/sonda con el ácido nucleico diana y/o mediante el uso de condiciones de hibridación rigurosas (por ejemplo, condiciones de temperatura y/o salinas rigurosas). La hibridación específica proporciona una hibridación selectiva con la diana en la reacción.

Un cebador "orientado de tal modo que, en las condiciones de amplificación, se amplifica la conexión" incluye un cebador orientado de tal modo que, tras la hibridación con su ácido nucleico diana específico, y tras el inicio de una reacción de amplificación que incluye el cebador, se forme un amplicón que incluye la conexión. Dicha reacción se diseña para amplificar a lo largo de la conexión (concretamente, para estar en proximidad suficientemente cercana de la conexión para que una reacción de amplificación típica se extienda a lo largo de la conexión). Por tanto, un par cebador útil para amplificar una conexión hibridará típicamente con dos regiones que rodean la conexión, y cada cebador se orientará para hibridar en la dirección 5'-3' hacia la conexión. Típicamente, el cebador se diseñará para hibridar a 600 nt, 500 nt, 400 nt, 350 nt, 300 nt, 250 nt, 200 nt, 150 nt, 100 nt, 50 nt, 30 nt, 25 nt, 20 nt, etc. de la conexión. Por lo tanto, para detectar un producto de amplificación se selecciona una sonda que sea capaz de hibridar específicamente con una región del módulo *SCCmec* entre la región con que el primer cebador es capaz de hibridar y la conexión. En ciertas realizaciones, dicha sonda puede hibridar específicamente del todo o principalmente con el módulo *SCCmec*. En una realización, en que la sonda hibrida específicamente principalmente con el módulo *SCCmec*, la región con que la sonda hibrida puede incluir adicionalmente la conexión y, por lo tanto, al menos uno o dos o tres o unos pocos nucleótidos de *orfX* que lindan con la conexión. Si uno, dos, tres o unos pocos nucleótidos de la sonda hibridan con una región de *orfX* que linda con la conexión, la sonda será capaz, sin embargo, de hibridar específicamente, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 91%, al menos un 92%, al menos un 93%, al menos un 94%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, o al menos un 99% de sus nucleótidos, preferiblemente contiguos, con una región del módulo *SCCmec* entre la región con que el primer cebador es capaz de hibridar y la conexión. Por tanto, para una amplificación de la región de conexión del extremo derecho, la sonda se selecciona para hibridar específicamente con una región del módulo *SCCmec* que esté en 3' del extremo 3' del cebador del módulo *SCCmec* (cuando se hibrida) y en 5' de la conexión. Típicamente, el cebador se selecciona de tal modo que el producto de amplificación sintetizado utilizando el mismo y un segundo cebador (localizado en la secuencia genómica de *S. aureus*) sean de aproximadamente 200-350 nt de longitud. Aunque puede diseñarse una amplificación por PCR para generar amplicones más largos (por ejemplo, de 250, 300, 350, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 nt), las longitudes de amplicón preferidas para reacciones basadas en la transcripción (por ejemplo, NASBA o TMA) o de tipo PCR serán de aproximadamente 200-300 nt (por ejemplo, de 150, 200, 250 y 300 nt) de longitud. Adicionalmente, para una reacción de amplificación múltiple, tanto basada en la transcripción como basada en la PCR, es preferible un amplicón en el intervalo de 200-300 nt o menor, para potenciar la sensibilidad del ensayo.

Como se usa en las reivindicaciones, "condiciones de amplificación" son aquellas apropiadas para una reacción de amplificación seleccionada, como son conocidas por los expertos en la materia, tales como las utilizadas en diversas reacciones de amplificación. Dichas condiciones pueden optimizarse para una reacción, cebadores, etc. específicos como es también conocido por el experto en la materia. Como es conocido, dichas condiciones de amplificación incluyen el contacto con los reactivos requeridos para la amplificación, por ejemplo, nucleótidos y enzimas, así como las condiciones de temperatura, salinas y de pH seleccionadas apropiadas, entre otros aspectos. Además, como se usa en las reivindicaciones, un cebador o sonda puede ser un conjunto de cebadores o sondas, concretamente múltiples cebadores o sondas. Dichos conjuntos de cebador/sonda pueden utilizarse en una reacción en que se desee amplificar y/o detectar más de un tipo o subtipo de MRSA, y en la que la secuencia de ácido nucleico de la región de MRSA diana seleccionada para hibridación del cebador y/o sonda varíe entre los tipos y/o subtipos. Los cebadores/sondas individuales pueden diseñarse para cada tipo o subtipo, como se ejemplifica en la presente memoria.

Los cebadores específicos útiles para amplificar regiones de conexión del extremo pueden diseñarse fácilmente, dadas las enseñanzas de la presente memoria. Los cebadores para hibridar con la región del extremo derecho de *SCCmec* pueden incluir los cebadores expuestos en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 y 6, así como cebadores que

comprenden estas secuencias y cebadores consistentes esencialmente en estas secuencias. Los cebadores específicos para hibridar con *orfX* pueden incluir el cebador expuesto en la SEQ ID NO: 13, así como un cebador que comprenda esta secuencia y un cebador consistente esencialmente en esta secuencia. Las sondas para hibridar con la región del extremo derecho de *SCCmec* pueden incluir las sondas expuestas en las SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11 y 12, así como sondas que comprendan estas secuencias y sondas consistentes esencialmente en estas secuencias. Los cebadores para hibridar con *mecA* pueden incluir los cebadores expuestos en las SEQ ID NO: 15 y 16, así como cebadores que comprendan estas secuencias y cebadores consistentes esencialmente en estas secuencias. Cualquiera puede adaptarse fácilmente como de tipo P1 o de tipo P2 (para amplificaciones de tipo NASBA). Las sondas para hibridar con *mecA* pueden incluir la sonda expuesta en la SEQ ID NO: 14, así como sondas que comprenden esta secuencia y sondas consistentes esencialmente en esta secuencia.

La presente divulgación proporciona además un procedimiento de identificación de la presencia en una muestra de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) que tiene una inserción de un módulo *SCCmec* en el ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, que comprende las etapas de:

poner en contacto en un solo recipiente la muestra biológica con

a. un primer conjunto de oligonucleótidos que comprende

(1) un primer oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico que hibrida específicamente con una región de conexión del extremo de un módulo *SCCmec*, y

(2) un segundo oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico que hibrida específicamente con una región de ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* que flanquea dicho módulo *SCCmec*, formando un primer producto de reacción de la muestra biológica y el primer y segundo oligonucleótidos, y

b. un segundo conjunto de oligonucleótidos que comprende

(3) un tercer oligonucleótido que tiene una secuencia nucleotídica que hibrida específicamente con una primera región del ácido nucleico de *mecA*, y

(4) un cuarto oligonucleótido que tiene una secuencia nucleotídica que hibrida específicamente con una segunda región del ácido nucleico de *mecA*, formando un segundo producto de reacción de la muestra biológica y el tercer y cuarto oligonucleótidos; e

identificar la presencia de MRSA detectando tanto el primero como el segundo productos de reacción. El primero y segundo productos de reacción pueden formarse mediante una reacción de amplificación. Las condiciones en las que se ponen en contacto los reactivos con la muestra pueden ser condiciones apropiadas para una reacción de amplificación seleccionada. La etapa de identificación puede comprender, en un aspecto, poner en contacto el primero y segundo productos de reacción con (1) una primera sonda capaz de hibridar específicamente con el primer producto de reacción, si está presente, y (2) una segunda sonda capaz de hibridar específicamente con el segundo producto de reacción, si está presente.

Como se usa en la presente memoria, un oligonucleótido que “tiene” una secuencia de ácido nucleico incluida en la porción de ADN diana significa que la secuencia tiene suficiente identidad con la secuencia de ADN diana, o su complemento, para hibridar específica y selectivamente con ese ADN diana en condiciones de hibridación rigurosas. Incluye secuencias de ácido nucleico que tienen una identidad de secuencia completa con la secuencia. En un solo recipiente, pueden incluirse todos los componentes de una mezcla de reacción, adaptados al procedimiento de amplificación y detección utilizado. Por tanto, una “mezcla de reacción” puede incluir todos los reactivos necesarios para efectuar una reacción, que pueden incluir, pero sin limitación, agentes de tamponación para mantener el pH a un nivel seleccionado durante la reacción, sales, cofactores, secuestrantes y similares.

Generalmente, las reacciones de amplificación que producen amplicones (el producto de la reacción de amplificación de un polinucleótido) están “activadas por molde” porque el apareamiento de bases de los reactivos, nucleótidos u oligonucleótidos, tiene complementos en un polinucleótido de molde que son necesarios para la creación de los productos de reacción. En un aspecto, las reacciones activadas por molde son extensiones de cebador con una polimerasa de ácido nucleico o ligamientos de oligonucleótido con una ligasa de ácido nucleico. La amplificación puede incluir cualquier procedimiento conocido o recién diseñado de amplificación, incluyendo aquellos usados en los procedimientos publicados (por ejemplo, amplificación basada en la transcripción tal como amplificación mediada por la transcripción (TMA) y amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico NASBA (como se ejemplifica en la presente memoria), y tecnologías de amplificación de ácido nucleico por ciclado (termociclado) tales como reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR con transcriptasa inversa (PCR-TI) y reacción en cadena de la ligasa (LCR) y cualquier procedimiento de amplificación, por ejemplo, replicación de secuencia mantenida (3SR), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), ADN ramificado (ADNr), tecnología de sondas cíclicas (CPT), amplificación en fase sólida (SPA), tecnología de amplificación en círculo rodante (RCA), RCA en fase sólida, SDA anclada y amplificación de señal dependiente de nucleasa (NDSA), todas las cuales son conocidas por el experto en la materia. Una reacción de amplificación puede ser “instantánea” si está disponible una química de detección que permita medir un producto de reacción a medida que progresa la reacción de

amplificación, por ejemplo, PCR instantánea o NASBA instantánea. Por tanto, esta invención incluye el uso de cualquier procedimiento de amplificación de ácido nucleico o de cualquier otro procedimiento que pueda usarse para aumentar la sensibilidad y/o rapidez de las pruebas de diagnóstico basadas en ácido nucleico. La presente invención incluye también el uso de cualquier tecnología de detección, incluyendo tecnologías de detección postamplificación, cualquier tecnología de amplificación combinada con detección, cualquier tecnología de hibridación de chips o matrices de ácido nucleico y cualquier chip de amplificación o combinación de tecnologías de chip de amplificación e hibridación. La detección e identificación mediante cualquier procedimiento de secuenciación está también dentro de la presente invención.

