

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 189**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2012 E 12815869 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 2714939**

54 Título: **Detección de estafilococos áureos resistentes a la meticilina**

30 Prioridad:

24.05.2011 US 201161489614 P

08.09.2011 US 201161532454 P

22.03.2012 US 201261614381 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.06.2015

73 Titular/es:

ELITECH HOLDING B.V. (100.0%)

Van Rensselaerweg 4

6956 AV Spankeren, NL

72 Inventor/es:

AFONINA, IRINA, A.;

BELOUSOV, YEVGENIY, S. y

MAHONEY, WALT

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 537 189 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 estafilococos áureos resistentes a la meticilina

5 ANTECEDENTES

La presente invención, reivindica la prioridad de la serie de solicitudes de patentes estadounidenses provisionales correspondientes a los números 61 / 489. 614, registrada en fecha 24 de Mayo del 2011, 61 / 532. 454, registrada en fecha 8 de Septiembre del 2008 y 61 / 614. 381, registrada en fecha 22 de Marzo del 2012, todas ellas tituladas "Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*," [Detección de estafilococos áureos resistentes a la

meticilina]. Esta revelación, se refiere a diagnósticos bacterianos y, de una forma más particular, a la detección de estafilococos áureos resistentes a la meticilina.

La aparición generalizada del estafilococo áureo resistente a la meticilina ("MRSA" – [de sus siglas en inglés, correspondientes a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*] -), representa un serio problema de índole mundial. El *S. aureus* (del inglés, *Staphylococcus aureus*), y de una forma especial, el MRSA, se ve, hoy en día, como siendo una de las causas mayores causas de ambas, las infecciones asociadas con el cuidado de la salud, y las infecciones asociadas con la población. El *S. aureus* (estafilococo áureo), es una bacteria comensal, la cual coloniza a las cavidades o fosas nasales, a la vagina, a las axilas y / o las superficies dañadas de las piel. Las infecciones, pueden acontecer mediante una brecha en la piel ó en las mucosas, la cual permita el acceso a los tejidos contiguos y al sistema sanguíneo. El riesgo, se incrementa mediante la presencia de catéteres. El *S. aureus*, es único, en cuanto a lo referente a su capacidad de invadir los tejidos normales, y provocar enfermedades, en tejidos los cuales han sido previamente tejidos normales, de una forma virtual, en todos los lugares (véase, a dicho efecto, Boucher et al., CID, 51 (Suplemento 2): S183 - S197, 2010). El MRSA (estafilococo áureo resistente a la meticilina) causa varias infecciones, tales como, por ejemplo, las consistentes en las infecciones de la piel y de los tejidos blandos, las infecciones de origen hemático o sanguíneo y la neumonía (véase a dicho efecto Gemmel et al., J. Antimicrob. Chemother., 57: 589 - 608, 2006). La aparición de las cepas de estafilococos áureos, las cuales son resistentes a los antibióticos, plantea un reto para la búsqueda de un tratamiento el cual sea exitoso. Se ha observado el hecho consistente en que, los pacientes hospitalizados, los cuales se encuentran afectados de la cepa de *S. aureus* bacteriana, tienen una tasa de mortalidad la cual es inaceptablemente alta. La literatura especializada en el arte especializado de la técnica, la cual se encuentra hoy en día a disposición, ha indicado el hecho de que, la selección del tratamiento antibacteriano que sea el más apropiado, a tiempo, puede reducir la mortalidad. Una herramienta la cual puede ser de ayuda en la selección, es la consistente en la rápida distinción del MRSA, de la *S. aureus* susceptible a la meticilina ("MSSA" - [del inglés, methicillin-susceptible *S. aureus*] -) (véase, a dicho efecto, Brown et al., Pharmacoconomics, - Farmacoeconomía -, 28: 567 - 575, 2010).

Si bien existen, hoy en día, existen algunas herramientas y algunos ensayos, para la identificación de la MRSA, éstos son, sin embargo, no obstante, de una eficacia inferior a la que sería ideal. Se ha reportado una cantidad de falsos positivos, correspondiente a un porcentaje tan alto como el de un 12,9 %, para ensayos comercialmente disponibles en el mercado del tipo locus único o individual (véase, a dicho efecto, Blanc et al., J. Clin. Microbiol., 49: 722 - 724, 2011). Una evaluación, mediante la utilización de ensayos de PCR a tiempo real, consistentes en dos ensayos de PCR de dos locus individuales, y de un ensayo de PCR de doble locus, para el MRSA, advierten sobre el alto predominio de "falsos negativos" y de "falsos positivos" (véase, a dicho efecto, Kolman et al., BMC Res. Notes, 3; 110, 2010). Existe por lo tanto una clara necesidad, en cuanto a lo referente al hecho de poder disponer de ensayos mejorados para la evaluación del MRSA.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente revelación, proporciona procedimientos, sondas y cebadores, para la detección de los estafilococos áureos ("SA" – [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a *Staphylococcus aureus*] -), y del estafilococo áureo resistente a la meticilina ("MRSA" – [del inglés methicillin - resistant *Staphylococcus aureus*] -), en muestras, las cuales incluyen a las muestras biológicas (tales como, por ejemplo, las muestras de sangre, de una torunda nasofaríngea o de la garganta, de una torunda de las heces, de una torunda de una herida, o de otros tejidos).

La producción de L-lactato, permite el que los *S. aureus*, mantengan la homeostasis redox, durante el estrés nitrosativo y éste esencial para la virulencia. La actividad lactato deshidrogenasa inducible por óxido nítrico (NO*) y la resistencia al NO*, distingue a los *S. aureus* de las especies íntimamente comensales íntimamente relacionadas, consistentes en las especies *S. epidermidis* y *S. saprophyticus* (véase, a dicho efecto, Richardson et al., Science, 319: 1672, 2008).

La resistencia a los antibióticos de β - lactamasa (betalactámicos), viene causada por una proteína de unión a la penicilina, modificada (PBP2a), la cual se codifica mediante el gen *mecA* (véase, a dicho efecto, Hartman & Tomasz, J. Bacteriol., 158: 513 - 516, 1984). Esta determinante resistencia, reside en un elemento genético móvil, al cual se le denomina como casete cromosómico estafilocócico *mec* (SCC*mec* – [del inglés staphylococcal cassette

chromosome *mec*] -), el cual se integra aguas debajo de un marco de lectura específico (orFX) del *S. aureus* (orFx, son las siglas, en inglés, de open reading frame) (véase, a dicho efecto, Hiramatsu et al., Int. J. Me. Microbiol., 292 : 67 - 74, 2002). La detección del MRSA, mediante PCR, para objetivizar como diana, se propuso la unión de SSCmec / orFX, por parte de Huletsky et al (véase, a dicho efecto, J. Clin. Microbiol., 42: 1875 - 1884, 2004). Puesto que, la *mecA*, reside en el SCCmec, la detección de la unión de SCCmec / orFX, se considera como siendo un sustituto para la detección del MRSA. Se encuentran comercialmente disponibles, en el mercado un gran número de ensayos de MRSA, los cuales están basados en el sitio específico de integración del SCCmec, en el orFX, a saber, los ensayos consistentes en los de la clase GENEXPERT, Cepheid, Sunnyvale, CA (véase, a dicho efecto, Rossney et al., J. Clin. Microbiol., 46 : 3285 - 3290, 2008), el ensayo IDI-MRSA (véase, a dicho efecto, Warren et al., J. Clin Microbiol., 42 : 5578 - 5581, 2004), y el ensayo de MRSA consistente en el "Hain GENOQUICK MRSA assay", de la firma Hain Lifescience GmbH, Nehren, Dinamarca (véase, a dicho efecto, Sherlock et al., Clin. Microbiol. Infect. 16 : 955 - 959, 2010). Poco después de la introducción de estos ensayos, se reportó la existencia de "falsos positivos". Esto sucede, cuando los ensayos identifican, como siendo MRSA-positivos, a los especímenes los cuales contienen únicamente cepas de *S. aureus* susceptibles a la meticilina (véase, a dicho efecto, Wong et al. J. Clin. Microbiol., 48 : 3525 - 3531, 2010). Se conoce ahora el hecho consistente en que, los "falsos positivos", los cuales resultan en los ensayos de PCR de locus único o individual, son debidos a las eliminaciones del SCCmec.

En la presente revelación, se procede a extraer los ácidos nucleicos los cuales se encuentran presentes en una muestra de ensayo, obtenida a partir de un muestra biológica o de un tejido, del cual se sospeche que tenga los SA ó MRSA, de las muestras en cuestión, por mediación de procedimientos los cuales son conocidos en el arte especializado de la técnica. De una forma más específica, en el caso del SA, el cual no sea un MRSA, se detecta el gen lactato deshidrogenasa (*ldh1*), pero no el *mecA*, o éste se detecta en diferentes cantidades; y en el caso del MRSA, los genes *ldh1* y *mecA*, en una cantidad igual. El ácido nucleico amplificado, puede detectarse, mediante una gran variedad de procedimientos correspondientes al estado actual de la técnica especializada, incluyendo a la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia ("FRET", [del inglés, fluorescence resonance energy transfer] -), a los radioligandos, a los marcadores enzimáticos, y por el estilo. Los ácidos nucleicos amplificados, pueden también detectarse mediante cualquier combinación de las técnicas de detección, las cuales pueden incluir a las sondas de detección por hibridación y / o cebadores de detección por hibridación.

En uno de sus aspectos, esta revelación, proporciona un procedimiento para la detección de los SA y MRSA, en una muestra biológica, procedente de un individuo. La revelación, proporciona así mismo, también, cebadores de oligonucleótidos, y sondas de oligonucleótidos, los cuales comprenden secuencias características, las cuales son características de las secuencias genómicas de ácidos nucleicos de los estafilococos áureos ("SA") y los estafilococos áureos resistentes a la meticilina "MRSA"). El procedimiento en cuestión, incluye el llevar a cabo por lo menos una etapa de ciclación de amplificación e hibridación. La etapa de la etapa de amplificación, incluye el proceder a poner en contacto la muestra de ácido nucleico, con pares de cebadores, para producir un producto o productos de amplificación, si se encuentran presentes el los ácidos nucleicos del SA y / o del *mecA*. Los cebadores que se prefieren, son aquéllos los cuales objetivizan como diana a una región específica del gen lactato deshidrogenasa 1 (*ldh1*; SA), y el gen *mecA* (resistencia a la penicilina). Las sondas de oligonucleótidos, detectan la diana objetivizada, amplificada, de una forma directa o de una forma indirecta. La sonda de oligonucleótido preferida es el conjugado 3' de extinción del oligonucleótido fluoróforo del ligando de surco menor 5' en el extintor del surco menor en 5' [- (5' minor groove binder-fluorophore-oligonucleotide-quencher-3' conjugate) -], el cual se convierte en fluorescente, mediante la hibridación a su diana complementaria amplificada. En algunas formas de presentación de este procedimiento de detección de la presente invención, se procede a marcar uno o más cebadores. En algunas formas de presentación de este procedimiento de la presente invención, la sonda o sondas, se omiten. En algunas formas de presentación del procedimiento, se proporciona un control interno.

En una forma de presentación del procedimiento correspondiente a procedimiento, en concordancia con la presente invención, el procedimiento en cuestión, comprende la detección de los genes *ldh1* y *mecA*.

De una forma adicional, se proporcionan equipos, a modo de "kit", para la detección de los estafilococos áureos (SA) y de los estafilococos áureos resistentes a la meticilina (MRSA), en muestras biológicas, las cuales comprenden por lo menos un oligonucleótido de reasociación específico para la amplificación de las secuencias de SA, y que comprende, así mismo, además, por lo menos un oligonucleótido el cual es específico para la detección de las secuencias del *mecA*.

El procedimiento en cuestión, incluye, de una forma adicional, el proceder a detectar la presencia o la ausencia de una señal fluorescente (tal como, por ejemplo, una señal resultante de la FRET [transferencia de energía por resonancia de fluorescencia] -) de las sondas de hibridación o de los cebadores de hibridación. La presencia de la señal de fluorescencia, debida a un primer marcador, indica, de una forma usual, la presencia de SA, y la detección de la señal de fluorescencia, debida a un segundo marcador, indica la presencia de un gen *mecA*, en la muestra biológica en cuestión, mientras que, la ausencia de la señal, de una forma usual, debido al primer marcador, indica la ausencia de SA, y la ausencia de seña, debido al segundo marcador, indica la ausencia de *mecA*, en la muestra biológica en cuestión.

5 El procedimiento en cuestión, en concordancia con la presente invención, puede también incluir, así mismo, también, y de una forma adicional, el proceder a determinar el perfil de la temperatura de fusión de las sondas y de los productos de amplificación o “amplicones”, en el caso del cebador o cebadores amplificados. La curvas de fusión, confirman de una forma adicional, así mismo, también, la presencia o ausencia de SA y de *mecA*, así, como también, la presencia potencial de mutantes de SA y de *mecA*, no emparejan bien (divergen), en el área de las secuencia de la sonda, o en la amplificación, en el caso de un cebador o de cebadores marcado(s).

10 El procedimiento en cuestión, en concordancia con la presente invención, puede también incluir, así mismo, también, y de una forma adicional, el proceder a determinar la infección mixta, en donde, las señales de los marcadores de *ldh1* y de *mecA* proceden de diferentes organismos, mediante la comparación de cantidades relativas de marcadores de *ldh1* y de *mecA*. Unas cantidades iguales, sugieren el hecho de una infección por MRSA, mientras que, unas cantidades diferentes, sugieren el hecho de una infección mixta por estafilococos áureos MRSA-negativo y otros adicionales distintos al portador o soporte del *mecA* del *S. aureus*.

15 El presente procedimiento, permite una detección específica, sensible y rápida, del SA y del MRSA. La infección por MRSA, no es, a menudo, clínicamente distinguible, con respecto a otras bacterias y patógenos víricos, las cuales portan el *mecA*, para las cuales, se encuentran disponibles terapias específicas. Los presentes procedimientos en concordancia con la presente invención, superan este problema en la diagnosis, proporcionando una detección rápida y específica de los SA y MRSA, eliminando, con ello, los resultados de falsos positivos observados en algunos de los ensayos correspondientes al arte especializado de la técnica. De una forma adicional, las sondas las cuales están basadas en la hibridación, o en un cebador o cebadores marcados basados en la hibridación, permiten el análisis de curvas, las cuales pueden identificar nuevos mutantes potenciales del *ldh1* y del *mecA*.

25 En una forma de presentación del procedimiento en concordancia con la presente invención, éste comprende la detección de los genes consistentes en los *mecA*_{LGA251}, *mecA* y *ldh1*.

30 En un procedimiento, en concordancia con la presente invención, los genes *mecA*_{LGA251} y *mecA*, se marcan con la misma tinte o marcador fluorescente, y en otro procedimiento en concordancia con la presente invención, éstos se marcan con diferentes tintes o marcadores fluorescentes.

35 En otra forma de presentación del procedimiento en concordancia con la presente invención, éste comprende la detección del gen *ldh1*, del *SCCmec*, y del sitio o de los sitios de integración del *SCCmec*, ó de la región de puente de éste (de éstos).

40 En otra forma de presentación del procedimiento en concordancia con la presente invención, éste comprende la detección del gen *ldh1*, del sitio o los sitios de integración o región de puente del *SCCmec*, y del *mecA*.

45 En una forma de presentación del procedimiento en concordancia con la presente invención, éste comprende la detección del gen *ldh1*, y de por lo menos un sitio o sitios de integración o región de puente del *SCCmec*.

Otros objetos, características o rasgos distintivos, y ventajas de la presente invención, resultarán evidentes, para una persona experta en el arte especializado de la técnica, a raíz de la descripción detallada la cual se facilita a continuación, así como de las figuras anexas.

45 DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LAS FIGURAS

La figura 1, ilustra la detección, a tiempo real, del gen *ldh1*, del gen *mecA*, y de un control interior (IC – [de sus siglas en idioma inglés, internal control] -), en una muestra MRSA - positiva;

50 La figura 2, ilustra la detección, a tiempo real, del gen *ldh1*, del gen *mecA*, y de un IC (control interior) en una muestra SA - negativa.

La figura 3, ilustra la detección, a tiempo real, del gen *ldh1*, del gen *mecA*, y de un IC (control interior) en una muestra SA - positiva y MRSA - negativa.

55 La figura 4, ilustra la detección, a tiempo real, del gen *ldh1*, del gen *mecA*, del gen *mecA*_{LGA251}, del gen *ldh1* y de un IC en muestras MRSA-positivas y LGA251-positivas.

60 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. GENERAL

65 La presente invención, da a conocer procedimientos, sondas y cebadores, para la detección de estafilococos áureos (SA – [del inglés, *Staphylococcus aureus*] -) y de estafilococos áureos resistentes a la metilicina (MRSA – [del inglés, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*] (MRSA)). Los procedimientos y las composiciones los cuales se dan a conocer en la presente invención, son altamente específicos para los SA y MRSA con una alta sensibilidad, con una

alta especificidad y con una rapidez, la cuales permiten la detección de clínicos relevantes. Los procedimientos y las composiciones de la presente invención, pueden utilizarse, de una forma conveniente, para la amplificación y / para la detección de SA y *mecA*, en muestras. En algunas formas de presentación, el gen *mecA*, se detecta en las bacterias correspondientes a otras distintas de la *S. aureus*.

II. DEFINICIONES

Una muestra, tal y como se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, se refiere a una muestra de cualquier fuente, la cual se sospecha que contiene *S. aureus*. Estas muestras, pueden someterse a tests de ensayo, mediante los procedimientos los cuales se describen aquí, en este documento de solicitud de patente. Una muestra, puede ser una muestra procedente de un laboratorio, o bien, la muestra en cuestión puede proceder de una fuente distinta a un laboratorio. Una muestra, puede suspenderse o disolverse en materiales líquidos, tales como los consistentes en los tampones, los extractos, los disolventes o por el estilo. Las muestras en cuestión, pueden también incluir, así mismo, también, a muestras biológicas tales como las consistentes en tejido humano, o en fluidos humanos, tales como los consistentes en la sangre entera, las fracciones de sangre, el suero, el plasma, el fluido cerebroespinal, los fluidos linfáticos, la leche, la orina, varias secreciones externas de los tractos correspondientes al tracto respiratorio, al tracto intestinal, y a los tractos genitourinarios, las lágrimas y la saliva; y a los fluidos biológicos, tales como los consistentes en los extractos celulares, los sobrenadantes de los cultivos, los especímenes fijados en los tejidos, y los especímenes fijados en las células. Las muestras, incluyen así mismo, también, a las muestras consistentes en una torunda nasofaríngea o de la garganta, una torunda de las heces, o en una torunda de una herida o en una torunda rectal. Las muestras biológicas, pueden también incluir, así mismo, a secciones de tejidos, tales como las consistentes en una muestra de una biopsia o en una muestra de una autopsia, o en secciones congeladas, extraídas para propósitos histológicos. Una muestra biológica, se obtiene de cualquier tipo de animal, incluyendo, por ejemplo a un ser humano.

Las cantidades, se definen de una forma diferente a la que se describe por parte de la organización consistente en la Molecular Diagnostics Organization (www.qcmd.org) (Organización de Control de Calidad para Diagnósticos Moleculares), en donde, la organización, considera unas cantidades reportadas, diferentes, si estas no se encuentran dentro de un rango correspondiente a unos márgenes comprendidos dentro de un valor de 0,5 log 10 copias, lo cual, en el caso de los valores de C_{qS} (ó C_{IS}) corresponde a unos valores de $C_q \geq 2$.

Los términos consistentes en “cebador con alerón” (cebador de aleta), o “cebador con una proyección”, se refiere a un cebador, el cual comprende un segmento de la secuencia 5', no complementario con a una secuencia de ácido nucleico (tal como, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico del gen *ldh1* o una secuencia del ácido nucleico del gen *mecA*), y un segmento de la secuencia 3', complementario a la secuencia del ácido nucleico objetivizada como diana (tal como, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico del *mecA* ó del *ldh1*). Los cebadores con alero, son apropiados para la extensión o para la amplificación de la secuencia de ácido nucleico objetivizada como diana (tales como, por ejemplo, la correspondiente al gen *mecA* ó la correspondiente al gen *ldh1*). Los cebadores, pueden comprender uno más nucleótidos no complementarios, o modificados (tales como, por ejemplo, las pirazolopirimidinas, de la forma que éstas se encuentran descritas, más abajo, a continuación, en este documento de solicitud de patente), en cualquier posición, incluyendo, por ejemplo, al extremo 5'.

El término “sonda de generación fluorescente”, se refiere a, bien ya sea, a) a un oligonucleótido, el cual tenga unido, un ligando de surco menor, un fluoróforo, y un extintor, b) un oligonucleótido, el cual tenga unido, un fluoróforo, y un extintor, c) un oligonucleótido, el cual tenga unido, un surco menor y un fluoróforo, d) un oligonucleótido, el cual tenga unido, un fluoróforo, un extintor, o bien ya sea, e) un reactivo de unión al DNA. Las sondas, pueden comprender uno o más nucleótidos no complementarios o modificados (tales como, por ejemplo, las pirazolopirimidinas, de la forma que éstas se encuentran descritas, más abajo, a continuación, en este documento de solicitud de patente), en cualquier posición, incluyendo, por ejemplo, al extremo 5'. En algunas formas de presentación de la presente invención, el fluoróforo, se encuentra unido al nucleótido modificado. En algunas formas de presentación de la presente invención, la sonda, se encuentra segmentada, con objeto de producir una señal fluorescente.

