

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 793**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2010 E 10744408 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2015 EP 2398921**

54 Título: **Métodos para la detección e identificación de beta lactamasas de espectro extendido**

30 Prioridad:

19.02.2009 US 153954 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.09.2015

73 Titular/es:

**BECTON DICKINSON INFUSION THERAPY
SYSTEMS INC. (100.0%)
1 Becton Drive
Franklin Lakes, NJ 07417-1880, US**

72 Inventor/es:

**LIPPE, CATHERINE;
DUTEAUD, ISABELLE y
ROGER-DALBERT, CELINE**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 545 793 T3

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

Descripción

Métodos para la detección e identificación de beta lactamasas de espectro extendido

5 Referencia a la lista de secuencias

La presente solicitud se presenta junto con una lista de secuencias en formato electrónico. La lista de secuencia se proporciona como un archivo denominado GENOM.097VPC.txt, creado el 18 de febrero de 2010 que es de 15.2 KB en tamaño. La información en formato electrónico de la lista de secuencias se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

10 Antecedentes de la invención

15 Campo de la invención

Las modalidades descritas en la presente descripción se relacionan con el diagnóstico molecular, y, particularmente, el diagnóstico que se usa para detectar e identificar microbios que portan beta lactamasas de espectro extendido (ESBLs), y particularmente genes CTX-M.

20 Descripción de la técnica relacionada

Las β -lactamasas confieren resistencia contra fármacos de β -lactámicos. Estas enzimas destruyen el anillo β -lactámico de los antibióticos β -lactámicos, tales como penicilina, cefalosporinas, cefamicinas, y carbapenemos (ertapenemo). Estos antibióticos tienen un elemento común en su estructura molecular: un anillo de cuatro átomos conocido como un beta-lactámico. La enzima lactamasa rompe ese anillo libre, lo que desactiva las propiedades antibacteriales de la molécula.

Las β -lactamasas de espectro extendido (ESBLs) son cada vez más responsables de infecciones nosocomiales que se elevan por todo el mundo, y de forma alarmante, por emergencia comunitaria también (Rossolini y otros 2008, CMI). Las ESBLs son beta-lactamasas que hidrolizan cefalosporina de espectro extendido con una cadena lateral de oximiino. Estas cefalosporinas incluyen cefotaxima, ceftriaxona, y ceftazidima, así como el aztreonam oximiino monobactam. Así las ESBLs confieren resistencia a estos antibióticos y a beta lactámicos oximiino relacionados. Las ESBLs más conocidas se derivan de los genes TEM-1, TEM-2, o SHV-1, e incluyen mutaciones que alteran la configuración de aminoácidos alrededor del sitio activo de estas β -lactamasas. Esto extiende el espectro de antibióticos β -lactámicos susceptibles a la hidrólisis por estas enzimas.

Las variantes clásicas TEM y SHV, tal como genes TEM y SHV, en realidad se están extendiendo rápidamente por todo los Estados Unidos de América, después de haber afectado a la mayor parte de Europa, mientras que un nuevo tipo de ESBL, CTX-M, es predominante en América del Sur, el Mediterráneo y los países de Europa del Este (Govinden y otros 2007, AJB). La última, que debe su nombre a su alta actividad frente a cefotaxima, se observó en los finales de 1980 en Japón, Europa y Argentina, más específicamente en Alemania en 1989 (Naas y otros 2008, CMI). Se considera que es el grupo más exitoso de todos (Rasmussen & Hoiby 2004, CJM). Su aspecto podría ser una consecuencia del uso incrementado de ceftriaxona y/o cefotaxima para tratar infecciones bacterianas, y su origen es conocido por ser de genes cromosómicos residentes en los miembros del género *Kluyvera*. Hasta hoy día, más de 85 derivados de CTX-M, que se clasifican en 5 grupos filogenéticos (CTX-M-1, 2, 8, 9 y 25), se han documentado de acuerdo con el sitio web de la Clínica Lahey, accesible en la dirección web lahey.org/Studieso.

Los genes de resistencia CTX-M se encuentran en *Enterobacteriaceae* y se pueden transmitir fácilmente a través de plásmidos entre especies. Las especies de Enterobacterias que incluyen *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, y similares que poseen los genes CTX-M se consideran que sean la principal causa de infección del tracto urinario. Otras *Enterobacteriaceae*, tal como *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter aerogenes*, así como también *Klebsiella oxytoca*, pueden además albergar genes CTX-M. La detección de cepas resistentes a CTX-M es especialmente crucial, ya que requiere el aislamiento de otros pacientes en hospitales, y dejaría sólo los carbapenémicos como el principal tratamiento para las infecciones.

Hasta hace poco, la única manera de saber la resistencia de una cepa fue realizar una prueba manual de susceptibilidad antimicrobiana. Las pruebas de susceptibilidad sufren de muchos inconvenientes, que incluyen la cantidad de tiempo para obtener un resultado, es decir, entre 48 a 96 horas. En primer lugar, el operador necesita para aislar la cepa bacteriana de las muestras, lo que podría tomar hasta 48 horas; después proceder con la identificación bioquímica, que son otras 18 a 24 horas, y luego con la prueba manual de susceptibilidad antimicrobiana, que además podría tardar hasta 24 horas. Adicionalmente a la demora en la obtención de resultados, los métodos de pruebas manuales también sufren de otros problemas, como la falta de reproducibilidad debido a un almacenamiento

inadecuado de los discos de antibióticos, la difusión indebida de algunos discos de antibióticos, y la falta en la estandarización del proceso.