Aunque puede utilizarse cualquier procedimiento de amplificación adecuado para el presente ensayo, se observa que las reacciones de amplificación que utilizan una enzima de restricción, tales como NASBA-ADN, pueden contribuir a un nivel adicional de especificidad en el ensayo. Por ejemplo, si se selecciona una reacción de amplificación NASBA-ADN que tiene un P1 capaz de hibridar con la región *orfX* de *S. aureus*, el requisito de que esté presente el sitio de restricción correcto en la región genómica de *S. aureus* para que ocurra la amplificación reduce en gran medida o elimina la probabilidad de amplificación de un estafilococo negativo de coagulasa resistente a meticilina (por ejemplo, *S. epidermidis* resistente a meticilina), puesto que no debería tener el sitio de restricción requerido. Esto es particularmente útil en reacciones del “enfoque 2” de esta presente invención, en las que la sonda para detectar la conexión entre el ADN genómico bacteriano y el ADN de SCCmec se diseña para hibridar con ADN de SCCmec (o principalmente con ADN de SCCmec, en una realización, con uno, dos, tres o unos pocos nucleótidos de la sonda hibridando a lo largo de la conexión con ADN de *orfX*), en lugar de con el ADN bacteriano genómico. La combinación de estos rasgos proporciona un ensayo altamente específico de MRSA. Además, puede alcanzarse una especificidad adicional con reacciones de tipo PCR aumentando el rigor de las condiciones de hibridación de los cebadores. Por tanto, al aumentar el rigor de la reacción de amplificación seleccionada, mediante cualquier medio seleccionado, puede aumentarse la especificidad global de los ensayos de MRSA que incluyen reacciones de detección que utilizan una sonda de hibridación con SCCmec.

Además, puede realizarse la amplificación de maneras adicionales para potenciar la amplificación, por ejemplo, para reacciones de amplificación basadas en la transcripción (por ejemplo, TMA, NASBA), puede utilizarse un cebador “P1” bloqueado (concretamente portador de promotor), si se desea. Dichos cebadores bloqueados se bloquean típicamente en su extremo 3’ de la extensión de cebador mediante un resto químico, tal como dabsilo, conociéndose otros en la materia.

Pueden utilizarse en esta invención una variedad de procedimientos de detección. Los procedimientos de detección que utilizan sondas de ácido nucleico son bien conocidos en la materia. Las sondas de los presentes kits y/o para uso en los presentes procedimientos pueden marcarse mediante cualquier marcador seleccionado adecuado para el procedimiento de detección elegido, muchos de los cuales son conocidos en la materia, tales como una fosfatasa (por ejemplo, fosfatasa alcalina), biotina, avidina, una peroxidasa (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante), digoxigenina, un tinte fluorescente (tal como tintes Cy3 y Cy5, fluoresceína, FAM, ROX), un marcador luminiscente, un marcador cromofórico, un marcador radiactivo (por ejemplo, un radioisótopo) y un ligando. Pueden utilizarse diseños de sonda para diferentes procedimientos de detección, tales como captura de diana, HPA, TaqMan, balizas moleculares e hibridación de tipo sándwich. Las condiciones de hibridación pueden seleccionarse de acuerdo con el tipo de sonda y el tipo de reacción de detección seleccionada.

El presente procedimiento proporciona además kits útiles para uso en dichos procedimientos de amplificación y detección. Se proporciona específicamente un kit para la detección de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) que tiene una inserción de un módulo SCCmec en el ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, comprendiendo el kit un primer cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo del módulo SCCmec, un segundo cebador capaz de hibridar específicamente con el ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* en la región de la conexión del extremo y una sonda capaz de hibridar específicamente del todo con una región del módulo SCCmec entre la región con que el primer cebador es capaz de hibridar y la conexión, en el que cada uno del primero y segundo cebadores está orientado de tal modo que, en las condiciones de amplificación, se amplifica la conexión. En una realización preferida. La región de conexión del extremo es la región de conexión del extremo derecho. En otra realización, la región de conexión del extremo es la región de conexión del extremo izquierdo. En una realización, el primero y segundo cebadores se proporcionan en un solo recipiente. En otra realización, el primero y segundo cebadores y la sonda se proporcionan en un solo recipiente. Por tanto, un kit de la invención puede comprender un primer recipiente que comprende un primer cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo derecho del módulo SCCmec y un segundo cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo derecho del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* y un segundo recipiente que comprende una sonda capaz de hibridar específicamente del todo con una región del módulo SCCmec entre la región con que el primer cebador es capaz de hibridar y la conexión. Adicionalmente, un kit de la presente invención puede comprender un recipiente que comprende un primer cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo derecho del módulo SCCmec, un segundo cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo derecho de ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* y una sonda capaz de hibridar específicamente del todo con una región del módulo SCCmec entre la región con que el primer cebador es capaz de hibridar y la conexión.

La presente invención proporciona además, un kit para identificar la presencia en una muestra de *Staphylococcus*

*aureus* resistente a metilicina (MRSA) que tiene una inserción de un módulo *SCCmec* en el ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, que comprende:

a) un primer cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo del módulo *SCCmec*,

5 b) un segundo cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo derecho de ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, y

c) una sonda seleccionada del grupo consistente en (1) una sonda capaz de hibridar específicamente principalmente con una región del módulo *SCCmec* entre la región con que el primer cebador es capaz de hibridar y la conexión y (2) una sonda capaz de hibridar específicamente del todo con una región del módulo *SCCmec* entre la región con  
10 que el primer cebador es capaz de hibridar y la conexión,

en el que cada uno del primer cebador y el segundo cebador está orientado de tal modo que, en las condiciones de amplificación, se amplifica la conexión.

La presente invención proporciona adicionalmente un kit para identificar la presencia en una muestra de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA) que tiene una inserción de un módulo *SCCmec* en el ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, que comprende:

a) un primer conjunto de oligonucleótidos de amplificación y detección que comprende

1) un primer cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo derecho del módulo *SCCmec*,

2) un segundo cebador capaz de hibridar específicamente con el ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* en la  
20 región de conexión del extremo derecho, y

3) una primera sonda capaz de hibridar específicamente del todo, con una región del módulo *SCCmec* entre la región con que el primer cebador es capaz de hibridar y la conexión,

en el que cada uno del primer y segundo cebadores está orientado de tal modo que, en las condiciones de amplificación, se amplifica la conexión, y

b) un segundo conjunto de oligonucleótidos de amplificación y detección que comprende

4) un tercer cebador capaz de hibridar específicamente con una primera región de *mecA*,

5) un cuarto cebador capaz de hibridar específicamente con una segunda región de *mecA*, y

6) una segunda sonda capaz de hibridar específicamente con una región de *mecA* entre la primera y segunda regiones de *mecA*,

en el que cada uno del tercer cebador y cuarto cebador está orientado de tal modo que, en las condiciones de amplificación, se amplifica la región de *mecA* entre la primera y segunda regiones de *mecA*.

Una sonda capaz de hibridar específicamente "del todo" con una región del módulo *SCCmec* entre la región con que el primer cebador es capaz de hibridar y la conexión significa una sonda que hibrida solo con el módulo *SCCmec*, y que no hibrida a lo largo de la conexión, en las condiciones seleccionadas para hibridación específica. Una sonda capaz de hibridar específicamente "principalmente" con el módulo *SCCmec* significa una sonda que hibrida con el módulo *SCCmec* y puede hibridar adicionalmente a lo largo de la conexión y, por lo tanto, incluye al menos uno o dos o tres o unos pocos nucleótidos de *orfX* que lindan con la conexión. Si uno, dos, tres o unos pocos nucleótidos de la sonda hibridan con una región de *orfX* que linda con la conexión, la sonda será capaz, sin embargo, de hibridar específicamente, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 91%, al  
40 menos un 92%, al menos un 93%, al menos un 94%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, o al menos un 99% de sus nucleótidos, preferiblemente contiguos, con una región del módulo *SCCmec* entre la región con que el primer cebador es capaz de hibridar y la conexión. Una sonda que hibrida principalmente con una región del módulo *SCCmec* puede incluir una sonda que hibrida del todo con una región del módulo *SCCmec*.

Las sondas de esta invención, incluyendo aquellas incluidas en dichos kits, pueden marcarse ventajosamente para detección, como es conocido por los expertos en la materia. Los marcadores pueden seleccionarse apropiadamente para el diseño específico y el tipo de reacción de amplificación a efectuar. Los reactivos cebadores y de sonda pueden proporcionarse en cualquiera de varios estados, incluyendo secados, liofilizados, aglomerados, secados por pulverización o en líquido.