Los términos “marcador fluorescente” o “fluoróforo”, se refieren a los compuestos con una máximo de emisión fluorescente, correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre los aprox. 400 nm y los aprox. 900 nm. Estos compuestos, incluyen, indicándose su emisión máxima en nm, entre paréntesis, a los consistentes Cy2™ (506), GFP (Red Shifted – [desplazado al rojo -]) (507), YO-PRO™-1 (509), YOYO™-1 (509), Calceina (517), FITC (518), FluorX™ (519), Alexa™ (520), Rodamina 110 (520), 5-FAM (522), Oregon Green™ 500 (522), Oregon Green™ 488 (524), RiboGreen™ (525), Rhodamine Green™ (527), Rodamina 123 (529), Magnesium Green™ (531), Calcium Green™ (533), TO-PRO™-1 (533), TOTO®-1 (533), JOE (548), BODIPY® 530 / 550 (550), DiI (565), BODIPY® 558/568 (568), BODIPY® 564 / 570 (570), Cy3™ (570), Alexa™ 546 (570), TRITC (572), Magnesium Orange™ (575), Phycoerythrin R&B (575), Rodamina faloidina (575), Calcium Orange™ (576), Pironina Y (580), Rodamina B (580), TAMRA (582), Rhodamine Red™ (590), Cy3.5™ (596), ROX (608), Calcium Crimson™ (615), Alexa™ 594 (615), Texas Red® (615), Rojo Nilo (628), YO-PRO™-3 (631), YOYO™-3 (631), R-ficocianina (642), C-Ficocianina (648), TO-PRO™-3 (660), TOTO®-3 (660), DiD DiIc (5) (665), Cy5™ (670), Tiadicarboianina (671), y Cy5.5 (694). Fluróferos adicionales, se dan a conocer en la publicación de patente PCT correspondiente a la

patente internacional con el número WO 03 / 023 357 y la patente estadounidense U. S. No. 7. 671. 218. Ejemplos de esta clase de colorantes o tinturas, o de otras clases, apropiadas, pueden encontrarse en Haugland et al., HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS, - Manual de sondas fluorescentes y agentes químicos de investigación -, SIXTH ED., Molecular Probes, - Sondas moleculares -, Eugene, Ore. (1996); en las patentes estadounidenses U S nº 3. 194. 805; U S nº 3. 128. 179; U S nº 5. 187. 288; U S nº 5. 188. 934; U S nº 5. 227. 487; U S nº 5. 248. 782; U S nº 5. 304. 645; U S nº 5. 433. 896; U S nº 5. 442. 045; U S nº 5. 556. 959; U S nº 5. 583. 236; U S nº 5. 808. 044; U S nº 5. 852. 191; U S nº 5. 986. 086; U S nº 6. 020. 481; U S nº 6. 162. 931; U S nº 6. 180. 295; y U S nº 6. 221. 604; en la patente europea EP nº 1 408 366; en Smith et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2 : 1195 – 1204 (1993); en Whitaker, et al., Anal. Biochem. 207 : 267 - 279 (1992); en Krasoviskii y Bolotin, ORGANIC LUMINESCENT MATERIALS, - Materiales orgánicos fluorescentes -, VCH Publishers, NY. (1988); en Zolliger, COLOR CHEMISTRY, - Química de los colores -, 2ª Edición, VCH Publishers, NY. (1991); en Hirschberg et al., Biochemistry, - Bioquímica -, 37 : 10381 - 10385 (1998); en Fieser y Fieser, REAGENTS FOR ORGANIC SYNTHESIS, - Reactivos para las síntesis orgánicas -, Volúmenes 1 a 17, Wiley, U S (1995); y en Geiger et al., Nature 359 : 859 - 861 (1992). Todavía otros colorantes o tinturas, son las que proporcionan vía sitios en línea (on line sites), tales como las consistentes en la web <http://www.zeiss.com>. Las tinturas o colorantes de fosfonatos, se dan a conocer en las patentes estadounidenses que son copropiedad del solicitante, consistentes en la U S nº 7. 671. 218 y la U S nº 7. 767. 834.

Existe un amplio asesoramiento de apoyo, en el arte especializado de la técnica, para la selección de pares de extintores y de fluoróforos, y su unión a oligonucleótidos (véase, a dicho efecto, Haugland, 1996; las patentes estadounidenses U S nº 3. 996. 345 y U S nº 4. 351. 760, y semejantes). Los extintores preferidos, son los que se encuentran descritos en la patente estadounidense U S nº 6. 727. 356. Otros extintores, incluyen a los extintores bis-azóicos (véase, a dicho efecto, la patente estadounidense U S nº 6. 790. 945) y las tinturas o colorantes procedentes de la firma Biosearch Technologies, Inc. (suministradas como extintores de del tipo "Black Hole™ Quenchers" consistentes en los extintores del tipo: BH-1, BH-2 y BH-3), Dabcyll, TAMRA y carboxitetrametil rodamina.

El término "engarce" (o ligando), se refiere a una porción, la cual se utiliza para ensamblar varias porciones de la molécula, o para unir la molécula (o porciones de ésta), de una forma covalente, a un soporte sólido. De una forma típica, engarce, o un grupo de engarce, tiene grupos funcionales, los cuales se utilizan para interactuar con grupos funcionales y formar, con éstos, enlaces covalentes, en los ligandos o componentes (tales como, por ejemplo, fluoróforos, oligonucleótidos, ligandos de surco menor, o extintores), o los conjugados los cuales se describen y se atizan aquí, en este documento de solicitud de patente. Los ejemplos de grupos funcionales en los grupos ligandos (previamente a la interacción con otros componentes), incluyen a los grupos funcionales consistentes en los grupos -NH₂, -NHNH₂, -ONH₂, -NHC=(O)NHNH₂, -OH, y -SH. Los grupos ligandos, son así, de este modo, aquéllas porciones de la molécula, las cuales conectan otros grupos (tales como, por ejemplo, los grupos consistentes en las porciones de fosforamidita y por el estilo) con el conjugado. De una forma adicional, un "engarce", puede incluir a porciones lineales o acíclicas, a porciones cíclicas, a anillos aromáticos, y a combinaciones de entre éstos.

El término "soporte sólido", se refiere a cualquier soporte, el cual sea compatible con las síntesis de oligonucleótidos, incluyendo, por ejemplo, al vidrio, al vidrio con poros controlados, a los materiales poliméricos, a las perlas de poliestireno, al vidrio recubierto, y por el estilo.

En la descripción la cual se facilita aquí, en este documento de solicitud de patente, la abreviaciones M, FL, Q, CPG, y ODN, se refieren a "marcador fluorescente" o "fluoróforo", "extintor", "vidrio de poros controlados" (como un ejemplo de un soporte sólido) y porciones o moléculas de "oligonucleótidos", respectivamente, y en una forma, la cual es evidente a raíz del contexto. Los términos "sonda" y "conjugado", se utilizan aquí, en este documento de solicitud de patente, de una forma intercambiable, y éstos se refieren a un oligonucleótido, el cual tiene un ligando de surco menor, unido, un fluoróforo unido, o un extintor unido.

El término "oligonucleótido", "ácido nucleico", y "polinucleótido, se utilizan aquí, en este documento de solicitud de patente, de una forma intercambiable. Estos términos, se refieren a un compuesto, el cual comprende a un ácido nucleico, a un nucleótido, o a sus polímeros, en ambas formas, una forma de hebra individual o una forma de doble hebra (de doble hélice), tal como, por ejemplo, un DNA, un RNA, o análogos de nucleótidos individuales, e híbridos de éstos. Los términos en cuestión, abarcan a los polímeros los cuales contienen nucleótidos modificados o que no son de origen natural, o a cualquier otro tipo de polímero, el cual sea capaz de aparear bases, de una forma estable, en el DNA ó RNA, incluyendo, aunque no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a los ácidos nucleicos peptídicos, de la forma que se describe por parte de Bolli et al., en Nucleic Acids Res., 24 : 4660 - 4667 (1996), y a las estructuras relacionadas con éstos. a menos de que se encuentren limitado de otro modo, los términos en cuestión, abarcan a los análogos conocidos de los nucleótidos naturales, los cuales hibridan, para su conversión en ácidos nucleicos, de una forma similar a los nucleótidos los cuales son de origen natural. Los ejemplos de dichas clases de análogos, incluyen, aunque no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a los fosfortioatos, los fosforoamidatos, los metil fosfonatos, los quiral-metil fosfonatos, los 2-O-metil ribonucleótidos, los ácidos nucleicos peptídicos (PNAs). Una "subsecuencia", o un "segmento", son términos los cuales se refieren a una secuencia de nucleótidos, la cual comprende una parte de una secuencia de nucleótidos, la cual es más larga.

La práctica de los procedimientos los cuales se describen aquí, en este documento de solicitud de patente, empleará, a menos de que se indique de otro modo, técnicas convencionales las cuales son usuales en la química orgánica, en la bioquímica, en la síntesis y la modificación de oligonucleótidos, en la química de bioconjugados, en la hibridación de ácidos nucleicos, en la biología molecular, en la microbiología, en la genética, en los DNA recombinantes, y en los sectores relacionados con las técnicas anteriormente mencionadas, tal y como éstos se conocen, por parte de aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica. Estas técnicas, se encuentran explicadas de una forma completa, en la literatura especializada. Véase, a dicho efecto, por ejemplo, Sambrook, Fritsch & Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, - Clonación molecular: Un manual de laboratorio -, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Ausubel, et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, - Protocolos actuales en la biología molecular -, John Wiley & Sons (1987, 1988, 1989, 1990, 1991, 1992, 1993, 1994, 1995, 1996); Gait (ed.), OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS: A PRACTICAL APPROACH, - Síntesis de oligonucleótidos: Un enfoque práctico -, IRL Press (1984); y Eckstein (ed.), OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES: A PRACTICAL APPROACH, - Oligonucleótidos y análogos, un enfoque práctico -, IRL Press (1991).

III. DESCRIPCIÓN

Los presentes procedimientos, pertenecen a la amplificación y / o detección de los ácidos nucleicos de los SA y MRSA, en base a la detección del *ldh1*, como un marcador de SA y del *mecA*, como un marcador de resistencia a la metilicina. Los cebadores y las sondas, son apropiados para su utilización en los presentes procedimientos para la detección de los SA y MRSA, de una forma simultánea, en una reacción individual, o en reacciones separadas. De una forma típica, los procedimientos en cuestión, se llevan a cabo en DNA genómico, el cual, a su vez, se amplifica mediante cualquier procedimiento de amplificación basado en DNA. Uno de dichos tipos de procedimientos de amplificación, es el consisten en la reacción en cadena de la polimerasa (véase, a dicho efecto, por ejemplo, las patentes estadounidenses U S nº 4. 683. 195 y U S nº 4. 965. 188; Mullis et al., Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 51 Pt 1 : 263 - 273 (1986)). Las amplificaciones, se llevan a cabo mediante la utilización de reactivos, los cuales se encuentran comercialmente disponibles en el mercado, de procedencia de varios proveedores (tal como, por ejemplo, de procedencia de las firmas Life Technologies; Carlsbad, CA; y Qiagen; Valencia, CA).

La amplificación de moldes de DNA, mediante la utilización de reacciones, se conoce bien, en arte especializado de la técnica (véase, a dicho efecto, por ejemplo, las patentes estadounidenses U S nº 4. 683. 195 y U S nº 4. 683. 202; PCR PROTOCOLS: A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS, - Protocolos de PCR: Una guía para los procedimientos y aplicaciones -, (Innis et al., eds, 1990)). Los procedimientos tales como los consistentes en la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR" - [del inglés, polymerase chain reaction] -) y la reacción en cadena de la ligasa ("LCR" - [del inglés, ligase chain reaction] -), pueden utilizarse para la amplificación de las secuencias de ácidos nucleicos de las secuencias objetivizadas como diana de los *ldh1* / *mecA*, directamente, a partir de una muestra, la cual se sospecha que contiene las secuencias objetivizadas como diana. La reacción en cuestión, de una forma preferible, se lleva a cabo en un ciclador térmico, con objeto de facilitar los tiempos de incubación a las temperaturas las cuales se desean. Pueden diseñarse oligonucleótidos degenerados, con objeto de amplificar homólogos de la secuencia de DNA objetivizada como diana, mediante la utilización de secuencias las cuales se conoce que codifican a la secuencia de DNA objetivizada como diana.

Las condiciones ejemplares para una reacción del tipo PCR, comprenden, de una forma típica, bien ya sea ciclos de dos etapas, o bien ya sea ciclos de tres etapas. Los ciclos de dos etapas, tienen una etapa de desnaturalización, seguida de una etapa de hibridación / clonación. Los ciclos de tres etapas, comprenden una etapa de desnaturalización, seguida de una etapa de hibridación, seguida de una etapa separada alargamiento. Para los propósitos de la PCR, es típica una temperatura correspondiente a un valor de aprox. 36 °C, para una amplificación de reducida estringencia, si bien, no obstante, las temperaturas de reasociación, pueden variar, dentro de un rango correspondiente a unos valores comprendidos dentro de unos márgenes situados entre los aprox. 32 °C y los aprox. 48 °C, en dependencia de la longitud de cebador. Para la amplificación por PCR de alta estringencia, es típica una temperatura correspondiente a un valor de aprox. 62 °C, si bien, no obstante, las temperaturas de reasociación, pueden variar, dentro de un rango correspondiente a unos valores comprendidos dentro de unos márgenes que van desde los aprox. 50 °C a los aprox. 65 °C, en dependencia de la longitud de cebador y de la especificidad. Las condiciones típicas del ciclo, para ambos tipos de amplificación, la amplificación de alta estringencia y la amplificación de baja estringencia, incluyen una fase de desnaturalización, a una temperatura correspondiente a un valor de aprox. 90 °C - 95 °C, durante un transcurso de tiempo de 0 segundos - 15 minutos, una fase de reasociación a una temperatura de aprox. 56 °C - 60 °C, durante un transcurso de tiempo de 0 segundos - 2 minutos, y una fase de extensión a una temperatura de aprox. 72 °C - 76 °C, durante un transcurso de tiempo de 0 segundos - 2 minutos. Un protocolo de ciclo preferido, tiene una fase de desnaturalización, a una temperatura de 93 °C, durante un transcurso de tiempo de 10 segundos, una fase de reasociación, a una temperatura de 56 °C, durante un transcurso de tiempo de 30 segundos, y una fase de extensión, a una temperatura de 72 °C, durante un transcurso de tiempo de 15 segundos.

De una forma general, el presente procedimiento, en concordancia con la presente invención, es para la detección de estafilococos áureos resistentes a la metilicina, en una muestra, la cual contiene ácidos nucleicos, mediante la amplificación de los ácidos nucleicos existentes en la muestra en cuestión y, a continuación, detectar los ácidos

nucleicos en la muestra, los cuales comprendan genes amplificados de *mecA* y *ldh1*. La presencia de genes de amplificados de *mecA* y de *ldh1*, en cantidades iguales, indica la presencia de estafilococos áureos resistentes a la meticilina.

5 De una forma correspondientemente en concordancia, en uno de sus aspectos, un ejemplo del presente procedimiento, en concordancia con la presente invención, para la detección de un ácido nucleico de *ldh1* y de *mecA*, en una muestra, comprende las siguientes etapas:

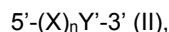
10 (a) contactar una muestra, la cual se sospecha que contenga el ácido nucleico del *ldh1*, con un primer cebador de aleta (cebador con alerón), y con un segundo cebador de aleta, que tienen la fórmula:



15 en donde, X representa la porción 5' del cebador de aleta, la cual no es complementaria al ácido nucleico del SA, y en donde, $n = 1$,

Y, representa la porción 3' del cebador de aleta, la cual es complementaria al ácido nucleico del *ldh1*, en donde, X, es de aprox. 3 – 30 nucleótidos de longitud,

20 b) contactar la misma muestra la cual es sospechosa de contener el ácido nucleico del *mecA*, con un tercer cebador de aleta y un cuarto cebador de aleta, que tiene la fórmula:



25 en donde, X representa la porción 5' del cebador de aleta, la cual no es complementaria al ácido nucleico del *mecA*, y en donde, $n = 1$,

Y', representa la porción 3' del cebador de aleta, la cual es complementaria al ácido nucleico del *mecA*, en donde, X, es de aprox. 3 – 30 nucleótidos de longitud;

30 c) incubar la mezcla de la etapa (a) y la etapa (b), bajo unas condiciones, las cuales sean suficientes, como para amplificar los ácidos nucleicos del *ldh1* y del *mecA*, generando, con ello, ácidos nucleicos amplificados del *ldh1* y del *mecA*; y

(d) detectar los ácidos nucleicos de los *ldh1* y *mecA*, en el caso en el que éstos se encuentren presentes.

35 El ácido nucleico del *ldh1* y del *mecA*, puede comprender las siguientes secuencias:

SEQ ID NO:1:

40 GGTGAACATGGTGACACTGAATTACCAGTATGGTCACACGCTAATATTGCGGGTC
AACCTTTGAAGACATTACTTGAACAACGTCCTGAGGGCAAAGCGC (SEQ ID NO:1)

SEQ ID NO:2:

45 GTGCGTTAATATTGCCATTATTTTCTAATGCGCTATAGATTGAAAGGATCTGTACT
GGGTTAATCAGTATTTACCTTGTCGTAACC (SEQ ID NO:2)

50 La amplificación de los ácidos nucleicos del *mecA* y del *ldh1*, pueden controlarse continuamente, mediante un seguimiento de control y proceder así a determinar las concentraciones relativas a tiempo real. En algunas formas de presentación del procedimiento en concordancia con la presente invención, los ácidos nucleicos amplificados del *mecA* y del *ldh1*, se encuentran presentes en un factor de relación de 1 : 1. Una diferencia en la concentración, indica el hecho de una infección mixta de estafilococos áureos con un soporte o portador coagulasa-negativo del *mecA*, en la muestra.

55 En una forma de presentación del procedimiento en concordancia con la presente invención, la detección, se lleva a cabo con una primera sonda que genera fluorescencia, la cual es específica para el *ldh1*, y una segunda sonda que genera fluorescencia, la cual es específica para el *mecA*, en donde, las longitudes de onda de la emisión, son diferentes. En algunas formas de presentación del procedimiento en concordancia con la presente invención, la detección, se lleva a cabo con cebadores marcados de una forma específica para el *ldh1* y para el *mecA*, los cuales pueden ser cebadores los cuales generan fluorescencia.

65 En algunas formas de presentación en concordancia con la presente invención, se proporciona procedimientos para la detección del ácido nucleico de los *ldh1* y *mecA*, en una muestra con un control interno.

En algunas formas de presentación en concordancia con la presente invención, se proporciona procedimientos para la comparación de los cantidades relativas de los ácidos nucleicos del *ldh1* y del *mecA*, en una muestra.

5 En algunas formas de presentación en concordancia con la presente invención, se proporciona procedimientos para la detección del *ldh1* y del *mecA*, adicionalmente al sitio o sitios de integración del *SCCmec*, ó de la región de puente de éste (de éstos). Se han dado a conocer, en el arte especializado de la técnica, procedimientos para la detección sitios de integración del *mecA*, corriente arriba o corriente debajo del gen *mecA*. La patente estadounidense U S n° 6. 156. 507, da a conocer un procedimiento, el cual comprende la realización de una reacción, con una muestra, mediante la utilización de una secuencia de nucleótidos de un DNA cromosómico, la cual
10 circunda a un sitio integrado de un cromosoma de un MSSA ó estafilococos coagulasa-negativos resistentes a la meticilina (MSC-NS – [del inglés methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci] -), en donde, el citado procedimiento, hace uso de un incidente o suceso de reacción negativa, cuando la citada muestra, contiene un *SCCmec* integrado en ella. La patente estadounidense U S n° 7. 838. 221, describe procedimientos, los cuales utilizan nuevas secuencias de empalme a la extremidad derecha (MREJ – [de sus iniciales en inglés] del *SCCmec*,
15 para la detección y / o identificación de estafilococos áureos resistentes a la meticilina (MRSA).

En la realización de los presentes procedimientos, en concordancia con la presente invención, la reacción, de una forma típica, comprende dos cebadores de aleta: un cebador de aleta de avance y un cebador de aleta inverso. El cebador de aleta, de avance, y el cebador de aleta (de retroceso), pueden ser, aunque no necesitan ser, de unas longitudes iguales. En algunas formas de presentación, los cebadores de aleta, se utilizan allí en donde, n = 0, en uno o en más cebadores.

En una forma de presentación del procedimiento en concordancia con la presente invención, la porción de la secuencia 5' del cebador de alero, la cual no es complementaria al ácido nucleico del SA ó del MRSA, (X), es de aprox. 9 – 15 nucleótidos de longitud, siendo éste, de una forma usual, de aprox. 10 - 14 nucleótidos de longitud, o de aprox. 11 – 13 nucleótidos de longitud, y siendo éste, de una forma más usual, de aprox. 12 nucleótidos de longitud. La porción de la secuencia 5' del cebador de aleta, la cual no es complementaria al ácido nucleico del SA ó del MRSA, puede ser de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, ó de 15 nucleótidos de longitud.

30 En algunos casos, en concordancia con la presente invención, la porción de la secuencia 3', de los cebadores de aleta, la cual es complementaria al ácido nucleico del SA ó del MRSA, (Y), comprende una cantidad mayor de nucleótidos, que la porción de secuencia 5' del cebador de aleta, el cual no es complementario al ácido nucleico de los SA y MRSA, (X). Así, por ejemplo la porción de la secuencia 3' del cebador de alero, la cual es complementaria al ácido nucleico de los SA ó MRSA, (Y), puede comprender un porcentaje de aprox. un 55 %, un 60 %, un 65 %, un
35 70 %, un 75%, un 80 %, un 85 %, ó un 90 %, de la longitud total del cebador de alero.

En algunos otros casos, en concordancia con la presente invención, la porción de la secuencia 5' del cebador de alero, la cual no es complementaria al ácido nucleico del SA ó del MRSA, (X), comprende aproximadamente un número igual de nucleótidos, que el correspondiente a la porción de la secuencia 3' del cebador de alero, la cual es complementaria al ácido nucleico de los SA ó MRSA, (Y). Así, por ejemplo, las porciones X e Y, pueden ser, cada una de ellas, de aprox. 4 - 30, 6 - 25, 8 - 20, ó de 10 – 15 nucleótidos de longitud, siendo éstas, de una forma usual, de aprox. 10 - 14 nucleótidos de longitud, o de aprox. 11 – 13 nucleótidos de longitud, y siendo éstas, de una forma más usual, de aprox. 12 nucleótidos de longitud. Las porciones S e Y, pueden ser, cada una de ellas, de 4, 5, 6, 7, 8,
45 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, ó 30 nucleótidos de longitud.