La especificidad y exactitud de la detección de ESBLs es crucial, ya que los resultados falsos negativos pueden llevar a los médicos a diseñar un régimen inadecuado de antibióticos, por ejemplo, el tratamiento de un individuo con una infección de ESBL con cefalosporinas de tercera generación o con aztreonam. Esto plantea riesgos innecesarios para el individuo tratado, y además aumenta las probabilidades de contaminación cruzada dentro de un ambiente clínico, *por ejemplo*, un hospital. Como algunas cepas que producen ESBL no se mostrarán en la resistencia *in vitro* a todas las cefalosporinas de tercera o cuarta generación mediante el uso de los puntos de parada sugeridos, el Instituto Estándar Clínico y de Laboratorio, (CLSI), recomienda informar las *Enterobacteriaceae* que producen ESBL como resistentes a penicilinas, cefalosporinas y aztreonam, ya que podrían terminar siendo clínicamente resistentes (CLSI, M100-S18). La capacidad de los organismos que albergan genes de resistencia CTX-M para hidrolizar las cefalosporinas más nuevas y aztreonam hace su detección aún más difícil. Las directrices de CLSI plantean la amenaza de diagnosticar mal la presencia de cepas que producen CTX-M, en dependencia de los fármacos usados tanto en la selección inicial como en pruebas de confirmación.

Las modalidades descritas en la presente descripción proporcionan ventajas sobre otros métodos usados para detectar e identificar bacterias que tienen ESBLs, *por ejemplo*, genes de resistencia CTX-M, que incluyen la mejora de la especificidad, la disponibilidad de los resultados en un período de tiempo más corto, y elimina la necesidad de realizar etapas adicionales, tales como electroforesis en gel de agarosa, para detectar ESBLs. (Lartigue y otros 2004, FEMS ML; Pitout y otros 2004, JCM; Pitout y otros 2007, CMI). Además, las modalidades descritas en la presente descripción ofrecen ventajas sobre otros métodos informados para la detección de ESBLs, que incluyen CTX-M, en que los métodos y composiciones descritos en la presente descripción están diseñados específicamente para la detección e identificación de isoformas recientemente descubiertas del gen CTX-M, que no eran conocidas por la época del desarrollo de los ensayos descritos, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. US20070248954. Los métodos descritos en US20070248954 usan cebadores que no son totalmente complementarios a las secuencias de las isoformas de CTX-M recientemente descubiertas, lo que podría comprometer la especificidad, o incluso dar lugar a resultados falsos negativos.

Resumen de la invención

De acuerdo con un aspecto de la presente invención se proporciona un método como se define por las reivindicaciones para detectar y/o identificar la presencia de microbios con una β -lactamasa de espectro extendido CTX-M en una muestra.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención se proporciona un estuche como se define por las reivindicaciones para la detección y/o identificación de la presencia de microbios con una β -lactamasa de espectro extendido CTX-M en una muestra.

La presente invención se relaciona además con el uso de cebadores y sondas de acuerdo con las modalidades descritas en la presente descripción, en donde los cebadores o sondas tienen las secuencias de acuerdo con cualquiera de las secuencias como se definen en las sec. con núms. de ident.; 1-24.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es un árbol filogenético de todos los genes CTX-M agrupados en 4 grupos, con *Klebsiella oxytoca* como un grupo externo.

La figura 2 es un alineamiento de secuencias, que muestra la ubicación de los cebadores descritos en la presente descripción para detectar el grupo CTX-M-1 (ctxm1-616F/sec. con núm. de ident.:1)(ctxm1-740R/sec. con núm. de ident.:2)(ctxm1/2-657B/sec. con núm. de ident.:5). También se muestran los cebadores de amplificación descritos anteriormente (CTXM1-F3/sec. con núm. de ident.:40)(CTXM1-R2/sec. con núm. de ident.:41). La secuencia de referencia que se muestra es una secuencia consenso de un alineamiento de todas las secuencias CTX-M-1. La secuencia consenso mostrada corresponde a la sec. con núm. de ident.: 48.

La figura 3 es un alineamiento de secuencia, que muestra la ubicación de los cebadores descritos en la presente descripción para detectar el grupo CTX-M-2 (ctxm2-609F/sec. con núm. de ident.:3)(ctxm2-776R/sec. con núm. de ident.:4)(ctxm1/2-657B/sec. con núm. de ident.:5). Además se muestran los cebadores de amplificación descritos anteriormente (TOHO1-2F/sec. con núm. de ident.:42)(TOHO 1-1R/sec. con núm. de ident.:43). La secuencia de referencia que se muestra es una secuencia consenso de un alineamiento de todas las secuencias CTX-M-2. La secuencia consenso mostrada corresponde a la sec. con núm. de ident.: 49.

La figura 4 es un alineamiento de secuencia, que muestra la ubicación de los cebadores descritos en la presente descripción para detectar el grupo CTX-M-8 (ctxm8-119R/sec. con núm. de ident.:7)(ctxm8-7F/sec. con núm. de ident.:6)(ctxm8/9-42B/sec. con núm. de ident.:10). Además se muestran los cebadores de amplificación descritos previamente (CTXM825F/sec. con núm. de ident.:44)(CTXM825/sec. con núm. de

ident.:45). La secuencia de referencia mostrada es una secuencia consenso de un alineamiento de todas las secuencias CTX-M-8. La secuencia consenso mostrada corresponde a la sec. con núm. de ident.: 50.