Los kits de esta invención pueden incluir elementos adicionales tales como reactivos para un procedimiento de amplificación seleccionado (por ejemplo, enzima o enzimas de amplificación, tampón o tampones y/o enzima o

enzimas de restricción, entre otros), control o controles, recipiente o recipientes de reacción y similares. En una realización específica, se proporcionan un primer, segundo, tercer y cuarto cebadores en un solo recipiente. En otra realización, se proporcionan el primer y segundo conjuntos de oligonucleótidos de amplificación y detección en un solo recipiente. Por tanto, dichos kits pueden ser útiles para efectuar amplificaciones múltiples.

- 5 En una realización, se proporciona un kit que comprende un recipiente que comprende un primer cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo, preferiblemente la región de conexión del extremo derecho, del módulo SCCmec; un segundo cebador capaz de hibridar específicamente con la región de ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* en la región de una conexión del extremo, específicamente la región de conexión del extremo derecho si el primer cebador hibrida con la región de conexión del extremo derecho; un tercer
- 10 cebador capaz de hibridar específicamente con una primera región de *mecA* y un cuarto cebador capaz de hibridar específicamente con una segunda región de *mecA*. Dicho kit puede comprender además un recipiente que comprende una primera sonda capaz de hibridar específicamente del todo con una región del módulo SCCmec entre la región con que el primer cebador es capaz de hibridar y la conexión y una segunda sonda capaz de hibridar específicamente con una región de *mecA* entre la primera y segunda regiones de *mecA*. Adicionalmente, en otra
- 15 realización de la invención, puede proporcionarse un kit que comprende un recipiente que comprende un primer cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo del módulo SCCmec, preferiblemente la región de conexión del extremo derecho; un segundo cebador capaz de hibridar específicamente con ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* en la región de una región de conexión del extremo, específicamente la región de conexión del extremo derecho si el primer cebador hibrida con la región de conexión del extremo derecho; un tercer cebador capaz de hibridar específicamente con una primera región de *mecA*; un
- 20 cuarto cebador capaz de hibridar específicamente con una segunda región de *mecA*; una primera sonda capaz de hibridar específicamente del todo con una región del módulo SCCmec entre la región con que el primer cebador es capaz de hibridar y la conexión y una segunda sonda capaz de hibridar específicamente con una región de *mecA* entre la primera y segunda regiones de *mecA*.
- 25 Un cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo derecho del módulo SCCmec puede ser un ácido nucleico que comprende una secuencia seleccionada del grupo consistente en: SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Además, dicho cebador puede consistir esencialmente en, o consistir en, una secuencia seleccionada del grupo consistente en: SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Pueden seleccionarse uno o más de dichos cebadores, en una realización preferida, se seleccionan varios cebadores, cada uno específico de un tipo diferente
- 30 de MRSA, para inclusión en un kit. Dichos cebadores son útiles en los procedimientos de esta invención.

Un cebador capaz de hibridar específicamente con ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* en la región de conexión del extremo derecho puede ser preferiblemente un cebador que es capaz de hibridar específicamente con *orfX*. Más específicamente, en una realización, este cebador puede comprender el ácido nucleico expuesto como SEQ ID NO: 13. Además, dicho cebador puede consistir esencialmente, o consistir, en el ácido nucleico expuesto

35 como SEQ ID NO: 13. Dichos cebadores son útiles en los procedimientos de esta invención.

Una sonda capaz de hibridar específicamente del todo con una región del módulo SCCmec entre la región con que el primer cebador es capaz de hibridar y la conexión puede comprender, en una realización, cinco o más sondas, cada una capaz de hibridar específicamente con un tipo diferente de MRSA. En una realización específica, dicha sonda puede comprender una secuencia seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11 y 12.

40 Además, dicha sonda puede consistir esencialmente, o consistir, en una secuencia seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11 y 12. Dichas sondas son útiles en los procedimientos de esta invención.

En ciertos kits de la invención, se incluyen cebadores y/o sondas para la detección del gen *mecA*. Dicho kit puede incluir un conjunto de cebadores específico del gen *mecA*, específicamente un primer cebador capaz de hibridar

45 específicamente con una primera región seleccionada de *mecA*, en el que el primer cebador está orientado de tal modo que, en las condiciones de amplificación, se amplifica la región de *mecA* entre la primera región de *mecA* y la segunda región seleccionada de *mecA*, y un segundo cebador capaz de hibridar específicamente con la segunda región seleccionada de *mecA*, en el que el segundo cebador está orientado de tal modo que, en las condiciones de amplificación con el primer cebador, se amplifica la región de *mecA* entre la primera región de *mecA* y la segunda

50 región de *mecA*. En una realización, estos cebadores de *mecA* pueden incluir una o ambas de las SEQ ID NO: 15 y 16. El kit puede incluir además una sonda específica de la región de *mecA* entre los dos cebadores de *mecA* seleccionados. En una realización específica, dicha sonda de *mecA* puede comprender la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 14. Además, dicha sonda de *mecA* puede consistir esencialmente en la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 14. Al proporcionar conjuntos de cebador y sonda para

55 amplificar y detectar tanto el módulo SCCmec como *mecA* en el mismo kit para uso en el mismo recipiente de reacción, puede proporcionarse un kit múltiple útil para detectar MRSA.

Se observa que las referencias a secuencias de cebador y sonda que incluyen timidina pueden adaptarse fácilmente para utilizar uridina en sustitución de la timidina, cuando sea útil para el ensayo particular. Además, los nucleótidos pueden modificarse mediante la adición de grupos químicos o la sustitución de residuos individuales por análogos

60 (por ejemplo, versiones de 2'-O-metoxilo). Son conocidos en la materia dichos nucleótidos modificados adicionales; algunos ejemplos incluyen hidroximetilnucleótidos, nucleótidos metilados, nucleótidos fluorados,  $\alpha$ -

tiofosfatónucleótidos, nucleótidos modificados con amina, metoxinucleótidos, carboximetilnucleótidos, tionucleótidos, inosina, dihidouridina, seudouridina, wibutosina, queuosina, C7dGTP. Se encuentran nucleótidos modificados adicionales en las patentes de EE.UU. nº 5.405.950 y 5.633.364 (ambas de Mock y Lovern). Además, una sonda puede comprender ADN, ARN, ADN o ARN modificado, PNA o ácidos nucleicos sintéticos o sustitutos de ácido nucleico que usan bases nucleotídicas como medios de hibridación selectiva con una diana.

A lo largo de esta solicitud, puede ejemplificarse un oligonucleótido particular en uso como un tipo de cebador particular (por ejemplo, cebador de tipo P1 de NASBA (ligado a una secuencia que proporciona una región promotora en forma bicatenaria) o de tipo P2 (usado solo o ligado con un oligonucleótido de marcaje)); sin embargo, dicho uso no debería limitar el uso o usos para los que puede ser útil el oligonucleótido. Por ejemplo, un cebador ejemplificado como cebador P1 puede ser útil como cebador de tipo P2. Adicionalmente, pueden adaptarse cebadores para otros procedimientos de amplificación (por ejemplo, la región promotora de polimerasa T7 de P1 (para NASBA o TMA) se retira para uso en PCR), como es conocido por el experto en la materia.

La secuencia de ácido nucleico del promotor T7 es bien conocida por los expertos en la materia, y aunque se ejemplifica en la presente memoria una secuencia particular, pueden seleccionarse equivalentes funcionales que tienen ligeras variaciones, conocidos en la materia o recién diseñados. En una realización preferida, la secuencia del promotor T7 es la expuesta en la SEQ ID NO: 17.

El presente procedimiento puede utilizarse en cualquier muestra seleccionada, tal como una muestra de paciente directa, por ejemplo, frotis nasal o inguinal, frotis faríngeo, frotis rectal o muestras de heridas, todas particularmente adecuadas para cribado, así como particularmente adecuadas para diagnóstico, lavado broncoalveolar o sangre (por ejemplo, septicemia o cultivo sanguíneo). Dichas muestras contienen típicamente una población mixta de organismos. Adicionalmente, si se desea, este procedimiento puede aplicarse a una muestra que tiene solo una única especie o cepa bacteriana, por ejemplo, muestras que utilizan aislamiento, cultivo, captura y/o enriquecimiento de MRSA.

La presente invención se ejemplifica en los siguientes ejemplos.

## Ejemplos

Se inició un estudio usando NASBA como amplificación. Se investigaron dos enfoques principales: enfoque 1 (sondas genéricas de *S. aureus* (*orfX*)) y enfoque 2 (sondas específicas de *SCCmec*). El “enfoque 1” es muy similar a la configuración usada en pruebas anteriores, está basado en el uso de 5 P2 localizados en la parte derecha del módulo, un P1 genérico localizado en *orfX* de *S. aureus* y una baliza genérica localizada en *orfX* de *S. aureus* (figura 2). El “enfoque 2” descrito en la presente memoria usa los mismos cinco P2 y P1 que el enfoque 1, pero se usan cinco balizas específicas de *SCCmec* localizadas en la parte derecha del módulo en lugar de la baliza genérica (véase la figura 3). Además, se describe y muestra también en la presente memoria que se encontró que una reacción múltiple que utiliza el enfoque 2 con amplificación y detección de *mecA* era altamente eficaz para detectar MRSA.

## Condiciones de amplificación

Para todos los experimentos, se usaron las siguientes condiciones de NASBA-ADN: se usó ADN cromosómico como material de entrada para amplificación. Para cada cepa, se estandarizaron suspensiones bacterianas a 0,5 McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml) usando un densitómetro (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Se liberó el ADN de las células bacterianas usando una técnica de lisis mecánica con perlas de vidrio y vórtex, y finalmente se prepararon diluciones en serie a partir de la suspensión lisada.