En otra forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la porción de secuencia 5' del cebador de aleta, la cual no es complementaria al ácido nucleico de los SA ó *mecA*, (X), comprende por lo menos un porcentaje del 60 %, del 65 %, del 70 %, del 75 %, del 80 %, del 90 % ó del 95 % de bases nucleotídicas de adenina o de timina, o bases modificadas de éstas.

50 En algunas formas de presentación, en concordancia con la presente invención, la porción de la secuencia 5' del cebador de aleta, la cual no es complementaria al ácido nucleico de los *ldh1* ó *mecA* SA ó *mecA*, (X), comprende la siguiente secuencia: AATAAATCATAA (SEQ ID NO:3).

55 En algunas formas de presentación, en concordancia con la presente invención, se proporcionan cebadores, sin aletas complementarias a ácido nucleico del *ldh1* ó del *mecA*, para la amplificación. En algunas formas de presentación, se proporciona un cebador de aleta, y cebador sin una aleta.

En otras formas de presentación en concordancia con la presente invención, la porción Y del cebador de aleta, comprende la siguiente secuencia: GGT*GA*ACA*TGTTGACTGAAT-3' (SEQ ID No:4), en donde, T* es 5-(4-hidroxi-but-1-inil)-1H-pirimidin-2,4-diona (SUPER T®, de Elitech Group – [Grupo Elitech -] y A* es 4-(4,6-Diamino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-but-3-in-1-ol (SUPER A®, de Elitech Group) – [Grupo Elitech] -). En otras formas adicionales de presentación de la presente invención, la porción Y del segundo cebador de aleta, comprende la siguiente secuencia: GCGCTTTGCCCTCAGGACG-3' (SEQ ID NO:5). De una forma preferible, el primer cebador de aleta, comprende la siguiente secuencia: 5'-AATAAATCATAAGGT*GA*ACA*TGTTGACTGAAT-3' (SEQ ID NO:6), en donde, la secuencia de nucleótidos subrayada, no es complementaria a la secuencia del SA, y T* es

SUPER T®, y A* es SUPER A®; y segundo cebador de aleta, comprende la siguiente secuencia: 5'AATAAATCATAAGCGCTTTGCCCTCAGGACG-3' (SEQ ID NO:7), en donde, la secuencia de nucleótidos subrayada, no es complementaria a la secuencia del *ldh1*.

5 En otras formas de presentación de la presente invención, el cebador de *mecA*, de aleta, comprende la siguiente secuencia: GTGCGTTAATATTGCCATTATTTTCTAATGCG-3' (SEQ ID NO:8), en donde, n = 0. En otras formas adicionales de presentación de la presente invención, el cuarto cebador de *mecA*, comprende la siguiente secuencia: GGTTACGGACAAGGTGAAATAITGATTAACC-3' (SEQ ID NO:9), en donde, x = 0, e l es 3-alquil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (Super Inosine).

10 La muestra, se obtiene, de una forma típica, a partir de un animal el cual es sospechoso de tener una infección por SA / MRSA. De una forma preferible, el animal, es un ser humano. Los ejemplos de las muestras las cuales son apropiadas para su uso en los procedimientos en concordancia con la presente invención, incluyen, aunque no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a fluido cerebroespinal (CSF – [del inglés, cerebrospinal fluid] -), una torunda nasofaríngea, una torunda de la garganta, una torunda de una herida o una torunda rectal, una muestra de la heces, 15 y una combinación de éstos.

Los ácidos nucleicos de los *ldh1* y *mecA*, pueden detectarse mediante la utilización de cualquiera de los procedimientos de detección, los cuales se conocen en el arte especializado de técnica. Así, por ejemplo, la 20 detección de estos ácidos nucleicos, puede llevarse a cabo después de haberse completado una reacción de amplificación (tal como, por ejemplo, mediante la utilización de bromuro de etidio, en un gel de agarosa), o de una forma simultánea, durante la reacción de amplificación (“detección a tiempo real”). Véase, a dicho efecto, por ejemplo, PCR Primer: A Laboratory Manual, - Cebadores de PCR -, Dieffenbach et al. (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press (2003); McPherson et al., PCR Basics, 2000, - Conceptos básicos de la PCR, 2000 -; y Rapid Cycle Real-time PCR Methods and Applications: Quantification, - Procedimientos y aplicaciones de PCR tiempo real, de ciclo rápido: Cuantificación -, Wittwer et al. (eds.), Springer-Verlag (2004). De una forma preferible, los ácidos 25 nucleicos del SA y del MRSA, amplificados, se detectan mediante la hibridación a una sonda, la cual se una, de una forma específica, a un ácido nucleico del SA ó del MRSA, amplificados. En ciertos casos, el ácido nucleico del *ldh1* o del *mecA*, amplificados, pueden detectarse mediante la utilización de una o de dos sondas de generación de fluorescencia. Las sondas de generación de fluorescencia, incluyen a las sondas, las cuales se segmentan para liberar fluorescencia (tales como, por ejemplo, las consistentes en las sondas Taqman, Centaurus, etc.), a los compuestos de unión de ácidos nucleicos, (tales como, por ejemplo, los que se dan a conocer en las patentes estadounidenses U S n° 5. 994. 056, U S n° 6. 171. 785, y U S n° 6. 569. 627; y en Bengtsson et al., Nucl. Acids Res., 31: e45 (2003)), a las sondas basadas en la hibridación (tales como, por las de MGB Eclipse, Molecular Beacons, Pleiades, Centaurus, etc.), y por el estilo. En determinadas formas de presentación, en concordancia con la presente invención, el ácido nucleico de los SA ó MRSA, se detecta mediante la utilización de uno o de más 30 compuestos fluorescentes que se unen a uno o más ácidos nucleicos (tales como por ejemplo, los consistentes en el SYBR® Green 1 (de procedencia de la firma Molecular Probes; Eugene, OR), BOXTOX, BEBO (de procedencia de la firma TATAA Biocenter; Gotenborg, Suecia), etc.).

40 En una forma de presentación de la presente invención, el ácido nucleico del *ldh1* ó del *mecA*, se detecta mediante la utilización de una sonda de generación de fluorescencia, la cual hibrida a ambos, bien ya sea el ácido nucleico *ldh1* ó el ácido nucleico del *mecA*, y una o más bases de ácido nucleico, de por lo menos una secuencia del cebador de aleta (de una forma típica, la porción complementaria, Y). Así, por ejemplo, la sonda de generación de 45 fluorescencia, puede hibridar al ácido nucleico SA, y a una o más bases de nucleótidos, de la secuencia del cebador de aleta de retroceso (inverso), o de una forma simultánea, a una o más bases de nucleótidos, de ambas secuencias, las secuencias del cebador de aleta, de avance y del cebador inverso, de retroceso. La sonda de generación de fluorescencia, puede hibridar, de una forma opcional, al ácido nucleico del *ldh1* ó del *mecA*, y a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ó 10 bases de nucleótidos, de por lo menos una secuencia del cebador de aleta, de una forma 50 particular, la porción complementaria (Y) de un cebador de aleta.

En una forma preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, la sonda de generación de fluorescencia, para el gen *ldh1*, comprende la siguiente secuencia:

55 5'-Ra-G*ACATTACT*T*GA*ACAA*CG-Rb-5' (SEQ ID NO:10),

en donde, Ra, se selecciona, de una forma independiente, de entre (M)_a-F1 y (M)_a-Q, Rb se selecciona, de una forma independiente, de entre (M)_a-F1 y (M)_a-Q, y M es un ligando de surco menor, a es 0 ó 1, F1 es un fluoróforo con una longitud de onda de emisión, correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados 60 entre los 400 nm y los 900 nm, G* es 6-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (SUPER G®, Elitech Group – [Grupo Elitech] -), y Q es un extintor no fluorescente, con la condición de que, la sustitución de Ra y de Rb, permita la extinción de la fluorescencia, cuando la sonda, se encuentra en estado no hibridado.

En otra forma preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, la sonda de generación de 65 fluorescencia, para el gen *mecA*, comprende la siguiente secuencia:

5'-Ra- G*AAAGGATCTGTACTGG*G-Rb-5' (SEQ ID NO:11),

en donde, Ra, se selecciona, de una forma independiente, de entre (M)_a-FI y (M)_a-Q, Rb se selecciona, de una forma independiente, de entre (M)_a-FI y (M)_a-Q, y M es un ligando de surco menor, a es 0 ó 1, F1 es un fluoróforo con una longitud de onda de emisión, correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre los 400 nm y los 900 nm, G* es SUPER G®, (Elitech Group – [Grupo Elitech] -), y Q es un extintor no fluorescente, con la condición de que, la sustitución de Ra y de Rb, permita la extinción de la fluorescencia, cuando la sonda, se encuentra en estado no hibridado.

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, Ra, en la SEQ ID NO:10 es (M)_a-FI, en donde, M es DPI3, F1 es Aquaphlour™ 554, y Q es el extintor consistente en el "Eclipse® Dark Quencher" y la SEQ ID NO:11, Ra en la SEQ ID NO:11 es (M)_a-FI, en donde, M es DPI3, FI es FAM y Q es el extintor consistente en el Eclipse® Dark.

Los cebadores preferidos, en concordancia con la presente invención, pueden incorporar características y rasgos distintivos adicionales, los cuales permiten la detección o la inmovilización del cebador, pero los cuales no modifican la propiedad básica del cebador, tal como, por ejemplo, la propiedad consistente en actuar como un punto de iniciación de la síntesis de los ácidos nucleicos. En determinados casos, los cebadores en cuestión, contienen una o más bases no naturales, o bases modificadas, en ambas regiones de la secuencia del cebador, las regiones de la secuencia complementaria del cebador, y las regiones de la secuencia no complementaria del cebador.

En ciertas formas de presentación, en concordancia con la presente invención, la amplificación, se lleva a cabo mediante la utilización de una polimerasa. La polimerasa, puede tener, aunque no de una forma necesaria, actividad nucleasa 5'. En determinados casos distintos a éste, la extensión del cebador, se lleva a cabo mediante la utilización de la transcriptasa inversa y, la amplificación, se lleva a cabo mediante la utilización de una polimerasa.

En otra forma de presentación, en concordancia con la presente invención, las secuencias de los cebadores, se solapan, en donde, la estabilidad del dúplex de las secuencias de solapado, es inferior a la estabilidad de los dúplexes de los cebadores individuales, objetivizados como diana.

En otro aspecto, en concordancia con la presente invención, se proporcionan procedimientos, para proceder a la detección simultánea de ácidos nucleicos, a partir de una pluralidad de *S. aureus*, en una muestra, comprendiendo, los procedimientos:

(a) contactar una muestra, la cual se sospecha que contiene ácidos nucleicos de *S. aureus*, con:

(i) un primer cebador de aleta, el cual comprende la siguiente secuencia:
5'-AATAAATCATAAGGT*GA*ACA*TGGTGACACTGAAT-3' (SEQ ID NO:6, en donde, la secuencia de nucleótidos, la cual se encuentra subrayada, no es complementaria a la secuencia del *ldh1*, y A* es SuperA®, y T*, es bases modificadas con Super T®; y

(ii) un segundo cebador de aleta, el cual comprende la siguiente secuencia:
5'-AATAAATCATAAGCGCTTTGCCCTCAGGACG-3' (SEQ ID NO:7), en donde, la secuencia de nucleótidos la cual no se encuentra subrayada, no es complementaria a la secuencia del *ldh1*.

(b) incubar la mezcla de reacción de etapa (a), en unas condiciones las cuales sean suficientes como para amplificar el ácido nucleico del *ldh1*, generando con ello ácidos nucleicos amplificados, a partir de una muestra la cual contiene SA; y

(c) detectar los ácidos nucleicos amplificados del SA.

En el procedimiento en concordancia con la presente invención, para la detección simultánea de ácidos nucleicos, puede procederse a añadir una etapa adicional, después de la etapa (a), de contactar la muestra, después de la etapa (a), en la cual, la mezcla de la etapa (a) se contacta con:

(i) un tercer cebador de aleta, el cual comprende una secuencia de la SEQ ID NO:8,
GTGCGTTAATATTGCCATTATTTTCTAATGCG; y

(ii) un cuarto cebador de aleta, el cual comprende una segunda secuencia de la SEQ ID NO:9,
GGTTACGGACAAGGTGAAATAITGATTAACC, en donde, I, es 3-alquil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (Super Inosine – [Super Inosina] -), en donde, los cebadores consistentes en el tercer y cebador de aleta y el cuarto cebador de aleta, comprenden, cada uno de ellos, un porción de secuencia, la cual complementaria a al ácido nucleico del *mecA*.

En una forma preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, los cebadores y las sondas para la detección de los *mecA*, *ldh1*, y el control se multiplexan. Cada una de las sondas, se marca de una forma

individual, con un marcador diferente. En otra forma de presentación, en concordancia con la presente invención, las sondas en cuestión, tienen el mismo marcador.

5 La muestra, se obtiene, de una forma típica, a partir de un animal, el cual se sospecha que tiene una infección por MRSA. De una forma preferible, el animal, es un ser humano. Los ejemplos de las muestras las cuales son apropiadas para su uso en los procedimientos en concordancia con la presente invención, incluyen, aunque no de una forma limitativa en cuanto a éstos, una torunda de una herida, una torunda nasofaríngea, una torunda de la garganta, una torunda rectal, una muestra de las heces, y una combinación de éstos.

10 En todavía otro aspecto, en concordancia con la presente invención, se proporcionan equipos, a modo de "kits", en una muestra, los cuales comprenden:

(a) un primer cebador de aleta, la cual comprende la siguiente secuencia:

15 5'-AATAAATCATAAGGT*GA*ACA*TGGTGACTGAAT-3' (SEQ ID NO:6), en donde, la secuencia de nucleótidos subrayada, no es complementaria a la secuencia del *ldh1*, y en donde, A* es Super A, y T* es Super T; y

(b) un segundo cebador de aleta, el cual comprende la siguiente secuencia:

20 5' AATAAATCATAAGCGCTTTGCCCTCAGGACG -3' (SEQ ID NO:7), en donde, la secuencia de nucleótidos subrayada, no es complementaria a la secuencia del *ldh1*.

En otro aspecto, en concordancia con la presente invención, se proporcionan quipos, a modo de "kits", para la detección de los ácidos nucleicos del *mecA*, en una muestra, bien ya sea solos, o bien ya sea combinación con aquéllos los cuales de utilizan para la detección de los ácidos nucleicos del *ldh1*, los cuales comprenden:

25 (a) un primer cebador, el cual comprende la siguiente secuencia:

5'-GTGCGTTAATATTGCCATTATTTTCTAATGCG -3' (SEQ ID NO:8), y

(b) un segundo cebador, el cual comprende la siguiente secuencia:

30 5' GGTTACGGACAAGGTGAAATAITGATTAACC -3' (SEQ ID NO:9).

En ciertas formas de presentación, en concordancia con la presente invención, los equipos, a modo de "kits", comprenden, de una forma adicional, una sonda de generación de fluorescencia, tal como la consistente en una sonda fluorescente la cual se basa en hibridación, o un compuesto fluorescente de unión al ácido nucleico.

35 En una forma preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, la sonda de generación de fluorescencia, del *ldh1*, comprende la siguiente secuencia:

5'-Ra-G*ACATTA*CT*GA*ACAA*CG-Rb-5' (SEQ ID NO:10),

40 en donde, Ra, se selecciona, de una forma independiente, de entre (M)_a-F1 y (M)_a-Q, Rb se selecciona, de una forma independiente, de entre (M)_a-F1 y (M)_a-Q, y M es un ligando de surco menor, a es 0 ó 1, F1 es un fluoróforo con una longitud de onda de emisión, correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre los 400 nm y los 900 nm, G* es SUPER G®, (Elitech Group – [Grupo Elitech] -), y Q es un extintor no fluorescente, con la condición de que, la sustitución de Ra y de Rb, permita la extinción de la fluorescencia, cuando la sonda, se encuentra en estado no hibridado.

En otros casos, en concordancia con la presente invención, los equipos a modo de "kits", comprenden, de una forma adicional, una sonda de generación de fluorescencia, tal como la consistente en una sonda fluorescente la cual se basa en hibridación, o un compuesto fluorescente de unión al ácido nucleico. En otra forma preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, la sonda de generación del fluorescencia, del *mecA*, comprende la siguiente secuencia:

50 5'-Ra-G*AAAGGATCTGTA*CTGG*G-Rb-3' (SEQ ID NO:11),

55 en donde, Ra, se selecciona, de una forma independiente, de entre (M)_a-F1 y (M)_a-Q, Rb se selecciona, de una forma independiente, de entre (M)_a-F1 y (M)_a-Q, y M es un ligando de surco menor, a es 0 ó 1, F1 es un fluoróforo con una longitud de onda de emisión, correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre los 400 nm y los 900 nm, G* es SUPER G®, (Elitech Group – [Grupo Elitech] -), y Q es un extintor no fluorescente, con la condición de que, la sustitución de Ra y de Rb, permita la extinción de la fluorescencia, cuando la sonda, se encuentra en estado no hibridado.

En todavía otro caso, en concordancia con la presente invención, los equipos a modo de "kits", comprenden un par de cebadores del *ldh1* y un par de cebadores del *mecA*.

65 En algunos casos, en concordancia con la presente invención, los equipos de modo de "kits", comprenden una sonda del *ldh1* y una sonda del *mecA*.

En determinados otros casos, en concordancia con la presente invención, los equipos a modo de "kits", comprenden un ácido nucleico de control, el cual es apropiado para su uso como un control interno. El molde IC (molde del control interior), contienen un fragmento de DNA objetivizado como diana, no específico, sin sentido, en un vector plásmido. De una forma preferible, el inserto del plásmido, del ácido nucleico de control, comprende la siguiente secuencia:

5'-

10 CTGCACGGACCAGTTACTTTACGGACCACGTACCGCATTGGTACAAGATCTCCGGTA
GAAAAAATGAG-3' (SEQ ID NO:12).

Los equipos a modo de "kits", en concordancia con la presente invención, pueden también comprender, así mismo, también, cebadores y sondas, dirigidas contra el ácido nucleico de control. A título de ejemplo no limitativo, puede incluirse, en los equipos a modo de "kits", una sonda de control (tal como, por ejemplo, una sonda consistente en una sonda de generación de fluorescencia), y un juego de cebadores de control, diseñados contra la secuencia de ácido nucleico, del fragmento del DNA objetivizado como diana, no específico, sin sentido, en un vector plásmido (SEQ ID NO:12). De una forma preferible, la sonda y los cebadores de control, tienen las siguientes secuencias:

20 Sonda: 5'-Ra-G* AATG*CGGTACGTGGTCC-Rb-3' (SEQ ID NO:13);
Cebadores: CTGCACGGACCAGTTACTTTACG (SEQ ID NO:14);
CTCATT TTTTCTACCGGAGATCTTGT (SEQ ID NO:15),

25 en donde, Ra, se selecciona, de una forma independiente, de entre (M)_a-F1 y (M)_a-Q, Rb se selecciona, de una forma independiente, de entre (M)_a-F1 y (M)_a-Q, y M es un ligando de surco menor, a es 0 ó 1, F1 es un fluoróforo con una longitud de onda de emisión, correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre los 400 nm y los 900 nm, G* es SUPER G®, (Elitech Group – [Grupo Elitech] -), y Q es un extintor no fluorescente, con la condición de que, la sustitución de Ra y de Rb, permita la extinción de la fluorescencia, cuando la sonda, se encuentra en estado no hibridado.

En formas adicionales de presentación, en concordancia con la presente invención, una mutación, en los genes del *ldh1* y del *mecA*, pueden detectarse mediante la utilización del siguiente procedimiento:

35 (a) contactar una muestra, con un primer cebador de aleta (cebador con alerón), y con un segundo cebador de aleta, que tiene la fórmula:

$$5'-(X)_n Y-3' (I),$$

40 en donde, X representa la porción 5' de los cebadores de aleta, la cual no es complementaria al ácido nucleico del gen *ldh1*, n es 1, Y, representa la porción 3' de los cebadores de aleta, la cual es complementaria al es complementaria al gen *ldh1*, y X, es de aprox. 3 – 30 nucleótidos de longitud,

45 b) contactar la muestra, después de la etapa (a), con un tercer cebador de aleta y un cuarto cebador de aleta, que tiene la fórmula:

$$5'-(X)_n Y'-3' (II),$$

50 en donde, X representa la porción 5' de los cebadores de aleta, la cual no es complementaria al gen *mecA*, n es 1, Y', representa la porción 3' de los cebadores de aleta, la cual es complementaria al gen *mecA*, y X, es de aprox. 3 – 30 nucleótidos de longitud;

55 c) incubar la muestra, a continuación de las etapas consistentes en la etapa (a) y la etapa (b), bajo unas condiciones, las cuales sean suficientes, como para producir los genes *ldh1* y *mecA*, amplificados; y

60 (d) contactar los genes *ldh1* y *mecA*, amplificados, con las sondas de generación de fluorescencia, en donde, una primera sonda de generación de fluorescencia, es complementaria al gen *ldh1*, amplificado, y un gen *ldh1* del tipo salvaje, y una segunda sonda de generación de fluorescencia, es complementaria al gen *mecA*, amplificado, y a un gen *mecA* del tipo salvaje.

65 (e) realizar una análisis de la curva de fusión, sobre los genes *ldh1* y *mecA*, en presencia de las sondas de generación de fluorescencia, en donde, una diferencia correspondiente a un valor de aprox. 3 – 12 °C, entre la temperatura de fusión (T_m) de los ácidos nucleicos del *ldh1* del tipo salvaje, amplificados, indica la presencia de una mutación, en el ácido nucleico del *ldh1*, amplificado, y una diferencia correspondiente a un valor de aprox. 3 – 12 °C, en la temperatura de fusión (T_m) de los ácidos nucleicos del *mecA*, del tipo salvaje, amplificados, indica la presencia de una mutación en el ácido nucleico del *mecA*, amplificado.