La figura 5 es un alineamiento de secuencia, que muestra la ubicación de los cebadores descritos en la presente descripción para detectar el grupo CTX-M-9 (ctxm9-7F/sec. con núm. de ident.:8)(ctxm9-117R/sec. con núm. de ident.:9)(ctxm8/9-42B/sec. con núm. de ident.:10). Además se muestran los cebadores de amplificación descritos previamente (CTXM914F/sec. con núm. de ident.:46)(CTXM914R/sec. con núm. de ident.:47). La secuencia de referencia que se muestra es una secuencia consenso de un alineamiento de todas las secuencias CTX-M-9. La secuencia de consenso mostrada corresponde a la sec. con núm. de ident.: 51.

Descripción detallada de la modalidad preferida

Las modalidades descritas en la presente descripción se refieren a composiciones y métodos para la eficiente y específica detección y/o identificación de microbios que tienen β -lactamasas de espectro extendido, o expandido (ESBLs).

Como se usa en la presente descripción, el término " β -lactamasas de espectro expandido" o "ESBLs", se refiere a β -lactamasas aquellas lactamasas capaces de conferir resistencia bacteriana a las penicilinas, las cefalosporinas de primera, segunda, y tercera generación, y aztreonam (pero no a las cefamicinas o carbapenemos) por hidrólisis de estos antibióticos, y que se inhiben por inhibidores de β -lactamasa como el ácido clavulánico. El experto en la materia apreciará que el término "ESBL" abarca todas las β -lactamasas de espectro expandido ahora conocidas o descubiertas en el futuro, que incluyen pero sin limitarse a todas las ESBLs enumeradas en el sitio web de la Clínica Lahey, en la dirección web lahey.org/Studies. En consecuencia, el término ESBL abarca ESBLs del tipo SHV, o sulfhidrilo variable, tipo TEM, TOHO y tipo CTX-M.

En algunas modalidades, las composiciones y ensayos se usan para detectar e identificar beta-lactamasas CTX-M. Las enzimas CTX-M han sido reseñadas previamente en detalle (Bonnet, R., y otros (2004), Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrob. Agents Chemother. 48:1-14.). Algunas características ilustrativas, no limitantes de beta lactamasas CTX-M son como sigue: MICs de cefotaxima en el intervalo de resistencia (>64 μ g/ml), mientras que las MICs de ceftazidima están usualmente en el intervalo aparentemente susceptible (2 a 8 μ g/ml). Sin embargo, algunas ESBL de tipo CTX-M realmente pueden hidrolizar ceftazidima y conferir resistencia a esta cefalosporina (MICs tan altas como 256 μ g/ml). Las MICs de aztreonam son variables. Las β -lactamasas de tipo CTX-M hidrolizan cefepime, y las MICs de cefepime son superiores que las observadas en bacterias que producen otros tipos de ESBL. Tazobactam exhibe una actividad inhibidora casi 10 veces mayor que el ácido clavulánico contra β -lactamasas de tipo CTX-M. Algunas bacterias pueden albergar ESBLs tanto de tipo CTX-M como de tipo SHV o ESBLs de tipo CTX-M y β -lactamasas de tipo AmpC, que pueden alterar el fenotipo de resistencia a los antibióticos.

Las modalidades descritas en la presente son capaces de una rápida detección y/o identificación de β -lactamasas CTX-M, que incluyen una o más β -lactamasas CTX-M identificada como CTX-M-1 hasta CTX-M-82, que incluyen algunas o todas las β -lactamasas tipo CTX-M que se encuentran en las cepas bacterianas enumeradas en la **Tabla 1**.

Tabla 1

Grupo	Enzima	Posición del Nucleótido en el grupo de alineamiento	Cambio de base	Acceso al Banco de Genes	al de núm.	Especies
	CTX-M-1			X92506		<i>Escherichia coli</i>
	CTX-M-3			Y10278		<i>Citrobacter freundii</i>
	CTX-M-10	R 4	A $\rightarrow$ G	AF255298		<i>Escherichia coli</i>
		B 6	C $\rightarrow$ T			
	CTX-M-11	F 2	T $\rightarrow$ C	AY005110		<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	CTX-M-12			AF305837		<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	CTX-M-15			AY044436		<i>Escherichia coli</i>

ES 2 545 793 T3

5		CTX-M-22			AY080894	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
		CTX-M-23			AF488377	<i>Escherichia coli</i>
		CTX-M-28			AJ549244	<i>Escherichia coli</i>
		CTX-M-29			AY267213	<i>Escherichia coli</i>
		CTX-M-30			AY292654	<i>Citrobacter freundii</i>
10		CTX-M-32			AJ557142	<i>Escherichia coli</i>
					AY421962	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
15		CTX-M-34	R 4	A → G	AY515297	<i>Escherichia coli</i>
			B 6	C → T		
		CTX-M-36			AB 177384	<i>Escherichia coli</i>
20		CTX-M-37	R4	A → G	AY649755	<i>Enterobacter cloacae</i>
	CTX-M-1		B 6	C → T		
		CTX-M-42			DQ061159	<i>Escherichia coli</i>
25		CTX-M-52			DQ223685	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
		CTX-M-53	R4	A → G	DQ268764	<i>Salmonella enterica</i>
			B6	C → T		
30		CTX-M-54			DQ303459	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
		CTX-M-55			DQ885477	<i>Escherichia coli</i>
		CTX-M-57			DQ810789	<i>Salmonella enterica</i>
35					EU086736	<i>Shigella sonnei</i>
		CTX-M-58			EF210159	<i>Escherichia coli</i>
		CTX-M-60			AM411407	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
40		CTX-M-61			EF219142	<i>Salmonella typhimurium</i>
		CTX-M-62			EF219134	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
		CTX-M-66			EF576988	<i>Proteus mirabilis</i>
45		CTX-M-68	B 6	C → T	EU177100	<i>Klebsiella sp.</i>
		CTX-M-69			EU402393	<i>Escherichia coli</i>
		CTX-M-79			EF426798	<i>Escherichia coli</i>
50		CTX-M-82			DQ256091	<i>Escherichia coli</i>
	CTX-M-2	CTX-M-2			X92507	<i>Salmonella typhimurium</i>
					AB176535	<i>Acinetobacter baumannii</i>
55					AJ416343	<i>Proteus mirabilis</i>
		CTX-M-4	F 4	C → A	Y14156	<i>Salmonella typhimurium</i>
		CTX-M-5	R 12	T → C	U95364	<i>Salmonella typhimurium</i>
60		CTX-M-6	F 14	C → G	AJ005044	<i>Salmonella typhimurium</i>
			F 15	A → T		
			R 12	T → C		
		CTX-M-7	R 12	T → C	AJ005045	<i>Salmonella typhimurium</i>
		CTX-M-20	R 12	T → A	AJ416344	<i>Proteus mirabilis</i>