Se efectuó la amplificación usando reactivos de NASBA estándares (Tris-HCl 40 mM pH 8,5, MgCl<sub>2</sub> 12 mM, KCl 90 mM, DMSO al 15% v/v, DTT 5 mM, 1 mM de cada dNTP, ATP 2 mM, CTP 2 mM, UTP 2 mM, GTP 1,5 mM, ITP 0,5 mM; la concentración de cebadores (cebador de codificación= P1 y cebador inverso= P2) era de 0,2 µM cuando se ensayó en modo unitario y de 0,1 µM cuando se ensayó en modo múltiple; la concentración de la baliza o balizas moleculares marcadas con FAM era de 0,01 µM y de 0,1 µM para la sonda de baliza marcada con Cy5.

La concentración de enzima de restricción (Sau3A-I) era de 0,05 unidades por µl en la reacción de NASBA. La incubación de la mezcla durante 15 minutos a 41°C posibilitaba que la enzima o enzimas de restricción cortaran el ADN, esta etapa estaba seguida por 5 min a 95°C para desnaturalización de ADN y degradación de la enzima o enzimas de restricción, y finalmente se efectuó una etapa de 3 min a 41°C antes de añadir las enzimas de NASBA (0,08 unidades de ARNasa H, 32 unidades de ARN polimerasa T7, 6,4 unidades de transcriptasa inversa AMV y 2,1 µg de BSA). Se mezcló la mezcla de reacción mediante vórtex suave y centrifugación corta, y se inició la amplificación y detección instantánea. Se incubó la mezcla de reacción a 41°C en NucliSens EasyQ Analyzer (NucliSens, BioMérieux) durante 90 minutos con monitorización de la fluorescencia cada 30 s. Para la detección de FAM, se excitaron las reacciones a 485 nm y se midió la señal de emisión a 518 nm. Para ROX, se efectuaron excitación y emisión a 578 nm y 604 nm, respectivamente y para Cy5, se efectuaron excitación y emisión a 646 nm y 678 nm, respectivamente.

Los cebadores y sondas utilizados se exponen a continuación. Para las reacciones de NASBA, “cebador 1” o “P1” se

usa tradicionalmente (como aquí) para indicar el cebador que tiene en su extremo 5' una secuencia que proporciona una región promotora (aquí, para polimerasa T7) cuando está en forma bicatenaria. El segundo cebador de NASBA, un cebador no ligado a promotor, se marca tradicionalmente, como aquí, el "cebador 2" o "P2".

La siguiente tabla 1 proporciona secuencias de los cebadores y sondas utilizados en los ejemplos.

5 Tabla 1

| Función    | SEQ ID NO | Descripción                                                                  | Secuencia 5'→3'                                                   |
|------------|-----------|------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| P2         | 1         | <i>Región de conexión del extremo derecho de SCCmec, MREJ de tipo v</i>      | <b>CTCTGCTTTATATTATAAAATTACGGCTG</b>                              |
| P2         | 2         | <i>Región de conexión del extremo derecho de SCCmec, MREJ de tipo iii</i>    | <b>ATTTCATATATGTAATTCCTCCACATCTC</b>                              |
| P2         | 3         | <i>Región de conexión del extremo derecho de SCCmec, MREJ de tipo i y ii</i> | <b>AAGACTGCGGAGGCTAA</b>                                          |
| P2         | 4         | <i>Región de conexión del extremo derecho de SCCmec, MREJ de tipo vii</i>    | <b>TATTCTTCAAAGATTGAGC</b>                                        |
| P2         | 5         | <i>Región de conexión del extremo derecho de SCCmec, MREJ de tipo iv</i>     | <b>CAAATATTATCTCGTAATTTAC</b>                                     |
| P2         | 6         | <i>Región de conexión del extremo derecho de SCCmec, SCCmec de tipo v</i>    | <b>TCTAATTTATTTAACATAAAATCAATCCT</b>                              |
| Baliza-FAM | 7         | <i>Región de conexión del extremo derecho de SCCmec, MREJ de tipo i y ii</i> | <b>FAM-CGGCGCGT CAAAAATCATGAACCTC<br/>ATTACTTATGCGCCG-dabsilo</b> |

|                                      |    |                                                                    |                                                                     |
|--------------------------------------|----|--------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Baliza-FAM                           | 8  | Región de conexión del extremo derecho de SCCmec, MREJ de tipo iii | <b>FAM-CGAGCGC AAATTATACACAACCTAA<br/>TTTTTAGTGCGCTCG- dabsilo</b>  |
| Baliza-FM                            | 9  | Región de conexión del extremo derecho de SCCmec, MREJ de tipo vii | <b>FAM-CGGAGCTAATTTAATAATTTTCTCAT<br/>ATTTTTTAGCTCCG- dabsilo</b>   |
| Baliza-FM                            | 10 | Región de conexión del extremo derecho de SCCmec, MREJ de tipo iv  | <b>FAM-CGTAACG<br/>GATAAAAAACCGCATCATTTGACGTTACG -<br/>dabsilo</b>  |
| Baliza-FM                            | 11 | Región de conexión del extremo derecho de SCCmec, MREJ de tipo v   | <b>FAM-CGTAGCG<br/>GCTGAAATAACCGCATCATTTA CGCTACG-<br/>dabsilo</b>  |
| Baliza-FM                            | 12 | Región de conexión del extremo derecho de SCCmec, SCCmec de tipo v | <b>FAM- CGTCACGTAAAATATATTATACAC<br/>AATCCGTTTCGTGACG - dabsilo</b> |
| P1                                   | 13 | Región de conexión del extremo derecho de orfX                     | <b>aattctaatacgactcactatagggagag<br/>TCAAACGGCCTGCACAAGGA</b>       |
| Baliza-Cy5                           | 14 | Gen mecA                                                           | <b>Cy5 -CGTACGGGATCATAGCGTCATTATT<br/>CGTACG- dabsilo</b>           |
| P1                                   | 15 | P1 de mecA                                                         | <b>aattctaatacgactcactatagggagag<br/>GTATTGGCCAATTCCACATTGTTTC</b>  |
| P2                                   | 16 | P2 de mecA                                                         | <b>CATTGATCGCAACGTTCA</b>                                           |
| Secuencia promotora de polimerasa T7 | 17 |                                                                    | <b>AATTCTAATACGACTCACTATAGGG</b>                                    |

|           |    |                        |                                                                  |
|-----------|----|------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Baliza-FM | 18 | OrfX genérico (SCCmec) | <b>FAM -<br/>CGTACGGTAGTTACTGCGTTGTAAGACGTAC<br/>G - dabsilo</b> |
|-----------|----|------------------------|------------------------------------------------------------------|

Ejemplo 1: Resultados de NABSA obtenidos con el enfoque 1 (baliza genérica de NABSA) en 21 cepas de MSSA

El “enfoque 1” está basado en el uso de 5 P2 localizados en la parte derecha del módulo, un P1 genérico localizado en *orfX* de *S. aureus* y una baliza genérica localizada en *orfX* de *S. aureus* (figura 2). Se efectuó un NASBA-ADN usando cinco cebadores 2 (P2) específicos del módulo *SCCmec* (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5), un P1 genérico (SEQ ID NO: 13) y una baliza marcada con FAM genérica (SEQ ID NO: 18). Se obtuvieron curvas de NASBA para MRSA (6 cepas pertenecientes a MREJ de tipos i, ii, iii, iv, v y vii) y MSSA. La entrada de lisado corresponde a  $10^5$  UFC por NASBA. Se dan la relación de señal máxima (relación entre la señal final y el fondo inicial) en la tabla 2. Este experimento muestra la relación de señal máxima para 5 de las 21 cepas de MSSA (24%) con la baliza genérica de NASBA (enfoque 1).

Tabla 2: Relación de señal máxima obtenida para MSSA con la baliza genérica de NASBA (las señales positivas están en negrita y cursiva)

| Cepa    | Relación de señal máxima |
|---------|--------------------------|
| MSSA 10 | 1,01                     |
| MSSA 11 | <b>1,69</b>              |
| MSSA 12 | 1,02                     |
| MSSA 13 | 1,07                     |
| MSSA 14 | 1,08                     |
| MSSA 15 | 1,00                     |
| MSSA 16 | <b>2,06</b>              |
| MSSA 17 | <b>2,38</b>              |
| MSSA 18 | <b>1,52</b>              |
| MSSA 19 | 1,00                     |
| MSSA 23 | 1,02                     |
| MSSA 24 | 1,00                     |
| MSSA 25 | 1,00                     |
| MSSA 26 | 1,00                     |
| MSSA 27 | <b>1,38</b>              |
| MSSA 28 | 1,00                     |
| MSSA 29 | 1,00                     |

|           |      |
|-----------|------|
| MSSA 30   | 1,00 |
| MSSA 31   | 1,05 |
| MSSA 32   | 1,00 |
| MSSA 1034 | 1,00 |

Ejemplo 2: Resultados de NASBA obtenidos con el enfoque 2 (balizas específicas de NASBA) en 6 cepas de MRSA y 18 cepas de MSSA

5 Para superar la detección no específica de MSSA, se definió y desarrolló el “enfoque 2”. Específicamente, se definieron balizas localizadas en la parte derecha del módulo SCCmec en lugar de en *orfX*. El “enfoque 2” usa cinco cebadores 2 (P2) específicos y un P1 genérico, pero se usan cinco balizas específicas localizadas en la parte derecha del módulo en lugar de la baliza genérica (véase la figura 3).