5 El procedimiento en concordancia con la presente invención, puede incluir, de una forma adicional, el proceder a determinar la infección mixta, en donde, las señales del *ldh1* y del *mecA*, ó del *mecA_{LGA251}*, proceden de diferentes organismos, mediante la comparación de las cantidades relativas de los marcadores del *ldh1* y del *mecA*, ó del *mecA_{LGA251}*. Unas cantidades iguales del *ldh1* y del *mecA*, ó del *ldh1* y del *mecA_{LGA251}*, sugieren el hecho de una infección por MRSA, mientras que, diferentes cantidades, sugieren el hecho de una infección mixta de los portadores del *ldh1* y del *mecA*.

10 El presente procedimiento, permite una detección rápida, sensible y específica, del SA y del MRSA. La infección por MRSA, no es a menudo clínicamente distinguible, de otras bacterias portadoras del *mecA* y otros patógenos víricos, para los cuales se encuentran disponibles terapias específicas. Los presentes procedimientos, en concordancia con la presente invención, superan este problema existente en la diagnosis, procediendo a proporcionar una detección específica y rápida del SA y del MRSA, eliminando, con ello, los falsos positivos, los cuales se observan en algunos de los ensayos pertenecientes al arte especializado de la técnica. De una forma adicional, las sondas las cuales se basan en la hibridación, permiten el llevar a cabo los análisis de las curvas de fusión, análisis éstos, los cuales pueden identificar nuevos mutantes potenciales del *ldh1* y del *mecA*, ó del *mecA_{LGA251}*.

20 En determinados otros casos, en concordancia con la presente invención, los equipos a modo de “kits”, comprenden, de una forma adicional, un ácido nucleico de control, el cual es apropiado para su uso como un control positivo (PC – [del inglés, positive control] -). El molde del control positivo, contiene porciones del DNA del *ldh1* y del *mecA*, en un vector plásmido. De una forma preferible, el inserto del plásmido, del ácido nucleico de control, comprende la siguiente secuencia:

25 5'-
ACGTAGCGTCGATGCTCAAATTATTGGTGAACATGGTGACACTGAATTACCAGTATG
30 GTCACACGCTAATATTGCGGGTCAACCTTTGAAGACATTACTTGAACAACGTCCTGA
GGGCAAAGCGCAAATTGAACAAATTTTTGTTCAAACACGTGATGCAGCATATGACAT
TATTCAAGCTAAAGGTGCCACTTATTATGGTGTGCAATGGGATTAGCTAGAAGCTA
35 TCTGCAGAATTCGCCCTTTACGACTTGTTGCATACCATCAGTTAATAGATTGATATT
TTCTTTGGAATAATATTTTTCTTCCAAACTTTGTTTTTCGTGTCTTTTAATAAGTGAG
GTGCGTTAATATTGCCATTATTTTCTAATGCGCTATAGATTGAAAGGATCTGTACTGG
40 GTTAATCAGTATTTACCTTGTCGTAACCTGAATCAGCTAATAATATTTTCATTATCT
AAATTTTTGTTTGAAATTTGAGCATTATAAAATGGATAATCACTTGGTATATCTTAC
45 CAACACCTAG-3' (SEQ ID NO:18).

50 En determinados otros casos, en concordancia con la presente invención, los equipos a modo de “kits”, comprenden, de una forma adicional, un ácido nucleico de control, el cual es apropiado para su uso como un control positivo de *mecA_{LGA251}* (*mecA_{LGA251}* PC). Éste contiene un fragmento individual de gen *mecA* LGA251, en un vector plásmido. De una forma preferible, el inserto de plásmido del ácido nucleico de control, comprende la siguiente secuencia:

55 CTCGTCAGAATTAATTGGACCCACATAACCTAAAAGGTGTACTGT
TGCTTCGTTCAATGGATAAACACGGC (SEQ ID NO:19)

60 En otras formas de presentación, en concordancia con la presente invención, se proceden cebadores sin aletas, complementarios al *mecA_{LGA251}*, par la amplificación. En algunas formas de presentación, en concordancia con la presente invención, ambos cebadores, son cebadores sin aletas. En otras formas de presentación, en concordancia con la presente invención, se proporciona un cebador sin una aleta, y un cebador de aleta (con aleta).

65 En algunas formas de presentación, en concordancia con la presente invención, la amplificación del primer cebador de *mecA_{LGA251}*, comprende las siguiente secuencia: CTCGTCAGAAT*T*AATTGGACCCAC (SEQ ID NO:20), en donde, T*, es 5-(4-hidroxi-but-1-inil)-1H-pirimidin-2,4-diona (SUPER T®, Elitech Group – [Grupo Elitech] -). En formas adicionales de presentación, en concordancia con la presente invención, el cebador de *mecA_{LGA251}*, comprende la siguiente secuencia: GCCGTGTTATCCATTGAACGAAGCA (SEQ ID NO:21).

En otras formas de presentación, en concordancia con la presente invención, la amplificación del gen *mecA*_{LGA251}, se lleva a cabo mediante pares de cebadores, los cuales comprenden las secuencias

GGATATGGCCAAGGCGAGATAC TAGTAAACC (SEQ ID NO:23) y

GAGGATTTTGTATATTTCCGTTATTTTCTAAAGCACTG (SEQ ID NO:24);

5 AATAAATCATAAGGGTTGAACCTGGTGTAGTG (SEQ ID NO:25) y

AATAAATCATAACAATAAAAAAGAGCCT*T*T*GCTCAAC (SEQ ID NO:26). En otro procedimiento, en concordancia con la presente invención, los pares de cebadores, comprenden cualesquiera de las 10 bases de nucleótidos de la SEQ ID NO:23 a 26.

10 En una forma preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, la sonda de generación de frecuencia para el gen *mecA*_{LGA251}, comprende la siguiente secuencia:

5' -Ra- G*TAAAAGGTGTA*CTGTTGC-Rb-3' (SEQ ID NO:27)

15 en donde, Ra, se selecciona, de una forma independiente, de entre (M)_a-F1 y (M)_a-Q, Rb se selecciona, de una forma independiente, de entre (M)_a-F1 y (M)_a-Q, G* es 6-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (SUPER T®, Elitech Group – [Grupo Elitech] -) y M es un ligando de surco menor, a es 0 ó 1, F1 es un fluoróforo con una longitud de onda de emisión, correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre los 400 nm y los 900 nm, G* es SUPER G®, (Elitech Group – [Grupo Elitech] -), y Q es un extintor no fluorescente, con la
20 condición de que, la sustitución de Ra y de Rb, permita la extinción de la fluorescencia, cuando la sonda, se encuentra en estado no hibridado.

En otra forma preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, la sonda para el *mecA*_{LGA251}, comprende las siguientes secuencias:

25 5' -Ra-G*ATAAAAT*T*T*GTA*TA*GG-Rb-3' (SEQ ID NO:28) y
5' -Ra-FAM-AAAT*T*T*CAAATCACTAC-Rb-3' (SEQ ID NO:29)

30 en donde, Ra, se selecciona, de una forma independiente, de entre (M)_a-F1 y (M)_a-Q, Rb se selecciona, de una forma independiente, de entre (M)_a-F1 y (M)_a-Q, y M es un ligando de surco menor, a es 0 ó 1, F1 es un fluoróforo con una longitud de onda de emisión, correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre los 400 nm y los 900 nm, G* es 6-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (SUPER G®, (Elitech Group – [Grupo Elitech] -), T* es Super T, A* es 4-(4,6-diamino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-in-1-ol (SUPER A®, (Elitech Group – [Grupo Elitech] -), y Q es un extintor no fluorescente, con la condición de que, la sustitución de Ra y de Rb,
35 permita la extinción de la fluorescencia, cuando la sonda, se encuentra en estado no hibridado. En otro procedimiento, en concordancia con la presente invención, los pares de cebadores, comprenden cualesquiera de las 10 bases de nucleótidos de la SEQ ID NO:27 a 29.

40 IV. CEBADORES Y SONDAS

En un aspecto, se proporcionan cebadores oligonucleótidos (“cebadores de proyección”, “cebadores de aleta”, o “cebadores adaptadores), los cuales de la forma más general, se anotan como cebadores 5'-X-Y-3' ó 5'-(X)_nY'-3'. En esta anotación, X, representa la porción de la secuencia del cebador, la cual no es complementaria al ácido nucleico del *ldh1* ó del *mecA*, e Y, ó Y', representa una porción de la secuencia del cebador, la cual es
45 complementaria al ácido nucleico del *ldh1* ó del *mecA*, respectivamente.

De una forma correspondientemente en concordancia, en un grupo de las formas de presentación, en concordancia con la presente invención, el cebador, tiene la fórmula:

50
$$5'-(X)_nY-3' \text{ (I), ó}$$

$$5'-(X)_nY'-3' \text{ (II),}$$

en donde, X, representa la secuencia 5' del cebador, la cual no es complementaria al ácido nucleico del *ldh1* ó del *mecA*, Y, representa la secuencia 3' complementaria del cebador, al *mecA*, y 5'-X-Y-3' ó 5'-(X)_nY'-3', representan el
55 ácido nucleico del cebador oligómero. En determinadas formas de presentación, en concordancia con la presente invención, X es [AB]_m, e Y es [A-B]_p, en donde, A, representa una cadena de fosfato de azúcar, una cadena de fosfato de azúcar, modificada, una cadena de fosfato de azúcar, bloqueada, una quimera, o una variante de éstas, utilizadas en la preparación de los ácidos nucleicos; B, presenta una base de ácido nucleico, o una base modificada de una base; y el subscrito m, es un número entero, el cual puede tomar un valor situado entre aprox. 3 – 18, de una
60 forma usual, situado entre aprox. 8 – 15, entre aprox. 10 – 14, ó situado entre aprox. 11 – 13, siendo éste, de una forma más usual, de aprox. 12. El subscrito p, es un número entero, el cual puede tomar un valor situado entre aprox. 4 – 50, siendo éste, de una forma usual, de un valor situado entre aprox. 3 – 20, entre aprox. 10 – 18, ó entre aprox. 12 - 16. En ciertas formas de presentación, en concordancia con la presente invención, los valores de los subscritos m y n, son iguales, y así, por ejemplo, ambos subscritos, m y p, pueden ser, de una forma simultánea, un
65 número entero, el cual puede tomar un valor situado entre aprox. 8 – 15, un valor situado entre aprox. 10 – 14, ó un valor situado entre aprox. 11 – 13, y siendo éste, de la forma más usual, de aprox. 12.

Los cebadores y las sondas, en concordancia con la presente invención, se preparan, de una forma general, mediante la utilización de procedimientos en fase sólida, los cuales son conocidos por parte de aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica. De una forma general, los materiales de partida, se encuentran comercialmente disponibles en el mercado, o bien, éstos pueden prepararse de una forma fácil y directa, a partir de materiales de partidas comercialmente disponibles en el mercado, mediante la utilización de apropiadas manipulaciones de grupos funcionales apropiados, de la forma la cual se describe, por ejemplo, por parte de March et al., en *ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY - Reactions, Mechanisms and Structures*, 4th ed., - QUÍMICA ORGÁNICA AVANZADA – Reacciones, mecanismos y estructuras, 4º Edición -, John Wiley & Sons, New York, NY (1992).

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, los cebadores y las sondas, pueden comprender cualesquiera nucleótidos de origen natural, cualesquiera nucleótidos de origen no natural, o cualesquiera nucleótidos modificados los cuales sean conocidos en el arte de la técnica especializada (véase, a dicho efecto, la publicación de patente estadounidense U S nº 2005 0 118 623; y la patente estadounidense U S nº 6. 949. 367).

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, los cebadores y las sondas, pueden comprender bases universales o promiscuas.

Las bases modificadas, en concordancia con la presente invención, se consideran como siendo aquéllas las cuales difieren de las bases de origen natural, mediante la adición o mediante la eliminación de uno o de más grupos funcionales, diferencias en la estructura del anillo heterocíclico (a saber, la sustitución del carbono, por un heteroátomo, o viceversa), y / o la unión de una o de más estructuras de brazos de engarce, a la base. Los nucleótidos modificados los cuales se prefieren, son aquéllos los cuales están basados en una estructura de pirimidina o en una estructura de purina, siendo éstos últimos, de una forma mayormente preferible, las 7-desazapurinas y sus derivados y las pirazolopirimidinas (las cuales se encuentran descritas en las referencias de las cual son co-propietarios lo solicitantes, consistentes en la RE 38. 416; la publicación de patente estadounidense U S nº 2005 0 118 623, y la patente estadounidense U S nº 6. 127. 121). Se incluyen, en las bases modificadas, aquéllas las cuales difieren de las bases de origen natural, en donde, la estructura de la cadena del azúcar, se encuentra modificadas (véase, a dicho efecto, la patente europea EP nº 1 314 734), las bases universales (véase, a dicho efecto, el documento de prioridad de patente PCT de la publicación de patente internacional nº WO 02 / 062 816), y las bases promiscuas (véase, a dicho efecto, la patente estadounidense U S nº 7. 348. 146).

Las bases modificadas ejemplares, incluyen, aunque no de una forma limitativa en cuanto a éstas, al análogo de guanina consistente en la 6-amino-1*H*-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5*H*)-ona (ppG ó PPG, al cual se le hace también referencia como SUPER G®) y al análogo de adenina consistente en la 4-amino-1*H*-pirazolo[3,4-d]pirimidina (ppA ó PPA). Puede también utilizarse, así mismo, el análogo de santeño consistente en la 1*H*-pirazolo[5,4-d]pirimidin-4(5*H*)-6(7*H*)-diona (ppX). Éstos análogos de bases, cuando se encuentran presentes en un oligonucleótido, consolidan o afianzan la hibridación, y mejoran la discriminación de los malapareamientos o divergencias. Todas las formas de las bases de origen natural, de las bases modificadas, y de los análogos de las bases, pueden encontrarse incluidas en los conjugados de oligonucleótidos. Otras bases modificadas, las cuales son de utilidad en los presentes procedimientos, en concordancia con la invención, incluyen a las consistentes en la 6-amino-3-prop-1-inil-5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidina-4-ona (PPPG); la 6-amino-3-(3-hidroxi-prop-1-inil)-5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidina-4-ona (HOPPPG); la 6-amino-3-(3-aminoprop-1-inil)-5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidina-4-ona (NH₂PPPG); la 4-amino-3-(prop-1-inil)pirazolo[3,4-d]pirimidina (PPA); la 4-amino-3-(3-hidroxi-prop-1-inil)pirazolo[3,4-d]pirimidina (HOPPPA); la 4-amino-3-(3-aminoprop-1-inil)pirazolo[3,4-d]pirimidina (NH₂PPPA); la 3-prop-1-inilpirazolo[3,4-d]pirimidina-4,6-diamino ((NH₂)₂PPPA); la 2-(4,6-diaminopirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)etin-1-ol ((NH₂)₂PPPAOH); la 3-(2-aminoetil)pirazolo[3,4-d]pirimidina-4,6-diamina ((NH₂)₂PPPAH₂); la 5-prop-1-inil-3-dihidropirimidina-2,4-diona (PU); la 5-(3-hidroxi-prop-1-inil)-1,3-dihidropirimidina-2,4-diona (HOPU); la 6-amino-5-prop-1-inil-3-dihidropirimidina-2-ona (PC); la 6-amino-5-(3-hidroxi-prop-1-inil)-1,3-dihidropirimidina-2-ona (HOPC); la 6-amino-5-(3-aminoprop-1-inil)-1,3-dihidropirimidina-2-ona (NH₂PC); la 5-[4-amino-3-(3-metoxiprop-1-inil)pirazolo[3,4-d]pirimidinil]-2-(hidroximetil)oxolan-3-ol (CH₃OPPPA); la 6-amino-1-[4-hidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]-3-(3-metoxiprop-1-inil)-5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona (CH₃O PPPG); la 4,(4,6-Diamino-1*H*-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-but-3-in-1-ol (SUPER A®); la 6-amino-3-(4-hidroxi-but-1-inil)-1,5-dihidro-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona; la 5-(4-hidroxi-but-1-inil)-1*H*-pirimidina-2,4-diona (SUPER T®); la 3-yodo-1*H*-pirazolo[3,4-d]pirimidina-4,6-diamina ((NH₂)₂PPAI); la 3-bromo-1*H*-pirazolo[3,4-d]pirimidina-4,6-diamina ((NH₂)₂PPABr); la 3-cloro-1*H*-pirazolo[3,4-d]pirimidina-4,6-diamina ((NH₂)₂PPACl); la 3-yodo-1*H*-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina (PPAI); la 3-Bromo-1*H*-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina (PPABr); y la 3-cloro-1*H*-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina (PPACl).

De una forma adicional a las bases modificadas, las cuales se han listado anteriormente, arriba, los oligonucleótidos, pueden tener una estructura de la cadena de azúcar o de porciones glicosídicas, consistiendo éstas, de una forma preferible, en los 2-desoxirribofuranósidos, en donde, los engarces o ligandos internucleótidos, son los engarces de fosfodiéster, de origen natural. Si embargo, no obstante, en formas alternativas de presentación, en concordancia con la presente invención, los grupos de 2-desoxi-β-D-ribofuranosa, se encuentran reemplazados por otros azúcares, tales como, por ejemplo, la β-D-ribofuranosa. De una forma adicional, puede encontrarse presente la β-D-

ribofuranosa, en donde, el grupo 2-OH de la porción de ribosa, se encuentra alquilado con un grupo alquilo C₁₋₆, (2-(O-alquilo C₁₋₆)ribosa), con un grupo alqueno C₂₋₆ (2-(O-alqueno C₂₋₆)ribosa), o bien, éste se encuentra reemplazado con un grupo fluoro (2-fluororribosa). Los azúcares relacionados de utilidad, consistentes en azúcares que forman oligómeros, son aquéllos los cuales se encuentran "bloqueados", es decir, los cuales contienen un puente de metileno entre C-4' y el átomo de oxígeno, en C-2'. Puede también procederse a utilizar otras porciones de azúcar, la cuales sean compatibles con la hibridación, y éstas se conocen bien, por parte de aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica, incluyendo, aunque no de una forma limitativa en cuanto a éstas, a los α -D-arabinofuranósidos, a los α -2'-desoxirribofuranósidos, y a los 2'-3'-didesoxi-3'-aminorribofuranósidos. Los oligonucleótidos los cuales contienen α -D-arabinofuranósidos, pueden prepararse de la forma la cual se encuentra descrita en la patente estadounidense U S n° 5. 177. 196. Los oligonucleótidos los cuales contienen 2',3'-didesoxi-3'-aminorribofuranósidos, se encuentran descritos por parte de Chen et al., en *Nucleic Acids Res.*, 23: 2661 - 2668 (1995). Se han descrito así mismo, también, procedimientos sintéticos para los ácidos nucleicos bloqueados (véase, a dicho efecto, el trabajo publicado por parte de Singh et al., en *Chem. Comm.*, 455 - 456 (1998); y el trabajo publicado por parte de Wengel, en *Acc. Chem. Res.*, 32: 301 - 310 (1998)) y para los oligonucleótidos los cuales contienen 2'-halogeno-2'-desoxirribofuranósidos (véase, a dicho efecto, el trabajo publicado por Palissa et al., en *Z. Chem.*, 27: 216 (1987)). La estructura de la cadena del fosfato de los oligonucleótidos modificados, la cual se describe aquí, en este documento, puede también modificarse, de tal forma que, los oligonucleótidos, contengan engarces o ligandos de fosforotioato, y / o metilfosfonato y / o fosforoamidatos (véase, a dicho efecto, el trabajo publicado por parte de Chen et al., en *Nucl. Acids Res.*, 23: 2662 - 2668 (1995)). Las combinaciones de los engarces de oligonucleótidos, se pertenecen así mismo, también, al ámbito de la presente revelación por parte de aquéllas personas expertas en el arte de la técnica especializada, se conocen así mismo, también, otras modificaciones de la estructura de la cadena.

La capacidad para diseñar sondas y cebadores, de una forma previsible, mediante la utilización de un algoritmo, el cual puede dirigir el uso o la incorporación de bases modificadas, de ligandos de surco menor, de fluoróforos y / o de extintores, basados en sus propiedades termodinámicas, se encuentra descrita en el arte especializado de la técnica, tal como, por ejemplo, en la patente estadounidense U S n° 6. 683. 173. De una forma correspondientemente en concordancia, se contempla, en la presente revelación, en concordancia con la invención, el uso de cualquier combinación de bases normales, de bases insustituídas de pirazolo[3,4-d]pirimidina (tales como, por ejemplo, las consistentes en las PPG y PPA), las pirazolo[3,4-d]pirimidinas 3-sustituídas, las purinas modificadas, las pirimidinas modificadas, las pirimidinas 5-sustituídas, las bases universales, la modificaciones de azúcares, las modificaciones de la estructura de la cadena, y / o los lindantes de surco menor, con objeto de equilibrar la T_m (tal como por ejemplo, la correspondiente a una temperatura correspondiente a un valor de aprox. 4 - 8 °C) de un producto hibridado, con un ácido nucleico modificado.

Puesto que las sondas de FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) de los presentes procedimientos, en concordancia con la invención, no se encuentran segmentadas, como contraste a los ensayos a base de 5'-nucleasa, los cuales están basados en análisis de curvas de fusión, éstas pueden utilizarse para analizar mutaciones, las cuales puedan acontecer en la región de la sonda. Los análisis de la mutaciones, bajo la sonda, han sido reportados en el arte de la técnica especializada (véase, a dicho efecto, el trabajo publicado por parte de Stevenson J et al., en *J Clin Microbiol.*, 43: 2391 - 8 (2005)).

Se suministran así mismo, también, microseries de oligómeros, en donde, por lo menos uno de los oligómeros, los cuales se encuentran descritos aquí, en este documento de solicitud de patente, se encuentra presente en la serie. Los oligómeros los cuales se encuentra descritos aquí, en este documento de solicitud de patente, pueden utilizarse como oligómeros inmovilizados, tales como aquéllos los cuales se encuentran descritos, por ejemplo, en las patentes estadounidenses U S n° 5. 492. 806; 5. 525. 464; U S n° 5. 556. 752 y en las publicaciones de los documentos de prioridad PCT, de las patentes internacionales WO 92 / 10 588 y WO 96 / 17 957.