				AJ567481	<i>Providencia sp.</i>
	CTX-M-31			AJ567482	<i>Escherichia coli</i>
5					
	CTX-M-35			AB 176532	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	CTX-M-43			DQ102702	<i>Acinetobacter baumannii</i>
10	CTX-M-44			D37830	<i>Escherichia coli</i>
	CTX-M-56			EF374097	<i>Escherichia coli</i>
	CTX-M-59			DQ408762	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
15	CTX-M-76	R 12	T → C	AM982520	<i>Kluyvera ascorbata</i>
	CTX-M-77	R 12	T → C	AM982521	<i>Kluyvera ascorbata</i>
	CTX-M-8	F 4	G → A	AF189721	<i>Citrobacter amalonaticus</i>
20		F 8	C → G		
		R 15	C → T		
	CTX-M-25			AF518567	<i>Escherichia coli</i>
	CTX-M-26			AY157676	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
25	CTX-M-39			AY954516	<i>Escherichia coli</i>
	CTX-M-40	F 4	G → A	AY750914	<i>Escherichia coli</i>
		F 8	C → G		
30		R 15	C → T		
	CTX-M-41			DQ023162	<i>Proteus mirabilis</i>
	CTX-M-63	F 4	G → A	AB205197	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
35		F 8	C → G	EU660216	<i>Morganella morganii</i>
		R 15	C → T		
	CTX-M-78	F4	G → A	AM982522	<i>Kluyvera ascorbata</i>
40		F 11	G → A		
	CTX-M-9			AF174129	<i>Escherichia coli</i>
	CTX-M-13			AF252623	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
45	CTX-M-14			AF252622	<i>Escherichia coli</i>
	CTX-M-16			AY029068	<i>Escherichia coli</i>
	CTX-M-17			AY033516	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	CTX-M-18			AF325133	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
50	CTX-M-19			AF325134	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	CTX-M-21	B 12	G → A	AJ416346	<i>Escherichia coli</i>
	CTX-M-24			AY143430	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
55	CTX-M-27			AY156923	<i>Escherichia coli</i>
	CTX-M-38			AY822595	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	CTX-M-45			D89862	<i>Escherichia coli</i>

	CTX-M-46	F 16	G → A	AY847147	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	CTX-M-47			AY847143	<i>Escherichia coli</i>
	CTX-M-48	F 16	G → A	AY847144	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	CTX-M-49			AY847145	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	CTX-M-50			AY847146	<i>Klebsiella pneumonia</i>
	CTX-M-51			DQ211987	<i>Escherichia coli</i>
	CTX-M-65			EF418608	<i>Escherichia coli</i>
				EF394372	<i>Citrobacter freundii</i>
	CTX-M-67			EF581888	<i>Escherichia coli</i>
	CTX-M-81			EU136031	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

20 Especímenes y Muestras

Las modalidades descritas en la presente descripción pueden usarse para detectar y/o identificar ESBL en un espécimen. Como se usa en la presente descripción, el término "especimen" puede referirse a un espécimen clínico o muestra de uno o cualquier número de fuentes, que incluyen, pero sin limitarse a, fluidos corporales (que incluyen, pero sin limitarse a, sangre, orina, suero, linfa, saliva, secreciones anales y vaginales, transpiración, fluido peritoneal, fluido pleural, efusiones, ascitis, y secreciones purulentas, fluidos de lavado, fluidos drenados, especímenes de citología por cepillado, tejido de biopsia, dispositivos médicos explantados, catéteres infectados, pus, biopelículas y semen) de prácticamente cualquier organismo, con muestras de mamíferos, particularmente muestras de humanos, y muestras medioambientales (que incluyen, pero sin limitarse a, muestras de aire, agrícola, agua y suelo) que encuentran uso en la invención. Adicionalmente, las muestras pueden ser tomadas de procesamiento de alimentos, que puede incluir tanto muestras de entrada (por ejemplo, granos, leche o cadáveres de animales), muestras en etapas intermedias de procesamiento, así como alimentos terminados listos para el consumidor. En algunas modalidades, los métodos y ensayos descritos en la presente descripción pueden realizarse directamente en una muestra o espécimen clínico, sin manipulación adicional del espécimen. En algunas modalidades, el espécimen se manipula, por ejemplo, se cultiva, procesa para extraer ácidos nucleicos, o purifica, expande, o de otro modo se manipula.