10 Se efectuó una NASBA-ADN usando cinco cebadores 2 específicos de módulo SCCmec (P2) (SEQ ID NO: 1-5), un cebador genérico 1 (P1) (*orfX*) (SEQ ID NO: 13) y cinco balizas marcadas con FAM específicas del módulo SCCmec (SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11). Se ensayaron seis cepas MRSA y 18 MSSA usando un lisado como diana correspondiente a  $10^5$  UFC por NASBA. Se obtuvieron las curvas de NASBA para MRSA y MSSA. Se dan las relaciones de señal máxima obtenidas en la tabla 3.

15 Este experimento muestra que solo uno de los 18 MSSA se detectaba con el enfoque de balizas específicas (enfoque 2); esta cepa de MSSA detectada se espera que posea la parte derecha del módulo sin el gen *mecA*. Este experimento muestra que el uso de balizas específicas (enfoque 2) reduce significativamente el porcentaje de MSSA que no se detectan específicamente con el enfoque de baliza genérica (enfoque 1).

Tabla 3: Relación de señal máxima obtenida para MSSA y MRSA con balizas específicas de NASBA (las señales positivas están en negrita y cursiva).

| Cepa         | PCR de <i>mecA</i> | Relación de señal máxima |
|--------------|--------------------|--------------------------|
| Control neg. | No aplicable       | 1,0                      |
| MSSA 10      | Neg                | 1,0                      |
| MSSA 11      | Neg                | 1,0                      |
| MSSA 12      | Neg                | 1,0                      |
| MSSA 13      | Neg                | 1,0                      |
| MSSA 14      | Neg                | 1,0                      |
| MSSA 15      | Neg                | 1,0                      |
| MSSA 16      | Neg                | <b>1,7</b>               |
| MSSA 17      | Neg                | 1,0                      |
| MSSA 18      | Neg                | 1,0                      |
| MSSA 19      | Neg                | 1,0                      |
| MSSA 23      | Neg                | 1,0                      |

|         |     |            |
|---------|-----|------------|
| MSSA 24 | Neg | 1,0        |
| MSSA 25 | Neg | 1,0        |
| MSSA 26 | Neg | 1,0        |
| MSSA 27 | Neg | 1,0        |
| MSSA 28 | Neg | 1,0        |
| MSSA 29 | Neg | 1,0        |
| MSSA 30 | Neg | 1,0        |
| MRSA 3  | Pos | <b>1,6</b> |
| MRSA 7  | Pos | <b>1,6</b> |
| MRSA 8  | Pos | <b>1,7</b> |
| MRSA 9  | Pos | <b>2,2</b> |
| MRSA 10 | Pos | <b>2,1</b> |
| MRSA 11 | Pos | <b>1,9</b> |

### Ejemplo 3: Amplificación múltiple y detección del gen *mecA* y de la región de inserción del módulo

Usando el enfoque 2, se eliminan algunos falsos positivos, proporcionando por tanto un procedimiento mejorado para detectar MRSA. Sin embargo, pueden detectarse las cepas de MSSA que poseen el módulo sin el gen *mecA*, y se investigó una mejora más. Como se muestra en este ejemplo, la amplificación y detección simultánea tanto de la región del módulo de inserción, usando el enfoque 2, como del gen *mecA* (véase la figura 4) puede reducir la detección de dichas cepas (falsos positivos de MRSA).

Este ejemplo muestra la viabilidad de una NASBA múltiple para la detección tanto del gen *mecA* como de la región de conexión del módulo (enfoque 2, que tiene balizas específicas del módulo *SCCmec*) en el mismo tubo. Esta NASBA hace uso de 5 P2 específicos del módulo *SCCmec* (SEQ ID NO: 1-5), 1 P1 (SEQ ID NO: 13) y 5 balizas del módulo *SCCmec* marcadas con FAM (SEQ ID NO: 7-11) para la región de conexión del módulo y 1 P1 (SEQ ID NO: 15), 1 P2 (SEQ ID NO: 16) y 1 baliza marcada con ROX (SEQ ID NO: 14) para *mecA*. Se efectúa también para comparación una reacción NASBA que se orienta solo a la región de conexión del extremo derecho de *SCCmec*, amplificada en un tubo (cinco P2 específicos del módulo *SCCmec* (SEQ ID NO: 1-5), cinco balizas de FAM específicas del módulo *SCCmec* específicas (SEQ ID NO: 7-11) y 1 P1 de *orfX* (SEQ ID NO: 13)).

La siguiente tabla (tabla 4) da las relaciones de señal máxima obtenidas para (1) NASBA de conexión del extremo derecho de *SCCmec* (señal de FAM) cuando se amplifica solo la región de conexión del extremo derecho de *SCCmec* en un tubo (cinco P2, cinco balizas-FAM específicas y un P1 ("solo conexión con *SCCmec*") y (2) NASBA de conexión del extremo derecho de *SCCmec* (señal de FAM) y NASBA de *mecA* (señal de ROX) cuando se efectuaban ambas NASBA en el mismo tubo ("NASBA de conexión de *SCCmec* y de *mecA* en un tubo") (las relaciones de señal máxima se consideran positivas cuando > 1,2).

Tabla 4

|  | Tipo i                          |                                                              | Tipo ii                         |                                                              | Tipo iii                        |                                                              |
|--|---------------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------------------------------|
|  | Conexión con <i>SCCmec</i> solo | NASBA de conexión con <i>SCCmec</i> y <i>mecA</i> en un tubo | Conexión con <i>SCCmec</i> solo | NASBA de conexión con <i>SCCmec</i> y <i>mecA</i> en un tubo | Conexión con <i>SCCmec</i> solo | NASBA de conexión con <i>SCCmec</i> y <i>mecA</i> en un tubo |