Las descripciones detalladas de la química, las cuales se utilizan para sintetizar oligonucleótidos, mediante el procedimiento de la fosforamídita, se proporcionan en los documentos de patente estadounidenses U S n° 4. 458. 066 y US n° 4. 415. 732; en la publicación de Caruthers et al., en *Genetic Engineering*, 4: 1 - 17 (1982); y en *Users Manual Model 392 and 394 Polynucleotide Synthesizers*, - Manual del usuario de los Sintetizadores de Polinucleótidos de los modelos 392 y 394 -, páginas 6 - 1 a 6 - 22, Applied Biosystems, Part No. 901237 (1991). Los oligonucleótidos marcados, pueden sintetizarse de una forma enzimática, tal como, por ejemplo, mediante la utilización de la DNA polimerasa o de la DNA ligasa (véase, a dicho efecto, por ejemplo, Stryer, *Biochemistry*, Chapter 24, W. H. Freeman and Company (1981)), o mediante síntesis química, tal como, por ejemplo, mediante un procedimiento de fosforamídita, mediante un procedimiento de fosfito - triéster, y por el estilo (véase, a dicho efecto, por ejemplo, Gait, *OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS*, - Síntesis de oligonucleótidos -, IRL Press (1990)). Los marcadores, pueden introducirse durante la síntesis enzimática, mediante la utilización de monómeros de nucleósidos trifosfato, marcados, o éstos pueden introducirse durante la síntesis química, mediante la utilización de fosforamíditas no nucleotídicas o nucleotídicas, marcadas, o bien, éstos pueden introducirse subsiguientemente a la síntesis.

V. COMPONENTES DE REACCIONES DE AMPLIFICACIÓN ADICIONALES

Tampones

5 Los tampones los cuales pueden emplearse, en concordancia con la presente invención, son los tampones a base de borato, a base de fosfato, a base de carbonato, a base de barbital, etc. (véase, a dicho efecto, la patente estadounidense U S n° 5. 508. 178). El valor pH de la reacción, debería mantenerse en un rango comprendido dentro de unos márgenes que van desde un pH de aprox. 4,5 hasta un pH de aprox. 9,5 (véase, a dicho efecto, la patente estadounidense U S n° 5. 508. 178). El tampón estándar, el cual se utiliza en las reacciones de
10 amplificación, en concordancia con la presente invención, es un tampón a base de Tris, con una tasa de concentración comprendida dentro de unos márgenes situados entre los 10 mM y 50 mM, y con un valor pH correspondiente a un rango comprendido dentro unos márgenes que van desde un valor de aprox. 8,3 hasta un valor de aprox. 8,8 (véase, a dicho efecto, por ejemplo, el trabajo publicado por parte de Innis *et al.*, citado anteriormente, arriba).

15 Las personas expertas en el arte especializado de la técnica, reconocerán el hecho de que, las condiciones de los tampones, deberían establecerse de tal forma que, éstas, permitan la realización de la totalidad de las reacciones las cuales sean de interés. Así, de este modo, las condiciones de los tampones, pueden concebirse de tal forma que éstas proporcionen un soporte a la reacción de amplificación, así como a cualesquiera subsiguientes reacciones
20 enzimáticas de restricción. Puede procederse a someter a test de ensayo, cualquier tampón de reacción particular, en cuanto a lo referente a su capacidad para dar soporte a varias reacciones, procediendo a someter a test de ensayo, de ambas formas, individualmente, y en combinación.

Concentración de las sales

25 La concentración de la sal, la cual se encuentre presente en la reacción, puede afectar a la capacidad de los cebadores, para reasociarse al ácido nucleico objetivado como diana (véase, a dicho efecto, por ejemplo, la publicación de Innis *et al.*, mencionada anteriormente, arriba). Puede procederse a añadir cloruro potásico, a la mezcla de reacción, hasta un valor de concentración correspondiente a aprox. 50 mM, con objeto de fomentar la reasociación de los cebadores. Puede también procederse a añadir, así mismo, cloruro sódico, con objeto de
30 fomentar la reasociación de los cebadores (véase, a dicho efecto, por ejemplo, la publicación de Innis *et al.*, mencionada anteriormente, arriba).

Concentración de los iones de magnesio

35 La concentración de los iones de magnesio, en la reacción, puede afectar a la amplificación de la secuencia de los ácidos nucleicos de los SA y MRSA (véase, a dicho efecto, por ejemplo, el trabajo publicado por parte de Innis *et al.*, mencionado anteriormente, arriba). La reasociación de los cebadores, la desnaturalización de las hebras, la especificidad de la amplificación, la formación de los dímeros de cebadores, y la actividad enzimática, son todos ellos ejemplos de parámetros los cuales resultan afectado por la concentración de magnesio (véase, a dicho efecto,
40 por ejemplo, el trabajo publicado por parte de Innis *et al.*, mencionado anteriormente, arriba). Las reacciones de amplificación, deberían contener una concentración de magnesio correspondiente a un valor en exceso, comprendido dentro de unos márgenes que van desde los aprox. 0,5 mM hasta los 6,0 mM, con respecto a la concentración de los dNTPs (desoxinucleótidos trifosfatos –[de sus siglas en inglés correspondientes a deoxynucleotide triphosphates] -). La presencia de agentes quelantes de magnesio, en la reacción, puede afectar a la
45 contracción óptima de magnesio. Puede llevarse a cabo una serie de reacciones de amplificación, dentro de unos amplios márgenes de concentraciones de magnesio, para determinar la concentración óptima del magnesio. La concentración óptima del magnesio, puede variar, en dependencia de la naturaleza del ácido nucleico de los SA ó MRSA objetivado como diana, y de los cebadores los cuales se estén utilizando, entre otros parámetros.

Concentración de los desoxinucleótidos trifosfatos

50 Los desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), se añaden, a la reacción, hasta obtener una concentración final correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde los aprox. 20 µM hasta los aprox.
55 300 µM. De una forma típica, cada uno de los cuatro dNTPs (G, A, C, T), se encuentran presentes, en concentraciones equivalentes (véase, a dicho efecto, por ejemplo, el trabajo publicado por parte de Innis *et al.*, mencionado anteriormente, arriba). En algunas formas de presentación, en concordancia con la presente invención, se utiliza la N-glicosilasa, con dUTP (2'-desoxiuridina 5'-trifosfato [de sus siglas en inglés correspondientes a 2'-deoxyuridine 5'-triphosphate] -) (en lugar de TTP – desoxitimidina trifosfato – [de sus siglas en inglés correspondientes a Deoxythymidine triphosphate] -), en las reacciones de PCR.

Polimerasas de ácidos nucleicos

65 Se encuentran comercialmente disponibles, en el mercado, una gran variedad de polimerasas DNA-dependientes, la cuales funcionarán mediante la utilización de los presentes procedimientos y composiciones. Así, por ejemplo, la DNA polimerasa taq, puede utilizarse mediante la utilización de un componente enzimático, un fuente de DNA

polimerasa termoestable, apropiada, la cual comprenda DNA polimerasas taq, la cual puede ser la enzima nativa, purificada, a partir de la bacteria termófila consistente en la *Thermus aquaticus* y / o a partir de una forma concebida por ingeniería genética, a partir de la enzima. Otras enzimas polimerasas las cuales se encuentran comercialmente disponibles en el mercado, incluyen, por ejemplo, a las polimerasas Taq y la Tfi DNA polimerasa, la cual se encuentra comercialmente disponible en el mercado, siendo ésta comercializada por parte de la firma Life Technologies, por parte de la firma Promega o por parte de la firma Pharmacia. Otros ejemplos de DNA polimerasas termoestables, las cuales podrían utilizarse, incluyen a las DNA polimerasas obtenidas, por ejemplo, de las especies *Thermus* y *Pyrococcus*. Los rangos de las concentraciones de la polimerasa, pueden ser los correspondientes a unos valores de 1 – 5 unidades por mezcla de reacción. La mezcla de reacción es, de una forma típica, la correspondiente a valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde los aprox. 5 µl hasta los aprox. 100 µl.

VI. Otros reactivos

Algunas veces, se procede a añadir agentes adicionales, a la reacción, con objeto de lograr los resultados que se desean. Así, por ejemplo, puede procederse a añadir DMSO (dimetilsulfóxido) a la reacción, pero, según se reporta, éste inhibe la actividad de la DNA polimerasas taq. Sin embargo, no obstante, se ha venido recomendando la utilización del DMSO, para la amplificación de múltiples secuencias objetivadas como diana, en algunas reacciones (véase, a dicho efecto, por ejemplo, el trabajo publicado por parte de Innis *et al.*, citado anteriormente, arriba). A las reacciones de amplificación se le añaden, de una forma usual, agentes de estabilización tales como los consistentes en el glicerol (glicerina), la gelatina, la albúmina de suero bovino., y detergentes no iónicos (tales como, por ejemplo, el consistente en el Tween 20) (véase, a dicho efecto, por ejemplo, el trabajo publicado por parte de Innis *et al.*, citado anteriormente, arriba). Pude también procederse a añadir un inhibidor de RNasa (Ambion; Austin, TX), con objeto de limitar la degradación del RNA. De una forma adicional, puede también añadirse, así mismo, betaine (betaina) (de la firma Sigma-Aldrich; St. Louis, MO), el cual se trata de un agente isosestabilizante, el cual se utiliza con objeto de igualar la contribución del apareamiento de bases GC y AT, para estabilizar los dúplex de ácidos nucleicos.

VII. LIGANDOS DE SURCO MENOR

Los conjugados (o sondas) de oligonucleótidos de ligandos de surco menor, se encuentran descritos en las patentes estadounidenses U S nº 5. 801. 155 y U S nº 6. 312. 894. Estos conjugados, forman dúplex hiperestabilizados con DNA complementario. De una forma particular, la especificidad de la secuencia de las sondas de ligandos de surco menor, es excelente, para las aplicaciones a altas temperaturas, tales como las consistentes en la PCR. Las sondas / conjugados, tendrán así mismo, también, de una forma opcional, un ligando de surco menor unido de una forma covalente. En la literatura correspondiente al arte especializado de la técnica, se ha descrito una gran variedad de ligandos de surco menor (véase, a dicho efecto, por ejemplo, la patente estadounidense US nº 5. 801. 155; el trabajo de Wemmer *et al.*, publicado en *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 7: 355 - 361 (1997); el trabajo de Walker *et al.*, publicado en *Biopolymers,- Biopolímeros* -, 44: 323 - 334 (1997); el trabajo de Zimmer *et al.*, publicado en *U. Prog. Biophys. Molec. Bio.*, 47: 31 - 112 (1986); y el trabajo de Reddy *et al.*, publicado en *J. W., Pharmacol. Therap.*, 84: 1 - 111 (1999)).

Los conjugados de fluoróforos - oligonucleótidos - extintores - ligandos de surco menor, pueden encontrarse en un orden de disposición lineal (tal y como se sugiere mediante la fórmula 5'-M-Q-ODN-FI-3' ó 5'-M-FI-ODN-Q-3') ó en un orden disposición ramificado, en donde, el extintor (Q) y el ligando de surco menor (M), se encuentran unidos al grupo de unión, el cual sirve para unir ODN, Q y M. De una forma adicional, el extintor, puede encontrarse unido al término distal (relativo a la unión al ODN), del ligando de surco menor, (tal como, por ejemplo, 5'-QM-ODN-FI-3'). Cada uno de los órdenes de disposición, se considera como encontrándose incluidos, cuando se procede a utilizar la abreviación lineal (M-Q-ODN-FI). De una forma adicional, las porciones del ligando de surco menor y del extintor, pueden encontrarse unidas, cada una de ellas, a bien ya sea el extremo 3' ó bien ya sea el extremo 5' del oligonucleótido, o bien ya sea en una posición interna del oligonucleótido, siempre y cuando, la citada unión, no interfiera con los mecanismos de extinción del conjugado. De una forma general, esto puede conseguirse mediante la utilización de un grupo de unión apropiado (véase, a dicho efecto, por ejemplo, la patente estadounidense U S nº 7. 381. 818).

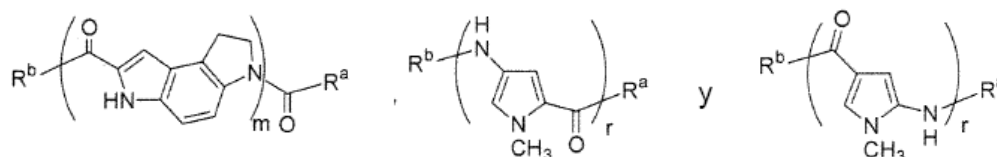
Los procedimientos apropiados para unir ligandos de surco menor (así como los grupos reportantes, tales como los fluoróforos y los extintores, los cuales se describen posteriormente, más abajo, a continuación) mediante engarces, a los oligonucleótidos, se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses U S nº 5. 512. 677; U S nº 5. 419. 966; U S nº 5. 696. 251; U S nº 5. 585. 481; U S nº 5. 942. 610; y U S nº 5. 736. 626.

El ligando de surco menor, se encuentra unido, de una forma general a la posición 3' ó 5' de la porción de oligonucleótido, vía un grupo de unión apropiado. La unión al extremo 5', proporciona ambos, un beneficio de la estabilidad híbrida, puesto que, la fusión de un dúplex de oligonucleótido, empieza en los términos, pero reduce y / o evita, así mismo, también, la digestión de la nucleasa de la sonda, durante las reacciones de amplificación.

La localización del ligando de sonda menor, dentro del conjugado ligando de surco menor – oligonucleótido, puede también afectar, así mismo, a las propiedades discriminatorias de tales tipos de conjugados. Una región no apareada, dentro de un dúplex, tendrá como resultado cambios en la forma del surco menor, en la vecindad de la base o de las bases de apareamiento fallido. Puesto que, los ligandos del surco menor, se adaptan, de la mejor forma, en el interior del surco menor de un dúplex de DNA apareado de una forma perfecta, los desapareamientos o apareamientos fallidos resultantes en cambios de forma, en el surco menor, reducirían la fuerza de unión de un ligando de surco menor, a una región la cual contiene el desapareamiento o apareamiento fallido. Así, de este modo, la capacidad de un ligando de surco menor, para estabilizar al tipo de híbrido, disminuiría, incrementando con ello la capacidad del conjugado de oligonucleótido ligando de surco menor, para discriminar un desapareamiento o apareamiento fallido, de un dúplex perfectamente apareado. Por otro lado, si un apareamiento fallido cae fuera de la región complementaria a un conjugado oligonucleótido ligando de surco menor, se espera entonces el hecho de que, la capacidad discriminatoria para oligonucleótidos no conjugados y conjugados a ligandos de surco menor, de igual longitud, sea aproximadamente la misma. Puesto que, la capacidad de una sonda de oligonucleótidos para discriminar desapareamientos o apareamientos fallidos de pares de bases individuales, depende de su longitud, los oligonucleótidos más cortos, son más efectivos en la discriminación de desapareamientos o apareamientos fallidos. La principal ventaja del uso conjugados oligonucleótidos ligandos de surco menor, en este contexto, reside en el hecho consistente en que pueden utilizarse oligonucleótidos mucho más cortos, si éstos se comparan con aquéllos utilizados en el arte especializado anterior de la técnica (a saber, de 20 meros ó más cortos), los cuales tienen una potencia discriminatoria mayor, debido al pronunciado efecto de estabilización de la conjugación del ligando de surco menor.

En un grupo de formas de presentación, en concordancia con la presente invención, el ligando de sonda menor, se selecciona de entre el grupo consistente en los análogos de CC1065, las lexitropsinas, la distamicina, la netropsina, el berenil, la duocarmicina, la pentamidina, y el 4,6-diamino-2-fenilindol, y las pirrolo[2,1c][1,4]benzodiazepinas.

Los ligandos de surco menor, adicionalmente preferidos, son aquéllos los cuales se seleccionan de entre las fórmulas:



en donde, el subscrito m , es un número entero, el cual puede tomar un valor que va de 2 a 5; el subscrito r , es un número entero, el cual puede tomar un valor que va de 2 a 10; y cada una de las R^a y R^b es, de una forma independiente, un grupo de unión al oligonucleótido (bien ya sea de una forma directa, o bien ya sea de una forma indirecta, mediante un extintor, H, $-OR^c$, $-NR^d$, $-COOR^c$ ó $-CONR^d$, en donde, cada una de las R^c y R^d , se selecciona de entre H, heteroalquilo (C_2-C_{12}) heteroalqueniilo (C_3-C_{12}), heteroalquinilo (C_2-C_{12}) alquilo (C_1-C_{12}), alqueniilo (C_2-C_{12}), alquinilo (C_2-C_{12}), ariloalquilo (C_2-C_{12}) y arilo, con la condición de que, una de las R^a ó R^b , represente un grupo de unión a ODN ó Q. En una forma de presentación adicional, en concordancia con la presente invención, cada uno de los anillos, en cada estructura, puede contener una o más sustituciones adicionales, seleccionados de entre H, halógeno, alquilo (C_1-C_6), OR_g , $N(R_g)_2$, $N^+(R_g)_3$, SR_g , COR_g , CO_2R_g , $CON(R_g)_2$, PO_3^- , $(CH_2)_mSO_3^-$, $(CH_2)_mCO_2^-$, $(CH_2)_mOPO_3^{2-}$, y $NHC(O)(CH_2)_mCO_2^-$, y ésteres y sales de éstos, en donde, cada R_g es, de una forma independiente, H ó alquilo (C_1-C_6), y el subscrito m , es un número entero, el cual puede tomar un valor de 0 a 6. El símbolo R_n , representa H ó un grupo (de una forma típica, el vestigio o resto de un grupo de unión, utilizado en la síntesis de fase sólida), el cual tiene 1 – 30 átomos, seleccionado de entre C, N, O, P, y S, el cual es, bien ya sea cíclico, bien ya sea cíclico, o bien ya sea una combinación de entre éstos, y que tiene átomos de hidrógeno adicionales, para satisfacer y cubrir las valencias disponibles.

Los ligandos de surco menor los cuales se prefieren de una forma particular, incluyen al trímero de 3-carbamoil-1,2-dihidro-(3H)-pirrolo[3,2-e]indol-7-carboxilato (CDPI₃) a la dihidrociclopirroloindol-triamida sustituida (DPI₃), al pentámero de N-metilpirrolo-4-carbox-2-amida (MPC₅), y a otros ligandos de surco menor, los cuales exhiben una discriminación incrementada de desapareamientos o apareamientos fallidos. Porciones adicionales de ligandos de surco menor, las cuales encontrarán un uso, en concordancia con la presente invención, son las que se dan a conocer en la patente estadounidense US n° 5. 801. 155. En ciertas formas de presentación, en concordancia con la presente invención, los ligandos de surco menor, pueden tener, unidos, grupos que intensifican o mejoran la solubilidad en el agua (tales como, por ejemplo, los azúcares, los aminoácidos, los ácidos carboxílicos ó los sustituyentes del ácido sulfónico, y por el estilo). Véase, a dicho efecto, por ejemplo la RE 38. 416; y la patente estadounidense US n° 7. 582. 739.

Los procedimientos de detección recientemente desarrollados, emplean el procedimiento de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), para la detección de la hibridación de las sondas, en lugar de la detección directa de la intensidad de fluorescencia. En este tipo de ensayo, la FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, acontece entre un fluoróforo donante (reportero), y una molécula aceptora (extintor), cuando el espectro de absorción de la molécula extintora, se solapa con el espectro de emisión del fluoróforo

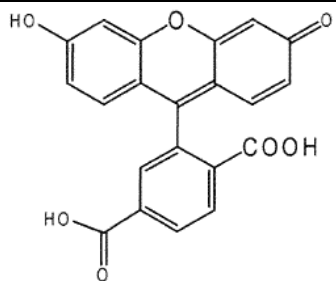
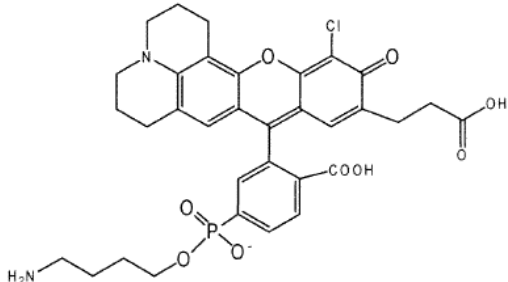
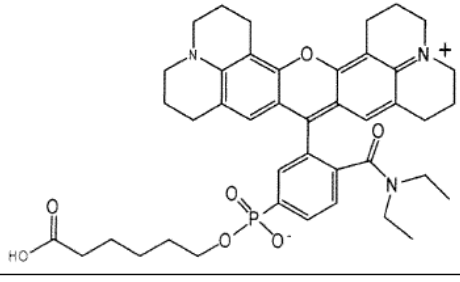
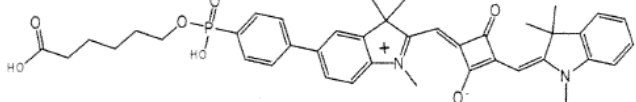
donante y las dos moléculas las cuales se encuentran en una íntima proximidad. La energía, en el estado excitado, del fluoróforo donante, se transfiere al aceptor contiguo, mediante una interacción inducida por dipolos de los dipolos de resonancia, lo cual tiene como resultado la extinción de la fluorescencia del donante. En el caso en el que, la molécula aceptor, sea un fluoróforo, entonces, algunas veces, se incrementará su fluorescencia. La eficacia de la transferencia de energía, entre el donante y las moléculas aceptoras, es altamente dependiente de la distancia entre las moléculas. Las ecuaciones mediante las cuales se describe esta relación, se conocen bien, en el arte especializado de la técnica. La distancia de Forster (Ro), se describe como siendo la distancia existente entre las moléculas donantes y aceptoras, en donde, la transferencia de energía, es de un valor correspondiente a un porcentaje del 50 %. Otros mecanismos de extinción de la fluorescencia, son también conocidos, tales como los consistentes en la colisión y la extinción de la transferencia. Existe un extenso asesoramiento de apoyo, en el arte especializado de la técnica, para la selección de los pares de extintores y fluoróforos, y su unión a los oligonucleótidos (véase, a dicho efecto, por ejemplo, el trabajo de Haugland, HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS, Ninth Edition, - Manual de las sondas fluorescentes y de los agentes químicos de investigación, Novena Edición, Molecular Probes, Eugene, OR (2002) y la Edición de la Web de internet correspondiente a www.probes.com/handbook; y las patentes estadounidenses U S n° 3. 996. 345 y U S n° 4. 351. 760). Los extintores preferidos, son los que se encuentran descritos en las patentes estadounidenses U S n° 6. 727. 356 y U S n° 6. 790. 945; y en las publicaciones de patente estadounidenses U S n° 2003 0 096 254 y U S n° 2002 0 155 484. Tinturas o colorantes bis-azóicos adicionales, son aquéllos los cuales se encuentra comercialmente disponibles en mercado, de procedencia de las firmas Berry and Associates (Dexter, MI) y Glen Research (Sterling, VA).