Cebadores y sondas

En algunas modalidades, el espécimen o muestra puede ponerse en contacto con un conjunto de cebadores de amplificación. En algunas modalidades, el espécimen o muestra puede ponerse en contacto con una sonda. Como se usa en la presente descripción, los términos "cebador" y "sonda" incluyen, pero sin limitarse a oligonucleótidos o ácidos nucleicos. Los términos "cebador" y "sonda" abarcan moléculas que son análogos de nucleótidos, así como nucleótidos. Los nucleótidos y polinucleótidos, como se usa en la presente serán genéricos para polideoxirribonucleótidos (que contienen 2-deoxi-D-ribosa), para polirribonucleótidos (que contienen D-ribosa), para cualquier otro tipo de polinucleótido que sea un N- o C-glicósido de una base de purina o de pirimidina, y para otros polímeros que contienen cadenas principales no nucleotídicas, por ejemplo, poliamida (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos (PNAS)) y polimorfolino (disponibles comercialmente de Anti-Virals, Inc., Corvallis, Oreg., como polímeros NEUGENE™), y otros polímeros sintéticos de ácidos nucleicos específicos de secuencia siempre que los polímeros contengan nucleobases en una configuración que permite el apareamiento de bases y el apilamiento de bases, tal como se encuentra en el ADN y ARN.

En algunas modalidades, los "cebadores" o "sondas" descritos en la presente descripción pueden contener ácidos nucleicos cerrados (LNA). Los "ácidos nucleicos cerrados" (LNAs) son ribonucleótidos que contienen un puente metileno que une el oxígeno 2' de la ribosa con el carbono 4' (ver FIG. 27). Braasch D. A. y Corey, D. R. (2001), Locked nucleic acids (LNA); fine-tuning the recognition of DNA and RNA. Chem. Biol. 8, 1-7, proporcionan una panorámica general de los LNAs. LNAs están disponibles comercialmente, por ejemplo, de la compañía Prolog, Boulder, Colo., Estados Unidos. Los fosforotioatos también son conocidos por los expertos en la técnica y se pueden encargar, por ejemplo, de MWG-Biotech AG, Ebersberg, Alemania. En consecuencia, en algunas modalidades, los "cebadores" o "sondas" descritos en la presente descripción pueden incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más LNAs.

Los términos nucleótido y polinucleótido incluyen, por ejemplo, 3'-deoxi--2',5'-ADN, fosforamidatos N3'→P5' de oligodeoxirribonucleótidos, ARN 2'-O-alkilsustituido, ADN de doble o simple cadena, así como también ARN de doble y simple cadena, híbridos ADN:ARN, e híbridos entre PNAs y ADN o ARN. Los términos también incluyen tipos conocidos

de modificaciones, por ejemplo, marcadores que son conocidos en la técnica, "caperuzas," sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleótidos tales como, por ejemplo, aquellos con enlaces no cargados (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.), con enlaces cargados negativamente (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), y con enlaces cargados positivamente (por ejemplo, aminoalquilfosforamidatos, aminoalquilfosfotriésteres, etc.), aquellos que contienen porciones colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (que incluyen nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L- lisina, etc.), aquellos con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellas que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidantes, etc.), aquellos que contienen alquilantes, aquellos con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), así como formas sin modificar del polinucleótido u oligonucleótido.

Se apreciará que, como se usa en la presente descripción, los términos "nucleósido" y "nucleótido" incluirán aquellas porciones que contienen no sólo las bases conocidas purina y pirimidina, sino también otras bases heterocíclicas que han sido modificadas. Tales modificaciones incluyen purinas o pirimidinas metiladas, purinas o pirimidinas aciladas, u otros heterociclos. Los nucleósidos o nucleótidos modificados incluirán además modificaciones en la porción de azúcar, por ejemplo, en donde uno o más de los grupos hidroxilo se sustituyen con un halógeno, un grupo alifático, o están funcionalizados como éteres, aminas, o similares. Otras modificaciones a nucleótidos o polinucleótidos implican reconfigurar, adjuntar, sustituir, o de cualquier otra forma alterar grupos funcionales en la base de purina o pirimidina que forman enlaces de hidrógeno con una respectiva pirimidina o purina complementaria. El nucleótido o polinucleótido modificado resultante puede formar un par de bases con otras tales unidades nucleotídicas modificadas, pero no con A, T, C, G o U. Por ejemplo, guanosina (2- amino-6-oxi-9- beta-D-ribofuranosil-purina) puede modificarse para formar isoguanosina (2-oxi-6-amino-9-beta-D-ribofuranosil-purina). Tal modificación resulta en una base de nucleósido que ya no formará efectivamente un par de bases estándar con citosina. Sin embargo, la modificación de citosina (1-beta-D-ribofuranosil-2-oxi-4-amino-pirimidina) para formar isocitosina (1-β-D-ribofuranosil-2-amino-4-oxi-pirimidina) resulta en un nucleótido modificado que no se aparea efectivamente con guanosina sino que formará un par de bases con isoguanosina. La isocitosina está disponible de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.); la isocitidina se puede preparar por el método descrito por Switzer y otros (1993) *Biochemistry* 32:10489-10496y las referencias citadas en el mismo; 2'-deoxi-5-metil-isocitidina puede prepararse mediante el método de Tor y otros (1993) *J. Am. Chem. Soc.* 115:4461-4467 y referencias citadas en el mismo; y nucleótidos isoguanina pueden prepararse usando el método descrito por Switzer y otros (1993), supra, y Mantsch y otros (1993) *Biochem.* 14:5593-5601, o por el método descrito Patente de Estados Unidos núm. 5,780,610 otorgada a Collins y otros The non-natural base pairs referred to as κ and π ., puede ser sintetizada por el método descrito en Piccirilli y otros (1990) *Nature* 343:33-37 para la síntesis de 2,6-diaminopirimidina y su complemento (1-metilpirazolo[4,3]-pirimidina-5,7-(4H,6H)-diona. Otras unidades nucleotídicas modificadas tales que forman pares de bases únicos se han descrito en Leach y otros (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114:3675-3683 y Switzer y otros, supra, o serán evidentes para los expertos en la técnica.