| UFC/NASBA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | FAM                      | FAM                                                   | ROX         | FAM                      | FAM                                                   | ROX         | FAM                      | FAM                                                   | ROX         |  |         |  |  |        |  |  |          |  |  |                          |                                                       |  |                          |                                                       |  |                          |                                                       |  |           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |             |             |             |             |             |             |             |             |             |     |             |             |             |             |             |             |             |             |             |    |             |             |             |             |      |             |             |      |             |   |             |             |             |             |      |      |             |      |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------------|-------------|--------------------------|-------------------------------------------------------|-------------|--------------------------|-------------------------------------------------------|-------------|--|---------|--|--|--------|--|--|----------|--|--|--------------------------|-------------------------------------------------------|--|--------------------------|-------------------------------------------------------|--|--------------------------|-------------------------------------------------------|--|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----|-------------|-------------|-------------|-------------|------|-------------|-------------|------|-------------|---|-------------|-------------|-------------|-------------|------|------|-------------|------|------|
| 1000                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | <b>1,90</b>              | <b>1,84</b>                                           | <b>4,75</b> | <b>2,02</b>              | <b>2,07</b>                                           | <b>4,86</b> | <b>1,50</b>              | <b>1,39</b>                                           | <b>4,73</b> |  |         |  |  |        |  |  |          |  |  |                          |                                                       |  |                          |                                                       |  |                          |                                                       |  |           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |             |             |             |             |             |             |             |             |             |     |             |             |             |             |             |             |             |             |             |    |             |             |             |             |      |             |             |      |             |   |             |             |             |             |      |      |             |      |      |
| 100                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <b>1,85</b>              | <b>1,84</b>                                           | <b>4,75</b> | <b>2,03</b>              | <b>1,97</b>                                           | <b>4,74</b> | <b>1,48</b>              | <b>1,39</b>                                           | <b>4,53</b> |  |         |  |  |        |  |  |          |  |  |                          |                                                       |  |                          |                                                       |  |                          |                                                       |  |           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |             |             |             |             |             |             |             |             |             |     |             |             |             |             |             |             |             |             |             |    |             |             |             |             |      |             |             |      |             |   |             |             |             |             |      |      |             |      |      |
| 10                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | <b>1,87</b>              | <b>1,84</b>                                           | <b>4,72</b> | <b>1,88</b>              | <b>1,88</b>                                           | <b>4,63</b> | <b>1,49</b>              | <b>1,36</b>                                           | <b>4,60</b> |  |         |  |  |        |  |  |          |  |  |                          |                                                       |  |                          |                                                       |  |                          |                                                       |  |           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |             |             |             |             |             |             |             |             |             |     |             |             |             |             |             |             |             |             |             |    |             |             |             |             |      |             |             |      |             |   |             |             |             |             |      |      |             |      |      |
| 5                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | <b>1,85</b>              | <b>1,85</b>                                           | <b>4,80</b> | 1,01                     | <b>1,69</b>                                           | <b>4,58</b> | 1,01                     | <b>1,40</b>                                           | <b>4,41</b> |  |         |  |  |        |  |  |          |  |  |                          |                                                       |  |                          |                                                       |  |                          |                                                       |  |           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |             |             |             |             |             |             |             |             |             |     |             |             |             |             |             |             |             |             |             |    |             |             |             |             |      |             |             |      |             |   |             |             |             |             |      |      |             |      |      |
| <table> <tr> <th rowspan="2"></th><th colspan="3">Tipo iv</th><th colspan="3">Tipo v</th><th colspan="3">Tipo vii</th></tr> <tr> <th>Conexión con SCCmec solo</th><th colspan="2">NASBA de conexión con SCCmec y <i>mecA</i> en un tubo</th><th>Conexión con SCCmec solo</th><th colspan="2">NASBA de conexión con SCCmec y <i>mecA</i> en un tubo</th><th>Conexión con SCCmec solo</th><th colspan="2">NASBA de conexión con SCCmec y <i>mecA</i> en un tubo</th></tr> <tr> <th>UFC/NASBA</th><th>FAM</th><th>FAM</th><th>ROX</th><th>FAM</th><th>FAM</th><th>ROX</th><th>FAM</th><th>FAM</th><th>ROX</th></tr> <tr> <td>1000</td><td><b>1,62</b></td><td><b>1,64</b></td><td><b>4,85</b></td><td><b>1,14</b></td><td><b>1,39</b></td><td><b>4,81</b></td><td><b>2,41</b></td><td><b>2,43</b></td><td><b>4,83</b></td></tr> <tr> <td>100</td><td><b>1,57</b></td><td><b>1,48</b></td><td><b>4,58</b></td><td><b>1,42</b></td><td><b>1,33</b></td><td><b>4,69</b></td><td><b>2,44</b></td><td><b>2,43</b></td><td><b>4,81</b></td></tr> <tr> <td>10</td><td><b>1,61</b></td><td><b>1,50</b></td><td><b>4,62</b></td><td><b>1,43</b></td><td>1,00</td><td><b>4,03</b></td><td><b>2,40</b></td><td>1,00</td><td><b>4,59</b></td></tr> <tr> <td>5</td><td><b>1,61</b></td><td><b>1,44</b></td><td><b>4,15</b></td><td><b>1,43</b></td><td>1,01</td><td>1,00</td><td><b>2,40</b></td><td>1,01</td><td>1,01</td></tr> </table> |                          |                                                       |             |                          |                                                       |             |                          |                                                       |             |  | Tipo iv |  |  | Tipo v |  |  | Tipo vii |  |  | Conexión con SCCmec solo | NASBA de conexión con SCCmec y <i>mecA</i> en un tubo |  | Conexión con SCCmec solo | NASBA de conexión con SCCmec y <i>mecA</i> en un tubo |  | Conexión con SCCmec solo | NASBA de conexión con SCCmec y <i>mecA</i> en un tubo |  | UFC/NASBA | FAM | FAM | ROX | FAM | FAM | ROX | FAM | FAM | ROX | 1000 | <b>1,62</b> | <b>1,64</b> | <b>4,85</b> | <b>1,14</b> | <b>1,39</b> | <b>4,81</b> | <b>2,41</b> | <b>2,43</b> | <b>4,83</b> | 100 | <b>1,57</b> | <b>1,48</b> | <b>4,58</b> | <b>1,42</b> | <b>1,33</b> | <b>4,69</b> | <b>2,44</b> | <b>2,43</b> | <b>4,81</b> | 10 | <b>1,61</b> | <b>1,50</b> | <b>4,62</b> | <b>1,43</b> | 1,00 | <b>4,03</b> | <b>2,40</b> | 1,00 | <b>4,59</b> | 5 | <b>1,61</b> | <b>1,44</b> | <b>4,15</b> | <b>1,43</b> | 1,01 | 1,00 | <b>2,40</b> | 1,01 | 1,01 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Tipo iv                  |                                                       |             | Tipo v                   |                                                       |             | Tipo vii                 |                                                       |             |  |         |  |  |        |  |  |          |  |  |                          |                                                       |  |                          |                                                       |  |                          |                                                       |  |           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |             |             |             |             |             |             |             |             |             |     |             |             |             |             |             |             |             |             |             |    |             |             |             |             |      |             |             |      |             |   |             |             |             |             |      |      |             |      |      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Conexión con SCCmec solo | NASBA de conexión con SCCmec y <i>mecA</i> en un tubo |             | Conexión con SCCmec solo | NASBA de conexión con SCCmec y <i>mecA</i> en un tubo |             | Conexión con SCCmec solo | NASBA de conexión con SCCmec y <i>mecA</i> en un tubo |             |  |         |  |  |        |  |  |          |  |  |                          |                                                       |  |                          |                                                       |  |                          |                                                       |  |           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |             |             |             |             |             |             |             |             |             |     |             |             |             |             |             |             |             |             |             |    |             |             |             |             |      |             |             |      |             |   |             |             |             |             |      |      |             |      |      |
| UFC/NASBA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | FAM                      | FAM                                                   | ROX         | FAM                      | FAM                                                   | ROX         | FAM                      | FAM                                                   | ROX         |  |         |  |  |        |  |  |          |  |  |                          |                                                       |  |                          |                                                       |  |                          |                                                       |  |           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |             |             |             |             |             |             |             |             |             |     |             |             |             |             |             |             |             |             |             |    |             |             |             |             |      |             |             |      |             |   |             |             |             |             |      |      |             |      |      |
| 1000                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | <b>1,62</b>              | <b>1,64</b>                                           | <b>4,85</b> | <b>1,14</b>              | <b>1,39</b>                                           | <b>4,81</b> | <b>2,41</b>              | <b>2,43</b>                                           | <b>4,83</b> |  |         |  |  |        |  |  |          |  |  |                          |                                                       |  |                          |                                                       |  |                          |                                                       |  |           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |             |             |             |             |             |             |             |             |             |     |             |             |             |             |             |             |             |             |             |    |             |             |             |             |      |             |             |      |             |   |             |             |             |             |      |      |             |      |      |
| 100                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <b>1,57</b>              | <b>1,48</b>                                           | <b>4,58</b> | <b>1,42</b>              | <b>1,33</b>                                           | <b>4,69</b> | <b>2,44</b>              | <b>2,43</b>                                           | <b>4,81</b> |  |         |  |  |        |  |  |          |  |  |                          |                                                       |  |                          |                                                       |  |                          |                                                       |  |           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |             |             |             |             |             |             |             |             |             |     |             |             |             |             |             |             |             |             |             |    |             |             |             |             |      |             |             |      |             |   |             |             |             |             |      |      |             |      |      |
| 10                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | <b>1,61</b>              | <b>1,50</b>                                           | <b>4,62</b> | <b>1,43</b>              | 1,00                                                  | <b>4,03</b> | <b>2,40</b>              | 1,00                                                  | <b>4,59</b> |  |         |  |  |        |  |  |          |  |  |                          |                                                       |  |                          |                                                       |  |                          |                                                       |  |           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |             |             |             |             |             |             |             |             |             |     |             |             |             |             |             |             |             |             |             |    |             |             |             |             |      |             |             |      |             |   |             |             |             |             |      |      |             |      |      |
| 5                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | <b>1,61</b>              | <b>1,44</b>                                           | <b>4,15</b> | <b>1,43</b>              | 1,01                                                  | 1,00        | <b>2,40</b>              | 1,01                                                  | 1,01        |  |         |  |  |        |  |  |          |  |  |                          |                                                       |  |                          |                                                       |  |                          |                                                       |  |           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |             |             |             |             |             |             |             |             |             |     |             |             |             |             |             |             |             |             |             |    |             |             |             |             |      |             |             |      |             |   |             |             |             |             |      |      |             |      |      |

Los números en negrita y cursiva en la tabla 4 indican señales positivas.

Estos resultados muestran que, cuando se efectúan NASBA de conexión del extremo derecho de SCCmec y *mecA* en el mismo tubo, el límite de detección es del orden de 5 UFC/NASBA tanto para la región de conexión del extremo derecho de SCCmec como para el gen *mecA* con todos los tipos de cepa excepto los tipos v y vii. Por tanto, en el caso de un MSSA que posea la región de módulo de inserción sin el gen *mecA*, la presente prueba proporcionará apropiadamente un resultado "MRSA negativo" (conexión de SCCmec (+) más *mecA* (-)).

#### Ejemplo 4: Amplificación y detección múltiple del gen *mecA* y la región de inserción del módulo

Se efectuó una amplificación y detección múltiple (mismo tubo de reacción) de MRSA utilizando el enfoque 2 (balizas específicas de módulo SCCmec) junto con la detección de *mecA* (mismas condiciones que las descritas en el ejemplo 3) utilizando seis P2 específicos del módulo SCCmec (SEQ ID NO: 1-6), seis balizas-FAM específicas del módulo SCCmec específicas (SEQ ID NO: 7-12) y un P1 de *orfX* (SEQ ID NO: 13). Se obtuvo la detección positiva de las cepas de MRSA.

#### **Listado de secuencias**

<110> bioMerieux SA

Jay, Corrine

van Strijp, Dianne

van de Wiel, Paul

Deiman, Birgitt

<120> Detección de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

<130> 9250-174WO

<150> US 61/008.680  
 <151> 21-12-2007  
 <160> 18  
 <170> PatentIn versión 3.3

5 <210> 1  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>

10 <223> Cebador de NABSA  
 <400> 1  
 ctctgcttta tattataaaa ttacggctg 29  
 <210> 2  
 <211> 29

15 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de NABSA  
 <400> 2

20 atttcatata tgtaattcct ccacatctc 29  
 <210> 3  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> Cebador de NABSA  
 <400> 3  
 aagactgcgg aggctaa 17  
 <210> 4

30 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de NABSA

35 <400> 4  
 tattcttcaa agatttgagc 20

|    |                                             |    |
|----|---------------------------------------------|----|
|    | <210> 5                                     |    |
|    | <211> 22                                    |    |
|    | <212> ADN                                   |    |
|    | <213> Artificial                            |    |
| 5  | <220>                                       |    |
|    | <223> Cebador de NABSA                      |    |
|    | <400> 5                                     |    |
|    | caaataattat ctcgtaattt ac                   | 22 |
|    | <210> 6                                     |    |
| 10 | <211> 29                                    |    |
|    | <212> ADN                                   |    |
|    | <213> Artificial                            |    |
|    | <220>                                       |    |
|    | <223> Cebador de NABSA                      |    |
| 15 | <400> 6                                     |    |
|    | tctaatttat ttaacataaa atcaatcct             | 29 |
|    | <210> 7                                     |    |
|    | <211> 40                                    |    |
|    | <212> ADN                                   |    |
| 20 | <213> Artificial                            |    |
|    | <220>                                       |    |
|    | <223> Secuencia de sonda oligonucleotídica  |    |
|    | <220>                                       |    |
|    | <221> misc_feature                          |    |
| 25 | <222> (1)...(1)                             |    |
|    | <223> Modificación 3' FAM                   |    |
|    | <220>                                       |    |
|    | <221> misc_feature                          |    |
|    | <222> (40)...(40)                           |    |
| 30 | <223> Modificación 5' dabsilo               |    |
|    | <400> 7                                     |    |
|    | cggcgcgtca aaaatcatga acctcattac ttatgcgccg | 40 |
|    | <210> 8                                     |    |
|    | <211> 40                                    |    |
| 35 | <212> ADN                                   |    |
|    | <213> Artificial                            |    |