Los fluoróforos los cuales son de utilidad en los presentes procedimientos, en concordancia con la presente invención son, de una forma general, tinturas o colorantes orgánicos, fluorescentes, los cuales se han derivado de una unión al carbono 3' ó 5' de la sonda oligonucleotídica, de una forma preferible, vía un grupo de unión. Las personas expertas en el arte especializado de la técnica, apreciarán el hecho de que, los fluoróforos apropiados, son aquéllos los cuales se seleccionan en combinación con un extintor, el cual es así, mismo, también, de una forma típica, una tintura o colorante orgánico, el cual puede ser fluorescente, o puede no ser fluorescente.

Existe una gran cantidad de ofertas de asesoramiento de apoyo, en la literatura especializada, la cual se encuentra comercialmente disponible en el mercado, para la selección de pares de fluoróforos – extintores, los cuales sean apropiados, para sondas particulares. Véase, a dicho efecto, por ejemplo, el trabajo de Pesce et al. (eds.), FLUORESCENCE SPECTROSCOPY, - Espectroscopia fluorescente -, Marcel Dekker, New York (1971); el trabajo de White et al., FLUORESCENCE ANALYSIS: A PRACTICAL APPROACH, - Análisis fluorescente: un enfoque práctico -, Marcel Dekker, New York (1970); y por el estilo. En literatura especializada, la cual se encuentra comercialmente disponible en el mercado, se incluyen así mismo, también, referencias las cuales proporcionan unas listas exhaustivas de moléculas fluorescentes y cromogénicas (extintoras), y sus propiedades ópticas relevantes, para elegir los pares fluoróforo – extintor. Véase, a dicho efecto, por ejemplo, Berlman, HANDBOOK OF FLUORESCENCE SPECTRA OF AROMATIC MOLECULES, 2ND EDITION, Manual del espectro fluorescente de las moléculas aromáticas, 2ª Edición -, Academia Press, New York (1971); Griffiths, COLOUR AND CONSTITUTION OF ORGANIC MOLECULES, - Color y construcción de las moléculas orgánicas, - Academic Press, New York (1976); Bishop (ed.), INDICATORS, - Indicadores -, Pergamon Press, Oxford (1972); Haugland, HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS, Ninth Edition, - Manual de las sondas fluorescentes y de los productos químicos de investigación, Novena Edición -, Molecular Probes, Eugene, OR (2002), y la edición en versión de Internet correspondiente a la Web www.probes.com/handbook; Pringsheim, FLUORESCENCE AND PHOSPHORESCENCE, - Fluorescencia y fosforescencia -, Interscience Publishers, New York (1949); y por el estilo. De una forma adicional, los procedimientos para derivar fluoróforos y extintores para uniones covalentes, vía grupos reactivos usuales, son bien conocidos en el arte especializado de la técnica. Véase, a dicho efecto, por ejemplo, Haugland, mencionado anteriormente arriba; y las patentes estadounidenses U S n° 3. 996. 345 y U S n° 4. 351. 760.

Los fluoróforos preferidos, son aquéllos los cuales están basados en tinturas o colorantes de santeño, encontrándose comercialmente disponible, en el mercado, una gran variedad de éstos, conjuntamente con sustituyentes los cuales son de utilidad para la unión de, o bien ya se un grupo de unión, o bien ya sea para la unión directa a un oligonucleótido. Otro grupo de compuestos fluorescentes es el grupo consistente en las naftilaminas, las cuales tienen un grupo amino en la posición α ó en la posición β . Entre tales tipos de compuestos metilamino, se encuentran incluidos los compuestos consistentes en el 1-dimetilaminonaftil-5-sulfonato, y 1-anilino-8-naftalen-sulfonato, y el 2-*p*-toluidinil-6-naftalen-sulfonato. Otras tinturas o colorantes, son aquéllos los cuales incluyen a los compuestos consistentes en la 3-fenil-7-isocianatocumarina, la acridinas, tales como la 9-isotiocianatoacridina y el naranja de acridina, la N-(*p*-(2-benzoxazolil)fenil)maleimida, los benzoxadiazoles, los estilbenos, los pirenos, y compuestos por el estilo. Todavía otros fluoróforos los cuales son apropiados, incluyen a las tinturas o colorantes de resorufina, a las tinturas o colorantes de rodamina, a las tinturas o colorantes de rodamina, a las tinturas o colorantes de cianina y a las tinturas o colorantes del tipo BODIPY. Como tinturas o colorantes, se prefieren, de una particular, las tinturas o colorantes fosfonilados, los cuales se encuentran descritos en las patentes estadounidenses U S n° 7. 671. 218 y U S n° 7. 767. 834. Los ejemplos de tinturas o colorantes fosfonilados, se encuentran recopilados en la Tabla 1, la cual se facilita abajo, a continuación.

Tabla 1. Tinturas de Xanteno y Cianina

#	Nombre	Estructura de la tintura
1	FAM	
2	AquaPhlour® 554 (AP 554)	
3	AquaPhlour® 593 (AP 593)	
4	AquaPhlour® 642 (AP 642)	

VIII. GRUPOS DE UNIÓN

Se conoce, por parte de aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica, una gran variedad de grupos de unión, para unir a los fluoróforos, a los extintores, a los ligandos de surco menor, y a los extremos 5' y 3' de los oligonucleótidos. Véase, a dicho efecto, por ejemplo, Eckstein, (ed.), OLIGONUCLEOTIDES y AND ANALOGUES: A PRACTICAL APPROACH, - Oligonucleótidos y análogos: Un enfoque práctico -, IRL Press, Oxford (1991); Zuckerman et al., Nuc. Acids Res., 15: 5305 - 5321 (1987); Sharma et al., Nuc. Acids Res., 19: 3019 (1991); Giusti et al., PCR Methods and Applications, - Procedimientos de PCR y aplicaciones -, 2: 223 - 227 (1993), patentes estadounidenses US nº 4. 757. 141 y U S nº 4. 739. 044; Agrawal et al., Tetrahedron Letters, 31: 1543 - 1546 (1990); Sproat et al., Nuc. Acids Res., 15: 4837 (1987); Nelson et al., Nuc. Acids Res., 17: 7187 - 7194 (1989); y publicaciones por el estilo. Pueden también utilizarse otros grupos de unión, los cuales se encuentran comercialmente disponibles en el mercado, los cuales pueden unirse a un oligonucleótido, durante la síntesis, los cuales pueden obtenerse de procedencia, por ejemplo, de la firma Clontech Laboratories (Palo Alto, CA.). Otras metodologías para unir un fluoróforo a una porción de oligonucleótido, involucran el uso de la química de las fosforamiditas, en la finalización de la síntesis de la fase sólida, por vía de colorantes o tinturas derivatizadas con una porción de fosforamidita. Véase, a dicho efecto, por ejemplo, las patentes estadounidenses U S nº 5. 231. 191; U S nº 4. 997. 928; U S nº 6. 653. 473; U S nº 6. 790. 945; y U S nº 6. 972. 339; y el documento de prioridad PCT de la publicación de patente internacional nº WO 01 / 42 505.

IX. PROCEDIMIENTOS DE USO

Los cebadores y las sondas para detectar ambos, los MRSA y SA, los cuales se basan en una detección combinada de los marcadores de *ldh1* y *mecA*, proporcionan numerosas ventajas, con respecto a los cebadores de ensayo y las

sondas existentes en la actualidad, incluyendo la especificidad. Los cebadores y las sondas, son particularmente de utilidad, cuando éstas se utilizan para detectar un secuencia objetivizada como diana, a tiempo real (o coincidente), con un proceso de amplificación tal como, por ejemplo, un procedimiento de PCR. De una forma adicional, las sondas las cuales se prefieren, no se digieren mediante la actividad 5'-nucleasa. De una forma correspondientemente en concordancia, las reacciones de amplificación, pueden archivarse y reevaluarse, mediante la utilización de un análisis de las curvas de fusión.

Los procedimientos los cuales se discuten aquí, en este documento de solicitud de patente, se practican con ácido desoxirribonucleótido (DNA), como material de partida. Uno de tales tipos de procedimientos de amplificación, es el consistente en la reacción en cadena de la polimerasa (véase, a dicho efecto, por ejemplo, las patentes estadounidenses U S nº 4. 683. 195 y U S nº 4. 965. 188; y Mullis et al., Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 51 Pt 1: 263 - 273 (1986)). En algunos casos, el cDNA transcrito, se amplifica mediante otros procedimientos distintos a la PCR. El uso de uno cualquiera de los cebadores y las sondas, en procedimientos de amplificación, los cuales no sean procedimientos de PCR, se encuentran dentro de ámbito de la presente discusión, en concordancia con la presente invención. De una forma adicional a las reacciones de amplificación las cuales corresponden a las más tradicionales, las cuales se han discutido anteriormente, arriba, los presentes procedimientos, en concordancia con la presente invención son de utilidad en las amplificaciones, las cuales involucran uniones de tres vías (véase, a dicho efecto, por ejemplo, el documento de prioridad PCT correspondiente a la publicación de patente internacional nº WO 99 / 37 085), amplificación de señales (véase, a dicho efecto, por ejemplo, Capaldi et al., Nuc. Acids Res., 28: E21 (2000)), RNase H, Rolling Circles, invasive cleavage of oligonucleotide probes by flap endonucleases, - RNasa H, Círculos ondulados, segmentación de sondas de oligonucleótidos mediante endonucleasas de aleta (véase, a dicho efecto, por ejemplo, Lyamichev et al., Nature Biotechnol., 17: 292-296 (1999)), ensayos del tipo de replicación de secuencias, auto-sostenidas (véase, a dicho efecto, por ejemplo, Mueller et al., Histochem. Cell Biol., 108: 431 - 437 (1997)), y por el estilo.

El DNA o cDNA amplificado, se detecta mediante técnicas convencionales, las cuales incluyen al uso de cebadores y de sondas marcados. Los marcadores detectables apropiados, incluyen a los marcadores fluorescentes, a los marcadores quimioluminiscentes, a los marcadores calorimétricos, a los marcadores químicos, y a los anticuerpos y antígenos, a la biotina, y por el estilo. Los procedimientos apropiados para detectar tales tipos de marcadores, se conocen bien, en el arte especializado de la técnica, y éstos se encuentran comercialmente disponibles en el mercado.

Las sondas preferidas, en concordancia con la presente invención, son las sondas basadas en la hibridación, la cuales contienen un grupo ligando de surco menor, en el extremo 5' de la sonda. El uso de estas sondas de detección, para detectar las dianas amplificadas, se encuentran descritas en la patente estadounidense U S nº 7. 205. 105 y en la patente estadounidense U S nº 7. 381. 818. De una forma alternativa, las sondas las cuales se segmentan mediante la actividad 5'-nucleasa de la polimerasa, se encuentran incluidas en el ámbito de esta discusión, en concordancia con la presente invención (véase, a dicho efecto, por ejemplo, la patente estadounidense U S nº 6. 312. 894; y Livak, Genet Anal., 14: 143 - 149, 1999).

X. EQUIPOS A MODO DE "KIT"

De una forma adicional, se proporcionan equipos, a modo de "kits", para detección de los ácidos nucleicos de los MRSA / SA (tal como, por ejemplo, en una muestra tal como la consistente en una muestra biológica). Los equipos a modo de "kit", comprenden, de una forma típica, dos o más componentes, los cuales son necesarios para la amplificación de los ácidos nucleicos del *ldh1* y del *mecA*. Los componentes, pueden ser compuestos, reactivos, envases o recipientes, y / o equipamiento. Así, por ejemplo, un envase o recipiente, contenido en un equipo a modo de "kit", pueden contener un primer cebador de aleta, y un segundo cebador de aleta, tales como por ejemplo, las SEQ ID NOS: 6 y 7, y otro envase o recipiente, contenido en el equipo a modo de "kit", puede contener un tercer y cuarto cebadores de aleta, tales como, por ejemplo, la SEQ ID NO: 9. De una forma adicional, los equipos a modo de "kit", pueden contener una o más sondas, tal como por ejemplo, las SEQ ID NO: 10 y 11. Los equipos a modo de "kit", pueden también contener una o más secuencias de ácido nucleico de control, tal como, por ejemplo, la SEQ ID NO: 12, y sondas y cebadores, para la amplificación de la secuencia de control, tal como, por ejemplo, las SEQ ID NOS: 13, 14, y 15. En algunas formas de concentración, en concordancia con la presente invención, los equipos a modo de "kit", comprenden instrucciones para su uso, es decir, las instrucciones para la utilización de los cebadores en la amplificación y / o las reacciones de detección, de la forma la cual se describe aquí, en este documento de solicitud de patente, y la comparación.

XI. ANÁLISIS POR COMPUTADORA

En otra forma de presentación, en concordancia con la presente invención, se proporcionan un procedimiento y un sistema, para analizar los resultados de un ensayo en un sujeto, con objeto de determinar el hecho de si, el citado sujeto, es MRSA-positivo. El sistema en cuestión, comprende: medios para el procesado en la computadora, para recibir, procesar y comunicar datos; medios de almacenaje, para almacenar los datos, incluyen una base de datos de referencia, la cual incluye a los umbrales de los ciclos (Cts) del *mecA* y del *ldh1* y de control, correspondientes a sus estatus de detección de detección del MRSA, a saber, los estatus consistentes en MRSA - negativo / SA -

negativo, análisis inválido, MRSA – negativo / SA – positivo y MRSA – negativo / SA - negativo; y un programa computerizado (informático), integrado en el procesador de la computadora u ordenador. Los umbrales de ciclo, se definen como el número de ciclos que se requiere para que la señal fluorescente cruce el umbral, o para que ésta exceda del nivel de fondo. Una vez que se reciben, o se aportan los datos consistentes en los resultados, o bien los datos que incluyan el resultado, en una análisis de la muestra, los cuales incluyen la mediciones de los ciclos del umbral (Cts) del *mecA* y del *ldh1* y del control, para una muestra particular, el programa de la computadora u ordenador, procesa los citados datos, en el contexto de las citada base de datos, para determinar, como un resultado, el estatus del MRSA del sujeto. El resultado, es susceptible de poderse comunicar, una vez que éste se conoce, de una forma preferible, por parte de un usuario, el cual haya introducido los citados datos.

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el resultado, es susceptible de poderse comunicar a un proveedor médico.

En una forma adicional de presentación, en donde, el resultado es "MRSA / SA Positivo", se presume el hecho de que, el resultado en cuestión, es positivo para el MRSA, y que éste comprende la detección de los *mecA* y *ldh1* objetivizados como dianas, en aproximadamente las mismas cantidades. El MRSA positivo, se entiende como incluyendo a todas las cepas de *mecA*, incluyendo, por ejemplo, a la cepa LGA₂₅₁.

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, en donde, el resultado reportado es "MRSA Negativo, SA Positivo", se presume el hecho de que, el resultado en cuestión, es positivo para el SA, y que éste comprende la detección de únicamente del *ldh1* objetivizado como diana, o la detección la los *mecA* y *ldh1*, en diferentes cantidades.

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, en donde, el resultado reportado es "MRSA / SA Negativo, se presume el hecho de que, el resultado en cuestión, es negativo para el SA, y que éste comprende la ausencia de la detección del *ldh1* objetivizado como diana.

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, en donde, el resultado reportado es "MRSA Positivo, se presume el hecho de que, el resultado en cuestión, es positivo para el MRSA, y que éste comprende la detección de la secuencia de unión del *mecA1* objetivizada como diana.

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, en donde, el resultado reportado es "MRSA Negativo, se presume el hecho de que, el resultado en cuestión, es negativo para el MRSA, y que éste comprende la ausencia de la detección de la secuencia de unión del *mecA*, objetivizada como diana.

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, en donde, el resultado reportado es "SA Positivo, se presume el hecho de que, el resultado en cuestión, es positivo para el SA, y que éste comprende la detección de una o de más secuencias específicas del SA, objetivizadas como diana, con la condición de que, se detecte así mismo, también, el *ldh1* objetivizado como diana. Según se ha reportado, las secuencias específicas del *ldh1* objetivizadas como dianas, incluyen a la región "brecha" del gen regulador (véase, a dicho efecto, la patente estadounidense U S n° 6 946 267), así, como los spa, nuc, Sa442, clfA, femA y femB.

En una forma preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, la interpretación del resultado, se lleva a cabo mediante procesado computerizado (es decir, mediante programas informáticos, asistidos por ordenadores. En otra forma preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, el procesado computerizado, mediante ordenador, se lleva a cabo mediante una función del programa informático Excel, del tipo "if". El uso de una interpretación de los resultados, llevado a cabo mediante una función del programa informático Excel, del tipo "if", para ordenador, se demuestra más abajo, a continuación, en el Ejemplo 8.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos, se proporcionan a efectos ilustrativos, pero no limitativos, del tema el cual se describe aquí, en este documento de solicitud de patente.

La PCR, se lleva a cabo mediante la utilización de unas concentraciones finales, de los componentes de ensayo, en el mono-reactivo el cual se muestra en la Tabla 2, la cual se facilita abajo, a continuación. El dT(8)-AP593 es una referencia de control, pasiva. El 2X *Tfi* PCR Master Mix (de la firma Life Science Technologies, Inc.), contiene todos los reactivos necesarios para llevar a cabo la PCR, incluyendo a la uracil-N-glicosilasa (UNG). EL potenciador (de la PCR), es el consistente en 2,65 % glicerol (glicerina) y 0,3 % Triton X-100.

Tabla 2

SEQ ID	Nombre del Componente	Oligo-secuencia	1X final
6	LDH - L12	<u>AATAAATCATAAGGT</u> *GA*ACA*TGGTGAC ACTGAAT	0,500 µM
7	LDH – E4	<u>AATAAATCATAAGCGC</u> TTTGCCCTCAGGA CG	1,260 µM
8	MEC – L4	GTGCGTTAATATTGCCATTATTTTCTAATG CG	0,500 µM
9	MEC – E6	GGTTACGGACAAGGTGAAATAITGATTAAC C	1,260 µM
10	LDH – AP554 – 5	MGB-AP554- G*ACATTACT*T*GA*ACAA*CG-EDQ	0,500 µM
11	MEC – FAM 3	MGB-FAM-G*AAAGGATCTGTACTGG*G- EDQ	0,200 µM
13	E6132 – 642 - 3	MGB-AP642-G*AATG*CGGTACGTGGTCC- EDQ	0,200 µM
14	E6132 - E	CTCATTTTTTCTACCGGAGATCTTGT	0,100 µM
15	E6132-L	CTGCACGGACCAGTTACTTTACG	0,300 µM
16	16 dT ₍₈₎ - AP593 Referencia Pasiva	TTTTTTTT - AP593	0,035 µM
	10 X PCR Mezcla máster	NA	1,00 X
	10 X PCR Potenciador	NA	1,00 X
	Biología molecular, Grado acuoso	NA	NA

5 Se procede a introducir veinte microlitros de mono – reactivo, en una placa de PCR de 96 pozos, con 10 µl del ácido nucleico de muestra. El ácido nucleico de muestra, se obtiene mediante la extracción con un sistema automatizado de extracción múltiples, del tipo easyMAG mediante la utilización de reactivos de extracción del tipo “NucliSENSE easyMAG extraction reagents” y de las instrucciones facilitadas por el fabricante (Biomieurex, l’Etoile, Francia). La placa, se sella, con una película adhesiva del tipo “MicroAmp® Optical Adhesive Film” (de la firma Applied Biosystems, Foster City, CA) y, a continuación, ésta se centrifuga, con objeto de recolectar las solución de ensayo, en el fondo del pozo de la placa. Se procede, a continuación, la llevar a cabo la realización del ensayo, en una máquina de PCR a tiempo real, del tipo “ABI 7500 DX Fast Block Real-time PCR machine” mediante la utilización del protocolo, cuyos datos se encuentran descritos en la Tabla 3, la cual se facilita abajo, a continuación.

Tabla 3 Protocolo de la máquina de PCR a tiempo real, del tipo “ABI 7500 DX Fast Block Real-time PCR machine”

Etapas	Tiempo	Temperatura
UNG	2 minutos	50 °C
Desnaturalización	2 minutos	93 °C
Ciclación de la PCR (45 X)	10 segundos	93 °C
	30 segundos	56 °C
	20 segundos	72 °C
Tiempo real	1 hora y 10 minutos	

EJEMPLO 1

20 En este ejemplo, se establece el criterio para la identificación de los RMSA y SA, mediante la detección de los genes *mecA* y *ldh1*. Puesto que, los *mecA* y *ldh1*, se encuentran presentes como genes de copia individual, en un genoma de MRSA, las cantidades relativas respectivas, deberían ser las correspondientes al mismo valor de relación o

cociente (1 : 1), en el caso de una infección de MRSA individual. En el caso de una infección mixta, consistente en una infección por SA y por estafilococos coagulasa-negativos resistentes a la penicilina, entonces, las cantidades relativas correspondientes de los respectivos marcadores, serán diferentes. El valor de C_q , obtenido mediante la PCR a tiempo real, es indicativo de la calidad relativa de cada marcador. Así, de este modo, mediante la comparación de los valores de C_q , es posible el proceder a comparar las cantidades relativas de los marcadores. La presencia de ambos marcadores, es decir, la presencia de simultánea del marcador del SA y del marcador del *mecA*, en una cantidad en la misma cantidad relativa (a saber, el valor absoluto de $C_{q1} - C_{q2}$, una "diferencia en la C_q cual se le denomina como " ΔC_q inferior a 2"), es indicativa para el MRSA; unas cantidades relativas diferentes (una diferencia en C_q , la cual sea igual o mayor de 2", o la presencia de únicamente un marcador genético específico para únicamente el *Staphylococcus aureus* (estafilococo aureo), es indicativo para el SA. Se asume el hecho consistente en que, la situación, con exactamente la misma cantidad de diferentes bacterias, en una muestra, es insignificamente rara.