Preferentemente, el conjunto de cebadores de amplificación comprende al menos uno, dos, tres, o cuatro, o más cebadores y/o sondas que contienen una base universal. Como se usa en la presente descripción, el término "base universal" se refiere a un análogo de nucleótido que puede hibridarse con más de un nucleótido seleccionado entre A, T, C, y G. En algunas modalidades, la base universal puede ser seleccionada del grupo que consiste en deoxiinosina, 3-ntiropirrol, 4-nitroindol, 6-nitroindol, 5-nitroindol. Preferentemente, la base universal es desoxiinosina. En algunas modalidades, el conjunto de cebadores de amplificación, y sondas descritos en la presente descripción incluyen al menos un cebador y/o sonda que tiene uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, o más bases universales.

Los cebadores y/o sondas son preferentemente de entre 10 y 45 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, los cebadores y/o sondas pueden ser al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, o más nucleótidos de longitud. Los cebadores y/o sondas se pueden proporcionar en cualquier forma adecuada, incluidos unidos a un soporte sólido, líquido, y liofilizado, por ejemplo. En algunas modalidades, los cebadores y/o sondas incluyen oligonucleótidos que hibridan con una secuencia de ácido nucleico diana a lo largo de la longitud completa de la secuencia de oligonucleótidos. Tales secuencias pueden ser referidas como "totalmente complementaria" con respecto a la otra. Cuando se haga referencia a un oligonucleótido como "sustancialmente complementario" con respecto a una secuencia de ácido nucleico en la presente descripción, las dos secuencias pueden ser totalmente complementarias, o pueden formar apareamientos erróneos tras la hibridación, pero conservan la capacidad de hibridarse en condiciones rigurosas o condiciones estándar de PCR como se discute a continuación. Como se usa en la presente descripción, el término "condiciones PCR estándar" incluyen, por ejemplo, cualquiera de las condiciones PCR descritas en la presente descripción, o conocidas en la técnica, como se describe en, por ejemplo, PCR 1: A Practical Approach, M. J. McPherson, P. Quirke, y G. R. Taylor, Ed., (c) 2001, Oxford University Press, Oxford, Engl, y PCR Protocols: Current Methods and Applications, B. White, Ed., (c) 1993, Humana Press, Totowa, NJ.

Como se usa en la presente descripción, el término "sustancialmente complementario" se refiere a la complementariedad entre dos ácidos nucleicos, por ejemplo, la región complementaria de la sonda de captura y la

secuencia diana, y/o entre la secuencia conectora de la sonda de captura y la región complementaria del ácido nucleico competidor. La complementariedad no necesita ser perfecta; puede haber cualquier número de apareamientos erróneos de pares de bases que entre los dos ácidos nucleicos. Sin embargo, si el número de mutaciones es tan grande que no puede ocurrir la hibridación incluso bajo las condiciones de hibridación menos estrictas, la secuencia no es una secuencia sustancialmente complementaria. Cuando dos secuencias se refieren como "sustancialmente complementarias" en la presente descripción, se entiende que las secuencias son suficientemente complementarias una a la otra para hibridar bajo las condiciones de reacción seleccionadas. La relación de complementariedad de ácido nucleico y la rigurosidad de la hibridación suficientes para lograr especificidad es bien conocido en la técnica y se describe más adelante en referencia a la identidad de secuencia, temperatura de fusión y las condiciones de hibridación. Por lo tanto, las secuencias sustancialmente complementarias pueden ser usadas en cualquiera de los métodos de detección descritos en la presente descripción. Tales sondas pueden ser, por ejemplo, perfectamente complementarias o pueden contener de 1 a muchos apareamientos erróneos siempre que las condiciones de hibridación sean suficientes para permitir, por ejemplo discriminación entre una secuencia diana y una secuencia no diana. Por consiguiente, las secuencias sustancialmente complementarias pueden referirse a secuencias que varían en el porcentaje de identidad de 100, 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 85, 80, 75 o menos, o cualquier número en el medio, en comparación con la secuencia de referencia.

Las "condiciones rigurosas" o "condiciones de alta rigurosidad", como se define en la presente descripción, se pueden identificar por aquellas que: (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura de lavado, por ejemplo cloruro de sodio 0.015 M/citrato de sodio 0.0015 M/ 0.1% de dodecilsulfato de sodio a 50°C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturalizante, tal como formamida, por ejemplo, 50% (v/v) de formamida con 0.1% de albúmina de suero bovino/0.1% Ficoll/ 0.1% de polivinilpirrolidona/tampón de fosfato de sodio 50 mM a pH 6.5 con cloruro de sodio 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42°C; o (3) emplean 50% de formamida, 5 x SSC (NaCl 0.75 M, citrato de sodio 0.075 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6.8), 0.1% de pirofosfato de sodio, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonificado (50µg/ml), 0.1% de SDS, y 10% de sulfato de dextrano a 42°C, con lavados a 42°C en 0.2 x SSC (cloruro de sodio/citrato de sodio) y 50% de formamida a 55°C, seguido por un lavado de alta rigurosidad que consiste en 0.1 x SSC que contiene EDTA a 55°C.