<220>  
 <223> Secuencia de sonda oligonucleotídica  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 5 <222> (1)...(1)  
 <223> Modificación 3' FAM  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (40)...(40)  
 10 <223> Modificación 5' dabsilo  
 <400> 8  
 cgagcgcaaa ttatacacia cctaattttt agtgcgctcg 40  
 <210> 9  
 <211> 40  
 15 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia de sonda oligonucleotídica  
 <220>  
 20 <221> misc\_feature  
 <222> (1)...(1)  
 <223> Modificación 3' FAM  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 25 <222> (40)...(40)  
 <223> Modificación 5' dabsilo  
 <400> 9  
 cggagctaatt ttaataattt tctcatattt ttagctccg 40  
 <210> 10  
 30 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia de sonda oligonucleotídica  
 35 <220>  
 <221> misc\_feature

|    |                                                |    |
|----|------------------------------------------------|----|
|    | <222> (1)...(1)                                |    |
|    | <223> Modificación 3' FAM                      |    |
|    | <220>                                          |    |
|    | <221> misc_feature                             |    |
| 5  | <222> (36)...(36)                              |    |
|    | <223> Modificación 5' dabsilo                  |    |
|    | <400> 10                                       |    |
|    | <b>cgtaacggat aaaaaaccgc atcatttgac gttacg</b> | 36 |
|    | <210> 11                                       |    |
| 10 | <211> 36                                       |    |
|    | <212> ADN                                      |    |
|    | <213> Artificial                               |    |
|    | <220>                                          |    |
|    | <223> Secuencia de sonda oligonucleotídica     |    |
| 15 | <220>                                          |    |
|    | <221> misc_feature                             |    |
|    | <222> (1)...(1)                                |    |
|    | <223> Modificación 3' FAM                      |    |
|    | <220>                                          |    |
| 20 | <221> misc_feature                             |    |
|    | <222> (36)...(36)                              |    |
|    | <223> Modificación 5' dabsilo                  |    |
|    | <400> 11                                       |    |
|    | <b>cgtagcggct gaaataaccg catcatttac gctacg</b> | 36 |
| 25 | <210> 12                                       |    |
|    | <211> 40                                       |    |
|    | <212> ADN                                      |    |
|    | <213> Artificial                               |    |
|    | <220>                                          |    |
| 30 | <223> Secuencia de sonda oligonucleotídica     |    |
|    | <220>                                          |    |
|    | <221> misc_feature                             |    |
|    | <222> (1)...(1)                                |    |
|    | <223> Modificación 3' FAM                      |    |
| 35 | <220>                                          |    |
|    | <221> misc_feature                             |    |

|    |                                                             |    |
|----|-------------------------------------------------------------|----|
|    | <222> (40)...(40)                                           |    |
|    | <223> Modificación 5' dabsilo                               |    |
|    | <400> 12                                                    |    |
|    | cgtcacgtaa aatatattat acacaatccg ttctgtgacg                 | 40 |
| 5  | <210> 13                                                    |    |
|    | <211> 49                                                    |    |
|    | <212> ADN                                                   |    |
|    | <213> Artificial                                            |    |
|    | <220>                                                       |    |
| 10 | <223> Cebador de NABSA                                      |    |
|    | <400> 13                                                    |    |
|    | aattctaata cgactcacta tagggagagt caaacggcct gcacaagga       | 49 |
|    | <210> 14                                                    |    |
|    | <211> 31                                                    |    |
| 15 | <212> ADN                                                   |    |
|    | <213> Artificial                                            |    |
|    | <220>                                                       |    |
|    | <223> Secuencia de sonda oligonucleotídica                  |    |
|    | <220>                                                       |    |
| 20 | <221> misc_feature                                          |    |
|    | <222> (1)...(1)                                             |    |
|    | <223> Modificación 3' FAM                                   |    |
|    | <220>                                                       |    |
|    | <221> misc_feature                                          |    |
| 25 | <222> (31)...(31)                                           |    |
|    | <223> Modificación 5' dabsilo                               |    |
|    | <400> 14                                                    |    |
|    | cgtaggggat catagcgtca ttattcgtac g                          | 31 |
|    | <210> 15                                                    |    |
| 30 | <211> 54                                                    |    |
|    | <212> ADN                                                   |    |
|    | <213> Artificial                                            |    |
|    | <220>                                                       |    |
|    | <223> Cebador de NABSA                                      |    |
| 35 | <400> 15                                                    |    |
|    | aattctaata cgactcacta tagggagagg tattggccaa ttccacattg tttc | 54 |

|    |                                            |    |
|----|--------------------------------------------|----|
|    | <210> 16                                   |    |
|    | <211> 18                                   |    |
|    | <212> ADN                                  |    |
|    | <213> Artificial                           |    |
| 5  | <220>                                      |    |
|    | <223> Cebador de NABSA                     |    |
|    | <400> 16                                   |    |
|    | cattgatcgc aacgttca                        | 18 |
|    | <210> 17                                   |    |
| 10 | <211> 25                                   |    |
|    | <212> ADN                                  |    |
|    | <213> Bacteriófago T7                      |    |
|    | <400> 17                                   |    |
|    | aattctaata cgactcacta taggg                | 25 |
| 15 | <210> 18                                   |    |
|    | <211> 32                                   |    |
|    | <212> ADN                                  |    |
|    | <213> Artificial                           |    |
|    | <220>                                      |    |
| 20 | <223> Secuencia de sonda oligonucleotídica |    |
|    | <220>                                      |    |
|    | <221> misc_feature                         |    |
|    | <222> (1)...(1)                            |    |
|    | <223> Modificación 3' FAM                  |    |
| 25 | <220>                                      |    |
|    | <221> misc_feature                         |    |
|    | <222> (32)...(32)                          |    |
|    | <223> Modificación 5' dabsilo              |    |
|    | <400> 18                                   |    |
| 30 | cgtacggtag ttactgcggtt gtaagacgta cg       | 32 |

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de detección en una muestra de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) que tiene una inserción de un módulo SCCmec en el ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, que comprende efectuar en la muestra una reacción de amplificación y detección utilizando:
  - 5 a) un primer cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo del módulo SCCmec,
  - b) un segundo cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, y
  - 10 c) una sonda capaz de hibridar específicamente con una región del módulo SCCmec entre la región con que el primer cebador es capaz de hibridar y la conexión,en el que cada uno del primer cebador y el segundo cebador está orientado de tal modo que, en las condiciones de amplificación, se amplifica la conexión, y  
en el que si la muestra contiene MRSA, se detecta la hibridación de la sonda.
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de efectuar en la muestra una reacción de amplificación y detección que detecta la presencia del gen *mecA*,  
en el que, si la muestra contiene MRSA, se detecta la presencia tanto de la conexión diana como de *mecA* en la muestra.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la reacción de amplificación y detección de la región de conexión del extremo y la reacción de amplificación y detección del gen *mecA* se efectúan simultáneamente.
- 20 4. Un procedimiento de detección en una muestra de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) que tiene una inserción de un módulo SCCmec en el ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, comprendiendo el procedimiento
  - a) efectuar en una muestra una reacción de amplificación múltiple que puede amplificar tanto (1) una conexión de un módulo SCCmec insertado y ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* como (2) una región de *mecA*,
  - 25 en el que la amplificación de la conexión se efectúa utilizando:
    - 1) un primer cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo del módulo SCCmec,
    - 2) un segundo cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, y
  - 30 3) una primera sonda capaz de hibridar específicamente con una región del módulo SCCmec entre la región con que el primer cebador es capaz de hibridar específicamente y la conexión,en el que, en las condiciones de amplificación, se amplifica la conexión y  
b) detectar, en los productos de amplificación, la presencia o ausencia de cada una de la conexión y *mecA*,  
en el que, si la muestra contiene MRSA, se detecta la presencia tanto de la conexión como de *mecA* en la muestra.
- 35 5. El procedimiento de la reivindicación 4, que comprende las etapas de:  
poner en contacto, en un solo recipiente, la muestra con
  - a) un primer conjunto de oligonucleótidos que comprende
    - (1) un primer oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico que hibrida específicamente con una región de conexión del extremo de un módulo SCCmec, y
    - 40 (2) un segundo oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico que hibrida específicamente con una región de ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* que flanquea dicho módulo SCCmec, formando un primer producto de reacción de la muestra y el primer y segundo oligonucleótidos, y
    - b) un segundo conjunto de nucleótidos que comprende
      - (3) un tercer oligonucleótido que tiene una secuencia nucleotídica que hibrida específicamente con una primera
      - 45 región del ácido nucleico de *mecA*, y

(4) un cuarto oligonucleótido que tiene una secuencia nucleotídica que hibrida específicamente con una segunda región del ácido nucleico de *mecA*, formando un segundo producto de reacción de la muestra y el tercero y cuarto oligonucleótidos; e

identificar la presencia de MRSA detectando tanto el primero como el segundo productos de reacción.