Se procedió así, de este modo, a someter a test de ensayo, 3174 muestras clínicas, en un estudio de investigación prospectiva, en tres lugares de emplazamiento. En comparación con el procedimiento de cultivo de referencia (a saber, un test de ensayo aglutinación de látex y disco de cefoxitina, después del enriquecimiento del caldo de cultivo), se identificó una cantidad de muestras correspondiente a un porcentaje del 92 %, las cuales resultaron positivas, en el test de ensayo, para el MRSA, una cantidad de muestras correspondiente a un porcentaje del 96 %, las cuales resultaron positivas, en el test de ensayo, para el SA, y una cantidad de muestras correspondiente a un porcentaje del 95 %, las cuales resultaron ser muestras negativas.

EJEMPLO 2

Este ejemplo, ilustra el análisis de PCR, a tiempo real, de una infección por MRSA, en comparación con las infecciones mixtas por bacterias de MRSA-negativas, *S. aureus* y coagulasa-negativas, *mecA*-positivas (MRCoNS). Se procedió procesar las muestras MRSA positivas / IC (Figura 1), *S. aureus*-negativas /IC (Figura 2) y MRSA-negativas *S. aureus*-positivas / IC (Figura 3), con los reactivos y con las condiciones las cuales se han mostrado anteriormente, arriba. Los valores C_q s similares de los *mecA* y *ldh1*, en la figura 1, indican una infección por MRSA. El fallo o fracaso de la curva a tiempo real del *ldh1*, para cruzar la línea límite o umbral, en la Figura 2, indica la ausencia de *S. aureus*, en una muestra. La significativa diferencia en el valor de C_q s, entre el *mecA* y el *ldh1*, en la figura 3, indica el hecho de la existencia de una infección mixta por bacterias MRSA-negativas *S. aureus* y coagulasa-negativas *mecA*-positivas.

EJEMPLO 3

Este ejemplo, establece el criterio para la identificación de los MRSA y SA, mediante la utilización de un sitio de inserción *SCCmec*, del *mecA*, y la detección de gen *dh1*.

Se procede añadir la detección del marcador del sitio de inserción de *SCCmec* (a saber, la región puente de *SCCmec*), para que ésta cuente para la situación, en la cual, exista aproximadamente la misma cantidad de diferentes bacterias (MSSA y MRCoNS), en una muestra.

La tabla 4, la cual se facilita abajo, a continuación, muestra una comparación del valor de C_{qs} , en la PCR a tiempo real, para el sitio de inserción *SCCmec*, *ldh1* y *mecA*, mediante la utilización de un panel representativo para muestras clínicas. La presencia de ambos marcadores, es decir, los marcadores del SA y del *mecA*, a la misma cantidad relativa (ΔC_q inferior a 2), es indicativa para MRSA, si esta muestra es positiva para la PCR, de la región puente de *SCCmec*; diferentes cantidades relativas (ΔC_q igual o mayor de 2), o la presencia de de únicamente un marcador genético *Staphylococcus aureus*-específico (específico para estafilococos-áureo), es indicativo para la SA, incluso si la muestra es positiva, para la PCR de la región puente de *SCCmec*. Los cebadores del sitio de inserción *SCCmec*, se ha descrito ya, anteriormente, en la literatura correspondiente al arte especializado (Huletsky, A., et al., J. Clin. Microbiol., 42: 1875 - 1884 (2004)). La sonda utilizada, era la MGB-AP642-AATTAACACAACCCGCAT-Q (SEQ ID NO: 17).

Tabla 4

Muestra #	LDH1 = C_{q1}	<i>mecA</i> = C_{q2}	ΔC_q [$C_{q1} - C_{q2}$]	Región puente de <i>SCCmec</i>	Resultado de la PCR a tiempo real	Resultado del cultivo	¿Concordante?
256	23,76	24,56	0,81	+	MRSA	MRSA	Sí
261	26,53	27,73	0,60	-	MSSA	MSSA	Sí
269	25,85	28,75	2,90	+	MSSA	MSSA	Sí
273	32,76	38,93	6,17	-	MSSA	MSSA	Sí
282	20,33	21,11	0,77	+	MRSA	MRSA	Sí
288	22,10	-	NA	-	MSSA	MSSA	Sí
291	22,80	30,86	8,05	-	MSSA	MSSA	Sí

292	25,22	24,59	0,63	+	MRSA	MRSA	Sí
298	34,19	37,66	3,47	-	MSSA	MSSA	Sí
300	29,16	27,98	1,18	-	MSSA	MSSA	Sí
301	32,18	32,34	0,16	+	MRSA	MSSA	No
309	24,09	25,22	1,12	+	MRSA	MRSA	Sí
337	27,78	26,02	1,76	-	MSSA	MSSA	Sí
345	28,32	28,21	0,11	-	MSSA	MSSA	Sí

Tal y como se muestra en la tabla 4, facilitada anteriormente, arriba, las muestras 261, 300, 337 y 345, tienen aproximadamente las mismas cantidades de los marcadores de *meaA* y *ldh1*, pero son negativos para el marcador de la región puente de *SCCmec*. Este hecho, es indicativo para una infección mixta (MSSA y MRCoNS), la cual se confirmó mediante los resultados del cultivo microbiano obtenidos.

EJEMPLO 4

Este ejemplo, ilustra la sensibilidad del ensayo, mediante la utilización de cultivo secado por congelación (es decir, un cultivo liofilizado), comercialmente disponible y adquirida de procedencia de la ATCC. Este compara también, así mismo, los valores de C_qS , de la PCR a tiempo real, de la detección del *ldh1*, con un control interno (IC), o sin éste.

Se procedió a rehidratar y subcultivar el cultivo LN 593372 47 de la subespecie del estafilococo áureo consistente en el *Staphylococcus aureus*; subsp. *aureus*; Cepa BAA-1762, de la siguiente forma. En primer lugar se procedió a añadir, al material secado por congelación (es decir, liofilizado), una cantidad de medio de caldo de cultivo tríptico de soja del tipo (Tryptic Soy Broth Medium (VWR 90000-376)), correspondiente a una cantidad comprendida dentro de unos márgenes que van desde los 0,3 ml a los 0,4 ml, adición ésta, la cual se llevó a cabo mediante una pipeta de Pasteur, y un pozo de mezcla. A continuación, se procedió a transferir la totalidad de la mezcla, a una cantidad correspondiente a 5 ml, del mismo medio de cultivo, en un tubo de ensayo, y se procedió a incubar, a una temperatura correspondiente a un valor de 37 °C, durante un transcurso de tiempo de 24 horas. Se procedió a determinar la titulación volumétrica bacteriana, llevando a cabo diluciones en series correspondientes a un valor de dilución de 1/10 (es decir, a un valor de dilución 10 veces inferior), del medio de caldo de cultivo tríptico de soja. Se procedió a transferir de 100 µl de diluciones correspondientes a unos valores de dilución de 10^{-5} , de 10^{-6} , y de 10^{-7} , a las placas del medio de caldo de cultivo tríptico de soja, y se procedió a incubar, durante el transcurso de toda la noche, a una temperatura correspondiente a un valor de $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Se procedió a llevar a cabo un recuento de las colonias, en las placas, las cuales contenían 10 – 200 colonias, y se determinó el número de unidades de formación de colonias / ml, (CFU / ml – [CFU, del inglés, colony forming units] -), de la siguiente forma:

$$\text{CFU / ml} = \text{Número de colonias} \times 10 \times \text{Factor de Dilución}$$

Se procedió preparar dos juegos de siete diluciones correspondiente a un valor de dilución de 1/10 (es decir, dilución a la décima parte), las cuales cubrían un rango correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes de $10^7 - 10$ CFU / ml, en un medio de colección del tipo “ESwab collection media”. Se procedió a “dopar” el primer juego de dilución, con 10 µl de Control Interno 2 (IC2 – [IC, de sus iniciales, en idioma inglés, correspondientes a Internal Control] -), y dopaje éste, el cual no se llevó a cabo en el segundo juego. Ambos juegos, se extrajeron mediante la utilización un sistema de extracción automatizado del tipo “NucliSENS easyMAG automated extraction system”, y éstos se eluyeron en un volumen de 50 µl. Se procedió, a continuación, a someter a test de ensayo, mediante PCR, replicados de 10 µl, de cada muestra extraída.

El conjunto de los datos en blanco, las muestras negativas (SN – [del inglés, negative samples] -), (medio ESwab no estimulado (M110024)), representados, se extrajeron, por separado, mediante el mismo procedimiento, y se procedió así mismo, también, a someter a test de ensayo, 10 µl de replicados de cada muestra negativa extraída, mediante PCR, conjuntamente con las muestras de CFU. Se procedió, a continuación, a comparar los valores de C_qS , de dos juegos de reacciones objetivizadas como diana, positivas, (con / sin IC).

La tabla 5, la cual se facilita abajo, a continuación, muestra los valores de C_qS de diluciones en serie de los cultivos de *S. aureus*, los cuales detectan el *ldh1*, el cual es un marcador de SA, en presencia o en ausencia de un control interno (IC).

Tabla 5

Número de muestra	C_qS medios	ΔC_qS medios
1e7 No IC2 / +IC2	13,27 / 13,28	0,01
1e6 No IC2 / +IC2	16,88 / 16,87	0,00
1e5 No IC2 / +IC2	20,38 / 20,38	-0,01

1e4 No IC2 / +IC2	23,82 / 23,83	-0,01
1e3 No IC2 / +IC2	27,13 / 27,12	-0,01
1e2 No IC2 / +IC2	30,50 / 30,30	-0,03
1e1 No IC2 / +IC2	33,43 / 33,37	-0,10

Este ejemplo, muestra el hecho consistente en que, el ensayo, detecta, rápida y fácilmente, por lo menos 10 CFU / ml, y que se observan similares valores de C_{qs} , con IC ó sin IC.

5

EJEMPLO 5

Este ejemplo, ilustra la capacidad de ensayo, en concordancia con la presente invención, para detectar una cantidad correspondiente a un porcentaje de ≥ 99 %, de un número apropiado cepas de MRSA, cubriendo así, de este modo, a un modelo patrón correspondiente a una amplia diversidad en la carga clínica relevante (aproximadamente 100 copias de genoma / PCR).

10

Se procedió a colocar cada cepa de ATCC *S. aureus* (cepas éstas de *S. aureus* pertenecientes a la ATCC – [Entidad de recursos biológicos] – las cuales se encuentran listadas en la tabla 6, la cual se facilita abajo, a continuación), en un placa de Agar que contenía un medio de caldo de cultivo consistente en soja tríptica, y se procedió a la incubación, a una temperatura de 37 °C, durante un transcurso de tiempo de 24 horas. Se procedió, a continuación, a verificar la uniformidad de las colonias. A continuación, se procedió a transferir una colonia procedente de cada placa, a un tubo separado (único para cada cepa), con un contenido de 5 ml de medio de cultivo de soja tríptica, y se dejó que éste se cultivara durante el transcurso de toda la noche, a una temperatura de 37 °C. Subsiguientemente, se procedió a “dopar” 1 ml del medio de ESwab, con 10 μ l del cultivo que se había cultivado durante el transcurso de toda la noche, y éste se extrajo mediante un instrumento EasyMag (de la firma Biomerieux), con la utilización de un protocolo genérico del tipo “Generic 2.0.1 protocolo”, y se eluyó en un volumen de 50 μ l. Se utilizó una cantidad de 10 μ l de cada muestra, en la reacción de PCR. Los resultados para los *ldh1* y *mecA* de cada muestra, se encuentran recopilados en la Tabla 7, la cual se facilita abajo, a continuación, indicando así, de este modo, una diferenciación exitosa de las muestras de MSSA *mecA*-negativas, con respecto a las muestras de MSSA *mecA*-positivas. Tal y como se esperaba, todas las muestras de MRSA, eran positivas, para los el marcador de SA consistente en el *ldh1*.

15

20

25

Tabla 6. La listas de las cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC), sometidas a test de ensayo

Número de producto de la ATCC	Descripción de la cepa	Número de lote	mecA	Tipo de SCC
BAA-1556 (NRS482)	Cepa FPR3757; clon USA300 de MRSA adquirido de la comunidad	58468651	Positivo	N / A
BAA - 39	Cepa HUSA304; Clon Húngaro de MRSA	4248847	Positivo	N / A
Número de producto de la ATCC	Descripción de la cepa	Número de lote	mecA	Tipo de SCC
BAA – 40	Cepa CPS22; Clon portugués de MRSA	57600149	Positivo	N / A
33591	Cepa 328; MRSA	57882703	Positivo	
BAA – 1762	GA217; USA300 MRSA (SCCmec IVb)	59337247	Positivo	IV b
BAA – 1720	Cepa de MRSA252; Cepa adquirida en hospital, aislada en el Reino Unido	59049230	Positivo	II
12600	Cepa NCTC 8532, MSSA	58532124	Negativo	-
25923	Cepa Seattle 1945, MSSA	58414955	Negativo	-

30

TABLA 7: Los resultados del test de ensayo de la cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC)

Número de producto de la ATCC	Gen <i>ldh1</i>	Gen <i>mecA</i>
BAA - 1556	Positivo	Positivo
BAA – 39	Positivo	Positivo
BAA – 40	Positivo	Positivo
33591	Positivo	Positivo
BAA – 17962	Positivo	Positivo
BAA – 1720	Positivo	Positivo
12600	Positivo	Negativo

25923	Positivo	Negativo
-------	----------	----------

Tal y como se ilustra en las Tablas 6 y 7, facilitadas anteriormente, arriba, la detección de los genes *mecA* y *ldh1* detecta, de una forma específica, los MRSA y SA.

5 **EJEMPLO 6**

Este ejemplo, ilustra la especificidad del ensayo. Se procedió a la evaluación de éste, mediante el sometimiento, a test de ensayo, para la reactividad cruzada, para especies filogenéticamente relacionadas con *S. aureus*, microorganismos patogénicos y con los microorganismos usualmente presentes en una microflora nasal, normal. El panel de ensayo (véase, a dicho efecto, la Tabla 8, la cual se facilita abajo, a continuación), consistía en 17 especies víricas, 3 especies fúngicas, 1 especie micoplásmica, y 41 especies bacterianas. Los microorganismos, se sometieron a tests de ensayo, como cultivos, en una concentraciones correspondientes a un valor de 1×10^6 CFU (1×10^5 PFU) / torunda (swab). De una forma adicional, se procedió así mismo, también, a someter a test de ensayo a células humanas, en una concentración correspondiente a un valor de 10^6 células / ml. Se encontró que, las células humanas, eran negativas para los MRSA y SA. La especificidad del análisis, era el correspondiente a un valor del 100 %.

Tabla 8. Especies sometidas a test se ensayo para la Reactividad Cruzada y para la Interferencia Microbiana

Especies de Estafilococos	Otros organismos	Virus
CoNS* <i>Staphylococcus arlettae</i> , <i>Staphylococcus capitis</i> , <i>Staphylococcus carnosus</i> , <i>Staphylococcus chromogenes</i> , <i>Staphylococcus equorum</i> , <i>Staphylococcus felis</i> , <i>Staphylococcus gallinarum</i> , <i>Staphylococcus hominis subsp. hominis</i> , <i>Staphylococcus kloosii</i> , <i>Staphylococcus lentus</i> , <i>Staphylococcus pulvereri</i> , <i>Staphylococcus simulans</i> , <i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Acinetobacter haemolyticus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bordetella pertussis</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Citrobacter koseri</i> , <i>Corynebacterium aquaticum</i> , <i>Corynebacterium bovis</i> , <i>Corynebacterium flavescens</i> , <i>Corynebacterium genitalium</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Enterococcus flavescens</i> , <i>Enterococcus gallinarum</i> , <i>Enterococcus hiraem</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>productor de ESBL</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>productor de ESBL</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>Pasteurella aerogenes</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> ,	<i>Adenovirus Tipo 1</i> , <i>Adenovirus Tipo 7A</i> , <i>Humano coronavirus (229E)</i> , <i>Humano coronavirus (OC43)</i> , <i>Citomegalovirus</i> , <i>Coxsackievirus Tipo A21</i> , <i>Epstein Barr Virus</i> , <i>Humano influenza virus A</i> , <i>Humano influenza virus B</i> , <i>Humano parainfluenza Tipo 2</i> , <i>Humano parainfluenza Tipo 3</i> , <i>Humano metapneumovirus 3 Tipo B1</i> , <i>Measles</i> , <i>Mumps virus</i> , <i>Virus respiratorio sincicial Tipo B</i> , <i>Rinovirus Tipo 1^a</i>
Especies de Estafilococos	Otros organismos	Virus
MSCoPS* <i>Staphylococcus delphini</i> , MSCoNS* <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i> , MRCoNS* <i>Staphylococcus epidermidis</i> , CoPS* <i>Staphylococcus hyicus</i> , <i>Staphylococcus intermedius</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Legionella pneumophila</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis avirulent</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Neisseria meningitides</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Homo sapiens</i> , <i>Células Humanas HT1080</i>	
* CoNS: <i>Staphylococci (Estafilococos) coagulasa</i> - negativos MSCoPS: <i>Staphylococci (Estafilococos) coagulasa</i> - positivos, susceptibles a la metilina MSCoNS: <i>Staphylococci (Estafilococos) coagulasa</i> - negativos, susceptibles a la metilina MRCoNS: <i>Staphylococci (Estafilococos) coagulasa</i> -negativos, resistentes a la metilina CoPS: <i>Staphylococci (Estafilococos) coagulasa</i> – positivos		

EJEMPLO 7

5 Este ejemplo, ilustra la detección exitosa del aislamiento de MRSA el cuales hospeda el gen *mecA* y del aislamiento de LGA251 MRSA, el cual tiene un gen diferente al de la mayoría de los genes resistentes a la meticilina consistentes en el MRSA, y al cual se le denomina *mecA*_{LGA251}. La amplificación mediante PCR, se da a conocer en la Tabla 2, la cual se ha facilitado anteriormente, arriba, con unas condiciones como las que se han descrito en Tabla 3, también facilitada anteriormente, arriba, excepto en cuanto a lo referente al hecho consistente en que, se añadieron los cebadores correspondientes a las secuencias SEQ ID NOs: 20 a 22, representando a los cebadores y a las sondas para la amplificación por PCR del *mecA*_{LGA251} (Tabla 9).

Tabla 9. Secuencias de cebadores y de sondas para la detección del *mecA*_{LGA251}

SEQ ID	Nombre del componente	Oligo-secuencia	1 x final
20	LGA - L12	CTCGTCAGAAT*T*AATTGGACCCAC	0,500 μM
21	LGA – E5	GCCGTGTTTATCCATTGAACGAAGCA	1,260 μM
22	LGA – FAM 11	MGB-FAM-G*TAAAAGGTGTACTGTTGC-EDQ	0,200 μM

15 Los resultados mostrados en la figura; para ambas muestras, las muestras MRSA positivas y la muestras LGA251-positivas de Cqs, para los *ldh1* y *mecA* (*mecA*_{LGA251}), son similares.

EJEMPLO 8

20 Este ejemplo, demuestra los resultados de interpretación para un procedimiento basado en un procedimiento y sistema computerizado, informático, el cual se encuentra descrito aquí, en este documento de solicitud de patente, mediante la utilización de un sistema informático del tipo Excel "if" (es decir, "si" [en el caso en que] -), de la funcionalidad para las muestras de torundas nasales, las cuales se habían procesado mediante la utilización de un sistema extracción consistente en el tipo "easyMag extraction" de la firma bioMerieux y de un instrumento de amplificación mediante PCR a tiempo real, del tipo "Biosystems ® 7500 Fast Dx Real-time PCR instrument".

25 Ct (umbral o límite de ciclos - [del inglés, cycle threshold] - al cual se le hace también referencia con la dominación de Cq) se define como el número de ciclos que se requieren para la que la señal fluorescente atraviese el umbral o valor límite (a saber, que dicha señal fluorescente exceda del nivel de fondo). El umbral de ciclos del SA (*ldh1*), se define como C_{T1}, el umbral de ciclos del *mecA*, se define como C_{T2}, y el umbral del control IC, se define como C_T.

Las situaciones 1 – 5, las cuales se definen abajo, a continuación, demuestran los valores elegidos de Ct, y el resultado que se les asigna.

35 Situación 1: En el caso en el que, C_{T1} > 35,0 y que C_{T2} > 35,0 y que IC C_T < 34,0, entonces, el resultado es "MRSA – negativo / SA - negativo."

Situación 2: En el caso en el que, C_{T1} > 35,0 y que C_{T2} > 35,0 y que IC C_T ≥ 34,0, entonces, el resultado es "Inválido." (no válido).

40 Situación 3: En el caso en el que, C_{T1} ≤ 35,0 y que C_{T2} ≤ 35,0 y que |C_{T1} - C_{T2}| < 2, entonces, el resultado es "MRSA - positivo."

45 Situación 4: En el caso en el que, C_{T1} ≤ 35,0, y que |C_{T1} - C_{T2}| ≥ 2, entonces, el resultado es "MRSA – negativo / SA - positivo."

Situación 5: En el caso en el que, C_{T1} > 35,0 y que C_{T2} ≤ 35,0, entonces, el resultado es "MRSA – negativo / SA - negativo."

50 La Tabla 10, la cual se facilita abajo, a continuación, recopila los datos recolectados de las muestras clínicas, en forma de Cts recolectados, en la Columnas B, C y D. Los resúmenes de la situación los cuales se encuentra recopilados en la Tabla 10, facilitada abajo, a continuación, muestra ejemplos de las células generadas mediante las funciones Excel "if", mediante la utilización de los resultados de las muestras clínicas, los cuales se han seleccionado como siendo representativos para cuatro situaciones, las cuales se han expuesto anteriormente, arriba. E2, E7, E20, y E4, se refieren al número de células correspondientes a las calificaciones que se muestran en la columna E.