Las "condiciones moderadamente rigurosas" pueden identificarse como se describe por Sambrook y otros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen el uso de solución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos rigurosas que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente rigurosas es la incubación durante la noche a 37°C en una solución que comprende: formamida al 20%, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7.6), 5 x solución de Denhardt, 10% de sulfato de dextrano, y 20 mg/ml de ADN desnaturalizado de esperma de salmón, seguido por lavado de los filtros en 1 x SSC a aproximadamente 37-50°C. El experto en la técnica reconocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc., según sea necesario para acomodar factores tales como longitud de la sonda y similares.

40 Pares Cebadores

En algunas modalidades, el conjunto de cebadores de amplificación incluyen uno o más, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o más pares de cebadores. Como se usa en la presente descripción, el término "par de cebadores" puede referirse a dos cebadores que hibridan de forma individual a las cadenas opuestas de un ácido nucleico diana, *por ejemplo*, un ácido nucleico que codifica ESBL, *por ejemplo*, un gen CTX-M o fragmento de este, o similar, en donde cada cebador puede extenderse en su extremo 3' para formar un producto de amplificación diana, *por ejemplo*, en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los pares cebadores pueden incluir cebadores directos e inversos.

En algunas modalidades, las composiciones y métodos descritos en la presente descripción incluyen un par de cebadores que comprenden al menos un conjunto de cebadores de amplificación que hibridan con un gen CTX-M. Por ejemplo, las composiciones y métodos descritos en la presente descripción pueden usarse para detectar y/o identificar beta-lactamasas CTX-M de una bacteria enumerada en la **Tabla 1**. En algunas modalidades, las composiciones y métodos incluyen una pluralidad de cebadores de amplificación, que en conjunto permiten la detección e identificación de beta lactamasas CTX-M de todas las bacterias enumeradas en la **Tabla 1**. En algunas modalidades, las composiciones y métodos descritos en la presente descripción incluyen pares de cebadores que hibridan conjuntamente con y amplifican los ácidos nucleicos de ácidos nucleicos CTX-M de al menos dos grupos CTX-M seleccionados de CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25. Los cebadores útiles para la detección e identificación de CTX-M-1 incluyen, *por ejemplo*, los oligonucleótidos que tienen al menos 10 nucleótidos consecutivos de las sec. con núms. de ident.; 1, 2, 5, 11, 12, 13, 14, 32, y 33 o las complementarias de estas, o que son sustancialmente complementarias a, y/o se hibridan en condiciones rigurosas con las sec. con núms. de ident.; 1, 2, 5, 11, 12, 13, 14, 32, y 33, o las complementarias de estas.

Los cebadores útiles para la detección e identificación de CTX-M-2 incluyen oligonucleótidos que tienen al menos 10

ácidos nucleicos consecutivos de las sec. con núms. de ident.; 3, 4, 5, 15, 16, 17 18, 32 y 33, o las complementarias de estas, o que son sustancialmente complementarias a, y/o se hibridan en condiciones rigurosas con las sec. con núms. de ident.; 3, 4, 5, 15, 16, 17 18, 32 y 33, o las complementarias de estas. Los cebadores útiles para la detección e identificación de CTX-M-8 incluyen oligonucleótidos que tienen al menos 10 ácidos nucleicos consecutivos de las sec. con núms. de ident.; 6, 7, 10, 19, 20, 21, 22, 27, 28, y 31, o las complementarias de estas, o que son sustancialmente complementarias a, y/o se hibridan en condiciones rigurosas con las sec. con núms. de ident.; 3, 4, 5, 15, 16, 17 18, 32 y 33, o las complementarias de estas. Los cebadores útiles para la detección e identificación de CTX-M-9 incluyen oligonucleótidos que tienen al menos 10 ácidos nucleicos consecutivos de las sec. con núms. de ident.; 8, 9, 10, 23, 24, 25, 26, 29, 30, y 31, o las complementarias de estas, o que son sustancialmente complementarias a, y/o se hibridan en condiciones rigurosas con las sec. con núms. de ident.; 8, 9, 10, 23, 24, 25, 26, 29, 30, y 31, o las complementarias de estas. El experto en la materia apreciará que algunas modalidades incluyen cualquier combinación de los pares de cebadores descritos en la presente descripción, por ejemplo, cualquier combinación de pares de cebadores de las sec. con núms. de ident.; 1 y 2, sec. con núms. de ident.; 3 y 4, sec. con núms. de ident.; 6 y 7, sec. con núms. de ident.; 8 y 9, sec. con núms. de ident.; 27 y 28, y sec. con núms. de ident.; 29 y 30. En algunas modalidades, las composiciones y métodos incluyen cebadores y sondas que consisten en, que consisten esencialmente en, o que comprenden sec. con núms. de ident.; 1-10, o que tienen al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, o más, nucleótidos consecutivos de las sec. con núms. de ident.; 1-10, o que son sustancialmente complementarias a, y se hibridan en condiciones rigurosas con las sec. con núms. de ident.; 1-10 o la complementaria de estas. En algunas modalidades, las composiciones y métodos incluyen cebadores y sondas que consisten en, que consisten esencialmente en, o que comprenden las sec. con núms. de ident.; 1-5 y 27-31, o que tienen al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, o más, nucleótidos consecutivos de las sec. con núms. de ident.; 1-5 y 27-31, o que son sustancialmente complementarias a, y se hibridan en condiciones rigurosas con las sec. con núms. de ident.; 1-5 y 27-31 o la complementaria de estas.