- 5 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la etapa de puesta en contacto comprende además efectuar una reacción de amplificación usando los conjuntos de oligonucleótidos (a) y (b) como cebadores, y en el que dicha etapa de identificación comprende detectar la presencia o ausencia de un producto de amplificación de ambos conjuntos de oligonucleótidos.
  - 10 7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la etapa de identificación comprende poner en contacto el primer y segundo productos de reacción con (1) una primera sonda capaz de hibridar específicamente con el primer producto de reacción y (2) una segunda sonda capaz de hibridar específicamente con el segundo producto de reacción.
  - 15 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la sonda o primera sonda comprende más de una sonda, preferiblemente cinco o más sondas, cada una capaz de hibridar específicamente con un tipo diferente de MRSA.
  9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la reacción de amplificación se selecciona del grupo consistente en amplificación basada en la transcripción, preferiblemente NASBA, más preferiblemente NASBA-ADN, y PCR.
  - 20 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el primer cebador o primer oligonucleótido comprende más de un cebador u oligonucleótido capaz de hibridar con una región de conexión del extremo del módulo *SCCmec*.
  11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la región de conexión del extremo es la región de conexión del extremo derecho.
  - 25 12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el segundo cebador o segundo oligonucleótido comprende el ácido nucleico expuesto en la SEQ ID NO 13.
  13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la sonda o primera sonda comprende un ácido nucleico seleccionado del grupo consistente en las SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11 y 12, preferiblemente al menos cinco ácidos nucleicos, comprendiendo cada uno una secuencia diferente seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11 y 12.
  - 30 14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el primer cebador o primer oligonucleótido comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 y 6, preferiblemente al menos cinco ácidos nucleicos, comprendiendo cada uno una secuencia diferente seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 y 6.
  - 35 15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2-7, en el que la amplificación de *mecA* utiliza un cebador u oligonucleótido de *mecA* que comprende un ácido nucleico seleccionado del grupo consistente en las SEQ ID NO: 15 y 16.
  16. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2-7, en el que la detección de *mecA* utiliza una sonda de *mecA* que comprende el ácido nucleico expuesto en la SEQ ID NO: 14.
  - 40 17. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en el que el segundo oligonucleótido hibrida específicamente con una región de *orfX*.
  18. Un kit de detección de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) que tiene una inserción de un módulo *SCCmec* en el ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, que comprende:
    - a) un primer cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo derecho del módulo *SCCmec*,
    - 45 b) un segundo cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo derecho del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, y
    - c) una sonda seleccionada del grupo consistente en (1) una sonda capaz de hibridar específicamente principalmente con una región del módulo *SCCmec* entre la región con que el primer cebador es capaz de hibridar y la conexión, y (2) una sonda capaz de hibridar específicamente del todo con una región del módulo *SCCmec* entre la región con que el primer cebador es capaz de hibridar y la conexión,
    - 50
- en el que cada uno del primer cebador y el segundo cebador está orientado de tal modo que, en las condiciones de

amplificación, se amplifica la conexión.

19. El kit de la reivindicación 18, que comprende:

a) un primer conjunto de oligonucleótidos de amplificación y detección que comprende

1) un primer cebador capaz de hibridar específicamente con una región de conexión del extremo derecho del módulo SCCmec,

2) un segundo cebador capaz de hibridar específicamente con el ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* en la región de conexión del extremo y

3) una primera sonda capaz de hibridar específicamente del todo con una región del módulo SCCmec entre la región con que el primer cebador es capaz de hibridar y la conexión,

en el que cada uno del primer cebador y el segundo cebador está orientado de tal modo que, en las condiciones de amplificación, se amplifica la conexión, y

b) un segundo conjunto de oligonucleótidos de amplificación y detección que comprende

4) un tercer cebador capaz de hibridar específicamente con una primera región de *mecA*,

5) un cuarto cebador capaz de hibridar específicamente con una segunda región de *mecA*, y

6) una segunda sonda capaz de hibridar específicamente con una región de *mecA* entre la primera y la segunda regiones de *mecA*,

en el que cada uno del tercer cebador y el cuarto cebador está orientado de tal modo que, en las condiciones de amplificación, se amplifica la región de *mecA* entre la primera y segunda regiones de *mecA*.

20. El kit de la reivindicación 18 o 19, en el que el primer cebador comprende más de un cebador capaz de hibridar con la región de conexión del extremo derecho del módulo SCCmec.

21. El kit de la reivindicación 18 o 19, en el que el primer cebador es un ácido nucleico que comprende una secuencia seleccionada del grupo consistente en: SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

22. El kit de la reivindicación 18 o 19, en el que el segundo cebador es capaz de hibridar específicamente con *orfX*.

23. El kit de la reivindicación 18 o 19, en el que el segundo cebador comprende el ácido nucleico expuesto en la SEQ ID NO: 13.

24. El kit de la reivindicación 18 o 19, en el que la sonda o primera sonda comprende más de una sonda, preferiblemente cinco o más sondas, cada una capaz de hibridar específicamente con un tipo diferente de MRSA.

25. El kit de la reivindicación 18 o 19, en el que la sonda o primera sonda es un ácido nucleico que comprende una secuencia seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11 y 12.

26. El kit de la reivindicación 18 o 19, en el que el primer, segundo, tercer, cuarto y quinto cebadores se proporcionan en un solo recipiente.

27. El kit de la reivindicación 18 o 19, en el que el primer y segundo conjuntos de oligonucleótidos de amplificación y detección se proporcionan en un solo recipiente.

28. El kit de la reivindicación 18 o 19, en el que el tercer y/o cuarto cebadores comprenden un ácido nucleico seleccionado del grupo consistente en las SEQ ID NO: 15 y 16.

29. El kit de la reivindicación 18 o 19, en el que la segunda sonda comprende el conjunto de ácidos nucleicos expuesto en la SEQ ID NO: 14.

30. Una composición oligonucleotídica que comprende:

(1) Un primer cebador oligonucleotídico que tiene una secuencia de ácido nucleico que hibrida específicamente con una región de conexión del extremo de un módulo SCCmec;

(2) Un segundo cebador oligonucleotídico que tiene una secuencia de ácido nucleico que hibrida específicamente con una región de ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* que flanquea dicho módulo SCCmec; y

(3) Una primera sonda capaz de hibridar específicamente con una región del módulo SCCmec entre la región con que el primer cebador es capaz de hibridar y la conexión,

en el que cada uno del primer cebador y el segundo cebador está orientado de tal modo que, en las condiciones de

amplificación, se amplifica la conexión.

31. La composición oligonucleotídica de la reivindicación 30, que comprende además:

(4) un tercer oligonucleótido que tiene una secuencia nucleotídica que hibrida específicamente con una primera región del ácido nucleico de *mecA*;

5 (5) un cuarto oligonucleótido que tiene una secuencia nucleotídica que hibrida específicamente con una segunda región del ácido nucleico de *mecA*; y

(6) una segunda sonda capaz de hibridar específicamente con una región de *mecA* entre la primera y segunda regiones de *mecA*.

Fig. 1

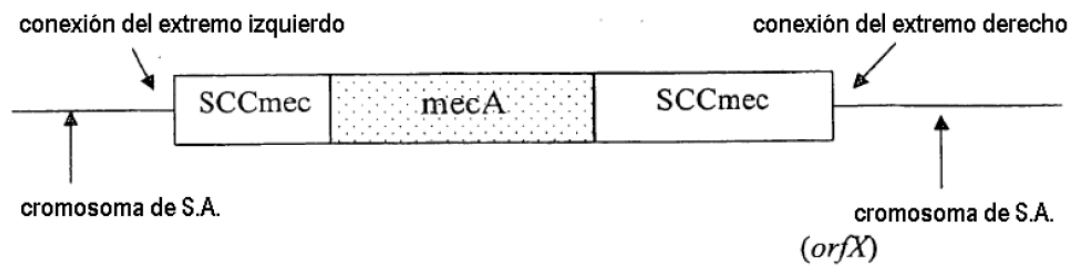


Fig. 2

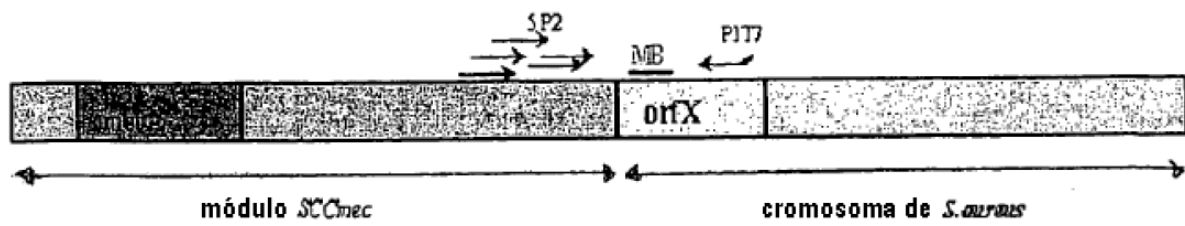


Figura 2: Enfoque 1 de NASBA

Fig. 3

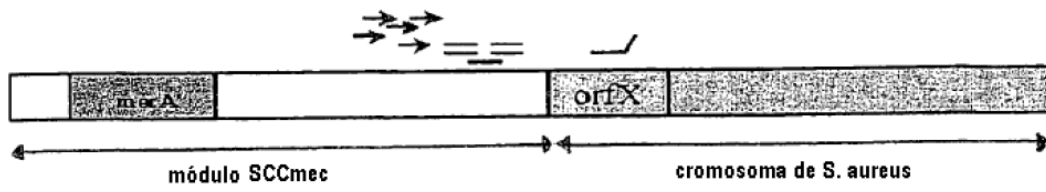


Figura 3: Enfoque 2 de NASBA

Fig. 4