Tabla 10

	A	B	C	D	E
1	Muestra ID#	IC	ldh1	mecA	Test de ensayo ELITeMGB (realizado mediante Epoch) (Algoritmo)
2	1	30,0174	50	37,7672	NEG
3	2	30,1315	50	38,3186	NEG
4	3	30,009	37,8131	33,0587	NEG
5	4	30,0331	38,3301	38,3669	NEG
6	5	30,1328	50	31,525	NEG
7	6	30,2963	23,7551	24,5647	MRSA
8	7	30,0692	50	36,3243	NEG
9	8	30,1117	35,5751	35,7861	NEG
10	9	30,1551	50	32,1061	NEG
11	10	30,1809	50	28,3299	NEG
12	11	30,1308	26,5344	27,1298	MRSA
13	12	29,9252	50	33,0466	NEG
14	13	30,0645	35,4711	33,3906	NEG
15	14	29,9879	50	50	NEG
16	15	31,1726	37,0951	36,048	NEG
17	16	30,3026	50	36,0029	NEG
18	17	30,6207	50	50	NEG
19	18	30,3318	50	30,5635	NEG
20	19	30,246	25,8525	28,7516	SA

Situación 1:

- 5 E2= En el caso en el que (y que (C2 <= 35,05, ABS(C2 - D2) < 2, D2 <= 35,05), "MRSA", y en el caso en el que (y que (C2 <= 35,05, ABS(C2-D2) >=2), "SA", "NEG")
Calificación resultante: "MRSA – Negativo / SA - Negativo"

- 10 Situación 3:
E7= En el caso en el que (y que (C7 <= 35,05, ABS(C7 - D7) < 2, D7 <= 35,05), "MRSA" y en el caso en el que (y que (C7 <= 35, 05, ABS(C7 - D7) >= 2), "SA", "NEG")) Calificación resultante: "MRSA - Positivo"

Situación 4:

- 15 E20= = En el caso en el que (y que (C20 <= 35,05, ABS(C20-D20) < 2, D20 <= 35,05), "MRSA", y en el caso en el que (y que (C 20 <= 35,05, ABS(C20 - D20) > =2), "SA", "NEG"))
Calificación resultante: "MRSA – Negativo / SA - Positivo"

Situación 5:

E4 = En el caso en el que (y que (C4 <= 35,05, ABS(C4 - D4) < 2, D4 = 35,05), "MRSA" y en el caso en el que (y que (C4 <= 35,05, ABS(C4 - D4) >= 2), "SA", "NEG")) Calificación resultante: "MRSA – Negativo / SA - Negativo".

- 25 Debería tomarse debida nota, en cuanto al hecho de que, no se proporciona un ejemplo de la Situación 2, debido a la ausencia de un resultado inválido (no válido) en la Tabla 10.

REFERENCIAS

- 30 Documentos de patente estadounidenses U S nº 3. 194. 805; U S nº 3. 128. 179; U S nº 3. 996. 345; U S nº 4. 351. 760; U S nº 4. 683. 195; U S nº 4. 683. 202; U S nº 4. 965. 188; U S nº 5. 187. 288; U S nº 5. 188. 934; U S nº 5. 227. 487, U S nº 5. 248. 782; U S nº 5. 304. 645; U S nº 5. 433. 896; 5. U S nº 442. 045; U S nº 5. 492. 806; U S nº 5. 525. 464; U S nº 5. 556. 752; U S nº 5. 556. 959; U S nº 5. 583. 236; U S nº 5. 808. 044; U S nº 5. 852. 191; U S nº 5. 986. 086; U S nº 5. 994. 056; 6. 020. 481; U S nº 6. 127. 121; U S nº 6. 156. 507; U S nº 6. 162. 931; U S nº 6. 171. 785; U S nº 6. 180. 295; U S nº 6. 221. 604; U S nº 6. 569. 627; U S nº 6. 727. 356; U S nº 6. 790. 945; U S nº 6. 946. 267; U S nº 6. 949. 367; U S nº 7. 348. 146; U S nº 7. 671. 218; U S nº 7.767. 834; U S nº 7. 838. 221; RE 38. 416.

Publicación de patente estadounidense U S nº 2005 / 0 118 623.

Documentos de patente internacional

- 5 Publicaciones de patente internacional nº WO 03 /023 357, nº WO 02 / 062 816, nº WO 92 / 10 588 y nº WO 96 / 17 957.
- Patentes europeas EP nº 1 408 366, y EP nº 1 314 734
- 10 Otras publicaciones
- Ausubel, et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY – Protocolos actuales en la biología molecular -, John Wiley & Sons (1987, 1988, 1989, 1990, 1991, 1992, 1993, 1994, 1995, 1996)
- 15 Bengtsson et al., Nucl. Acids Res., 31: e45 (2003)
- Blanc et al., J. Clin. Microbiol., 49: 722 - 724 (2011)
- Bolli et al., Nucleic Acids Res., 24: 4660 - 4667 (1996)
- 20 Boucher et al., CID.. 51 (suplemento 2): S183S197 (2010)
- Brown et al., Pharmacoeconomics – Farmacoeconomía -, 28: 567 - 575 (2010)
- 25 Chen et al., Nucleic Acids Res., 23: 2661 - 2668 (1995)
- Dieffenbach et al. (eds.), PCR Primer: A Laboratory Manual, -Cebadores para PCR: Un manual de laboratorio -, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2003)
- 30 Eckstein (ed.), OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES: A PRACTICAL APPROACH, - Oligonucleótidos y análogos: Un enfoque práctico -, IRL Press (1991)
- Fieser y Fieser, REAGENTS FOR ORGANIC SYNTHESIS, Volumes I to 17,- Reactivos para la síntesis orgánica -, Volúmenes 1 a 17, Wiley, U S (1995)
- 35 Gait (ed.), OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS: A PRACTICAL APPROACH, - Síntesis de los oligonucleótidos: Un enfoque práctico -, IRL Press (1984)
- Geiger et al., Nature 359: 859 - 861 (1992)
- 40 Gemmel et al., J. Antimicrob. Chemother., 57: 589 - 608 (2006)
- Hartman & Tomasz, J. Bacteriol., 158: 513 - 516 (1984)
- 45 Haugland et al., Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Sixth Ed., - Manual de las sondas fluorescentes y agentes químicos de investigación, Sexta Edición -, Molecular Probes, Sondas moleculares- , Eugene, Ore. (1996)
- Hiramatsu et al., Int. J. Me. Microbiol., 292: 67 - 74 (2002)
- 50 Hirschberg et al., Biochemistry, - Bioquímica -, 37: 10381 - 10385 (1998)
- Huletsky et al., J. Clin. Microbiol., 42: 1875 - 1884 (2004)
- 55 Innis et al., eds, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, 1990 -, Protocolos de PCR: Una guía para los procedimientos y aplicaciones, 1990 -, Kolman et al., BMC Res. Notes, 3; 110 (2010)
- Krasoviskii and Bolotin, Organic Luminescent Materials, - Materiales orgánicos fluorescentes -, VCH Publishers, NY. (1988)
- 60 March et al., ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY - Reactions, Mechanisms and Structures, 4th ed., - Química orgánica avanzada – Reacciones, Mecanismos y estructuras, 4ª Edición -, John Wiley & Sons, New York, NY (1992)
- McPherson et al., PCR Basics, - Fundamentos de la PCR -, 2000
- 65 Mullis et al., Cold Spring Harb. Symp. Quant.Biol., 51 Pt 1: 263 - 273 (1986)

- Nielsen et al., *Science*, 254: 1497 - 1500 (1991)
- 5 Palissa et al., *Z. Chem.*, 27: 216 (1987)
- Richardson et al., *Science*, 319: 1672 (2008)
- Rossney et al., *J. Clin. Microbiol.*, 46: 3285 - 3290 (2008)
- 10 Sambrook, Fritsch & Maniatis, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, Second Edition, - Clonación Molecular: Un manual de laboratorio, Cuarta Edición -, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)
- Sherlock et al., *Clin. Microbiol. Infect.* 16: 955 - 959 (2010)
- 15 Singh et al., *Chem. Comm.*, 455 - 456 (1998)
- Smith et al., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*: 1195 - 1204 (1993)
- Stevenson J et al., *J Clin Microbiol.*, 43: 2391 - 8 (2005)
- 20 Warren et al., *J. Clin Microbiol.*, 42: 5578 - 5581 (2004)
- Wengel, *Acc. Chem. Res.*, 32: 301 - 310 (1998)
- 25 Whitaker, et al., *Anal. Biochem.* 207: 267 - 279 (1992)
- Wittwer et al. (eds.). *Rapid Cycle Real-time PCR Methods and Applications: Quantification, - Procedimientos y aplicaciones de PCR a tiempo real, de ciclo rápido -*, Springer - Verlag (2004)
- 30 Wong et al. *J. Clin. Microbiol.*, 48: 3525 - 3531 (2010)
- Zolliger, *Color Chemistry*, 2nd Edition, - La química de los colores, 2 Edición -, VCH Publishers. NY. (1991)

REIVINDICACIONES

1.- Un procedimiento para la detección de *estafilococos áureos* resistentes a la penicilina ("MRSA"), en una muestra, la cual contiene ácidos nucleicos, comprendiendo, el procedimiento:

amplificar los ácidos nucleicos, en la muestra; y
detectar ácidos nucleicos, en la muestra, los cuales comprendan genes amplificados de *mecA* y *ldh1*, en donde, la presencia de genes amplificados de *mecA* y de *ldh1*, en un factor de relación de 1 : 1, indica la presencia de *estafilococos áureos* resistentes a la meticilina.

2.- El procedimiento de la reivindicación 1, el cual comprende, de una forma adicional, la etapa de calcular las concentraciones, a tiempo real, de los genes amplificados de los *mecA* y *ldh1*, en donde, una diferencia de la concentración, indica el hecho de una infección mixta de *Estafilococos áureos* y un soporte coagulasa – negativo del *mecA*, en la muestra.

3.- El procedimiento de la reivindicación 1, el cual comprende, de una forma adicional, la etapa de detectar ácidos nucleicos, en la muestra, que comprende por lo menos un gen específico de *Estafilococos áureos* ("SA"), adicionalmente al *ldh1*.

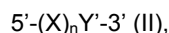
4.- Un procedimiento para la detección de ácidos nucleicos de *Estafilococos áureos* ("SA"), y de *Estafilococos áureos* resistentes a la meticilina ("MRSA"), en una muestra, mediante la utilización de detección combinada de genes de *ldh1* y de *mecA*, en la muestra, el cual comprende:

(a) contactar la muestra, con un primer cebador de aleta y un segundo cebador de aleta, que tienen la fórmula:



en donde, X representa la porción 5' de los cebadores de aleta, la cual no es complementaria al gen *ldh1*, n es 1, Y representa la porción 3' de los cebadores de aleta, la cual es complementaria al ácido nucleico al gen *ldh1*, y X es de aprox. 3 – 30 nucleótidos de longitud,

b) contactar la muestra, después de la etapa (a), con un tercer cebador de aleta y un cuarto cebador de aleta, que tienen la fórmula:



en donde, X representa la porción 5' de los cebadores de aleta, la cual no es complementaria al gen *mecA*, n es 1, Y', representa la porción 3' de los cebadores de aleta, la cual es complementaria al gen *mecA*, y, X, es de aprox. 3 – 30 nucleótidos de longitud;

c) incubar la muestra, a continuación de las etapas (a) y (b), bajo unas condiciones, las cuales sean suficientes, como para amplificar los genes *ldh1* y *mecA*, generando, y
(d) detectar los genes *ldh1* y *mecA*, amplificados.

5.- El procedimiento de las reivindicaciones 1 ó 4, en donde, el gen *ldh1* amplificado, comprende la SEQ ID NO:1, y el gen *mecA* amplificado, comprende la SEQ ID NO:2

6.- El procedimiento de la reivindicación 4, en donde, X, es de aproximadamente 9 hasta aproximadamente 15 nucleótidos de longitud; y / o comprende la SEQ ID NO:3, AATAAATCATAA.

7.- El procedimiento de la reivindicación 4, en donde, Y, comprende una secuencia de SEQ ID NO:4, GGT*GA*ACA*TGGTGACTGAAT, en donde, T*, es 5-(4-hidroxi-but-1-inil)-1H-pirimidin-2,4-diona y, A*, es 4-(4,6-Diamino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-but-3-in-1-ol.; y / o una secuencia de SEQ ID NO:5, GCGCTTGCCCTCAGGACG.

8.- El procedimiento de la reivindicación 4, en donde, el primer cebador de aleta, comprende una primera secuencia de la SEQ ID NO:6, 5'-AATAAATCATAAGGT*GA*ACA*TGGTGACTGAAT-3' la cual tiene una primera secuencia subrayada, la cual no es complementaria a la secuencia del gen *ldh1*, en donde, T*, es 5-(4-hidroxi-but-1-inil)-1H-pirimidin-2,4-diona y, A*, es 4-(4,6-Diamino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-but-3-in-1-ol, y en donde, el segundo cebador de aleta, comprende una segunda secuencia de la SEQ ID NO:7, 5'AATAAATCATAAGCGCTTTGCCCTCAGGACG-3' la cual tiene una segunda secuencia, la cual no es complementaria a la secuencia del gen *ldh1*.

9.- El procedimiento de la reivindicación 4, en donde, el tercer cebador de aleta, comprende una tercera secuencia de la SEQ ID NO:8, GTGCGTTAATATTGCCATTATTTCTAATGCG-3' (), en donde, n = 0., y en donde, el cuarto cebador de aleta, comprende una cuarta secuencia de la SEQ ID NO:9, GGTTACGGACAAGGTGAAATAITGATTAACC-3', en donde, x es 0, e l es 3-alquil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona.

- 5 10.- El procedimiento, según las reivindicaciones 1 ó 4, en donde, la muestra, es una muestra la cual procede de un animal, el cual es sospechoso de tener una infección de MRSA, de una forma opcional, en donde, el animal, es un ser humano; y / o en donde, la muestra se recoge de una torunda de una herida, de una torunda nasofaríngea, de una torunda de la garganta, de una torunda rectal, o ésta se trata de una muestra de sangre, o de una muestra de las heces.
- 10 11.- El procedimiento de la reivindicación 4, en donde, los genes amplificados, se someten continuamente a un control de seguimiento, en la etapa de detección.
- 15 12.- El procedimiento de las reivindicaciones 1 ó 4, en donde, los genes *mecA* y *ldh1* amplificados, se detectan mediante la hibridación a una sonda específica de *mecA*, ó una sonda específica de *ldh1*, de una forma opcional, en donde, las sondas, son sondas de generación de fluorescencia; y / o,
- 20 en donde, la sonda de generación de fluorescencia, específica para el *ldh1*, comprende una secuencia de la SEQ ID NO:10, 5'-Ra-G*ACATTACT*T*GA*ACAA*CG-Rb-5', en donde, Ra, es (M)_a-Fl ó (M)_a-Q, M es un ligando de surco menor, a es 0 ó 1, F1 es un fluoróforo con una longitud de onda de emisión, correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre los 400 nm y los 900 nm, Q es un extintor no fluorescente, T*, es 5-(4-hidroxi-but-1-inil)-1H-pirimidin-2,4-diona, A*, es 4-(4,6-Diamino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-but-3-in-1-ol, y G*, es 6-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona, en donde, uno de las Ra ó Rb, comprende un fluoróforo, y la otra, comprende un extintor, y en donde, el extintor, permite la extinción de la fluorescencia, cuando la sonda se encuentra hibridada; y / o,
- 25 en donde, la sonda de generación de fluorescencia, específica para el *mecA*, comprende una secuencia de la SEQ ID NO:11, 5'-Ra- G*AAAGGATCTGACTGG*G-Rb-5', en donde, Ra, es (M)_a-Fl ó (M)_a-Q, M es un ligando de surco menor, a es 0 ó 1, F1 es un fluoróforo con una longitud de onda de emisión, correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre los 400 nm y los 900 nm, Q es un extintor no fluorescente, y G*, es 6-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona, en donde, uno de las Ra ó Rb, comprende un fluoróforo, y la otra, comprende un extintor, y en donde, el extintor, permite la extinción de la fluorescencia, cuando la sonda no se encuentra hibridada.
- 30 13.- El procedimiento de las reivindicaciones 1 ó 4, en donde, los genes *mecA* y *ldh1*, amplificados, se detectan mediante cebadores marcados, específicos para el *mecA*, ó mediante cebadores marcados, específicos para el *ldh1*, de una forma opcional, en donde, los cebadores, son cebadores de generación de fluorescencia; y / o, el cual comprende, de una forma opcional, la etapa de detectar ácidos nucleicos, en la muestra, comprendiendo por lo menos un sitio de integración o región puente de SSCmec, amplificado.
- 35 14.- El procedimiento de la reivindicación 4, en donde, la etapa de detección, comprende, de una forma adicional, el proceder a calcular, las concentraciones de los genes *mecA* y *ldh1* amplificados, a tiempo real, y en donde, una diferencia en la concentración, la cual sea mayor o igual a 2, indica el hecho de la existencia de una infección mixta de *Estafilococos áureos* y un portador de *mecA*, en la muestra.
- 40

Figura 1

Delta Rn vs. Ciclo

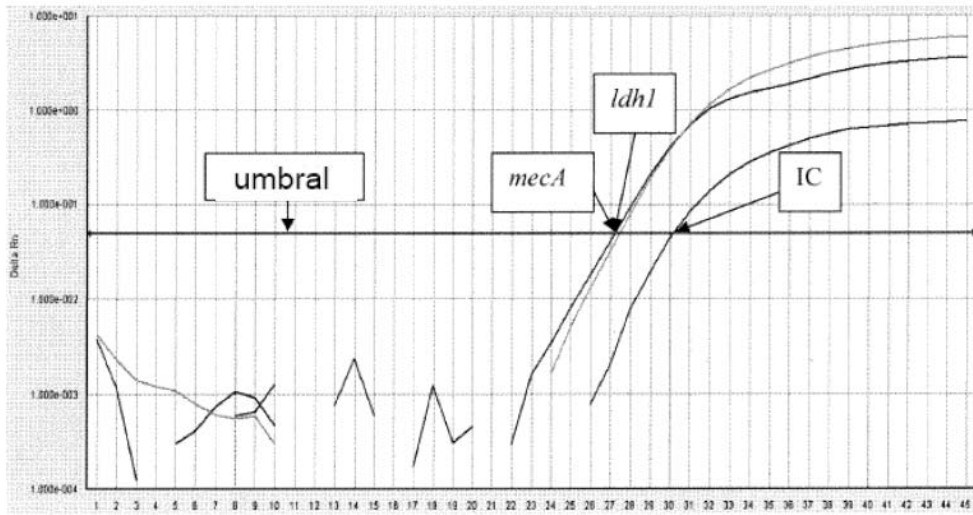


Figura 2

Delta Rn vs. Ciclo

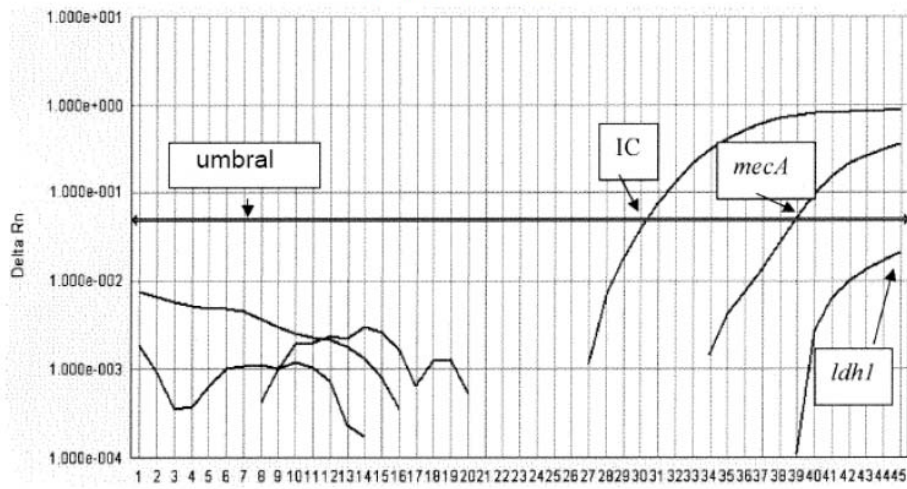
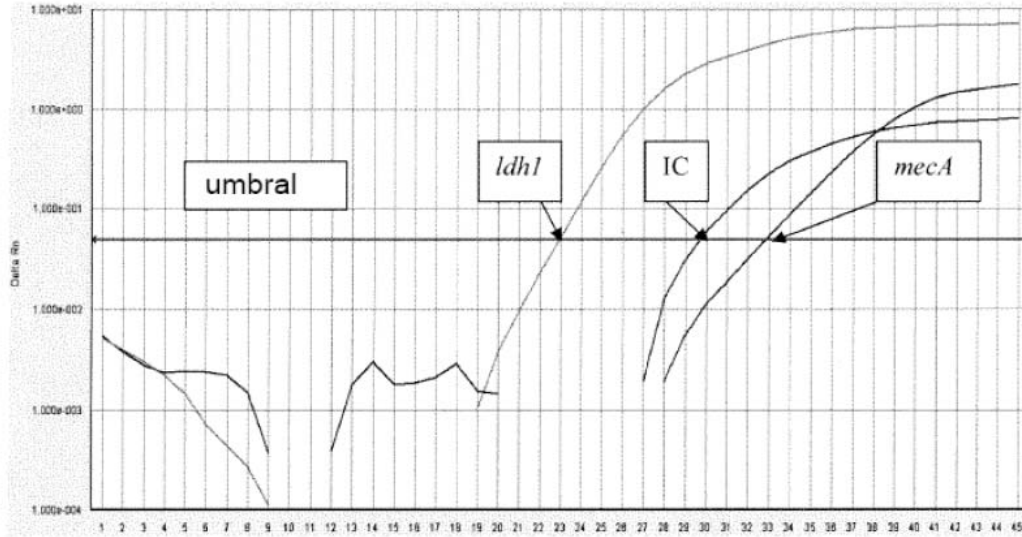


Figura 3

Delta Rn vs. Ciclo



Número de ciclos

Figura 4

Delta Rn vs. Ciclo