En algunas modalidades, las composiciones y métodos incluyen cebadores y/o sondas para la detección y/o identificación de secuencias adicionales, que incluyen, por ejemplo, para la detección de un gen de carbapenemasa, por ejemplo, como se describe en la Publicación PCT núm. WO 08/124670. En algunas modalidades, las composiciones y métodos descritos en la presente descripción incluyen cebadores que tienen al menos diez nucleótidos consecutivos de las sec. con núms. de ident.; 34 y 35, o las complementarias de estas, en algunas modalidades, las composiciones y métodos descritos en la presente descripción incluyen cebadores que tienen al menos diez nucleótidos consecutivos de las sec. con núms. de ident.; 37 y 38, o las complementarias de estas. En algunas modalidades, las composiciones y métodos descritos en la presente descripción incluyen cebadores que son sustancialmente complementarios a, y/o que se hibridan en condiciones rigurosas con las secuencias de sec. con núms. de ident.; 34 y 35 o las complementarias de estas. En algunas modalidades, las composiciones y métodos descritos en la presente descripción incluyen cebadores que son sustancialmente complementarios a, y/o que se hibridan en condiciones rigurosas con las secuencias de sec. con núms. de ident.; 37 y 38 o las complementarias de estas.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, las composiciones y/o métodos pueden incluir uno o más cebadores, en donde los cebadores incluyen al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, o más ácidos nucleicos consecutivos de las secuencias de secs. con núm. de ident.:1-22, o las complementarias de estas.

TABLA 2: CEBADORES/SONDAS

sec. con núm. de ident.:	Nombre del iniciador	Secuencia.
1	ctxm1-616F	CYGCTTCCTGGGTGTGG
2	ctxm1-740R	TTGRGGCTGGGTGAAGTAAG
3	ctxm2-609F	GGTMTGCCGAAATSWTGG
4	ctxm2-776R	CGCAGCCAGAAHATCCCGAC
5	ctxm1/2-657B	ccagcgTATGGYACCACCAACGATATCGCGGcgctgg
6	ctxm8-7F	TGTRTGCSCAGGCGAACG
7	ctxm8-119R	GTAGAGCGTCTGTGYGTTATCG
8	ctxm9-7F	TTTATGCGCAGACGAGTG
9	ctxm9-117R	AAAGCACCTGCGTATTATCT
10	ctxm8/9-42B	cgaggcGCGGCGCTGGARAAAAGCAGgcctcg

ES 2 545 793 T3

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

11	ctxm1-599F	GYATTCAGGCWGGACTGCC
12	ctxm1-633F	GGGGGATAAAACCGGCAG
13	ctxm1-756R	GCTTTCTGCCTTAGGTTGRG
14	ctxm1-723R	ARTGACCAGAATCAGCGGC
15	ctxm2-590F	TAGCGCGAGCATTCTGGC
16	ctxm2-624F	TGGGKAGTGGGCGATAAA
17	ctxm2-791 R	TACGATTTTCGCCGCCGAG
18	ctxm2-759R	GACGGYTTTCCGCCTTCT
19	ctxm8-1F	YGCCGCTGTRTGCSCAGGC
20	ctxm8-22F	ACGAYGTTTCARCAAAAGC
21	ctxm8-131R	CTCRTCGGCGCGGTAGAGC
22	ctxm8-102R	TATCGGCGGTGTAAATCARCG
23	ctxm9-1F	CRMCGCTTTATGCGCAGAC
24	ctxm9-21F	ARTGCGGKGCCARCAAAAG
25	ctxm9-102R	TATCTKYGGTATCGATGAGC
26	ctxm9-132R	GTTTCATCACCGCGATAAAGC
27	ctxm8-146F	CAGCACCAGTAARGTGATG
28	ctxm8-256R	TTGTAGTTAAYCARGTCYGARG
29	ctxm9-122F	CGGTGATGAACGCTTTCC
30	ctxm9-242R	ATCGGCAGGCTTGATCTC
31	ctxm8/9-183B	cggcgatAAGCARAGTGAAACGCAAAAGatcgccg
32	ctxm1/2-664T-LNA	cCaCcaAcgaTatcgCg
33	ctxm1/2-659T	TGGYACCACCAACGATATCGCGGT
34	KPC-2F	AACTGACACTGGGCTCTG
35	KPC-2R	ATACMCTCCGCAGGTTCC
36	KPC-2B	cgcgatcACACGACCGGCAACCACCGCAgatcgcg
37	KPC-3F	GATRGATAACCGGCTCAGG
38	KPC-3R	GTAACGGATGGGTGTGTC
39	KPC-3B	cgcgatcGCTGCCGCTGTGCTGGCTCGgatcgcg
40	CTXMI-F3	GACGATGTCACTGGCTGAGC
41	CTXM1-R2	AGCCGCCGACGCTAATACA
42	TOHO1-2F	GCGACCTGGTTAACTACAATCC
43	THOH1-1R	CGGTAGTATTGCCCTTAAGCC
44	CTXM825F	CGCTTTGCCATGTGCAGCACC
45	CTXM825R	GCTCAGTACGATCGAGCC
46	CTXM914F	GCTGGAGAAAAGCAGCGGAG
47	CTXM914R	GTAAGCTGACGCAACGTCTG

Sondas

En algunas modalidades, la sonda puede incluir un marcador detectable. Los marcadores de interés incluyen marcadores radiactivos o no radiactivos directamente detectables e indirectamente detectables tales como colorantes fluorescentes. Los marcadores directamente detectables son esos marcadores que proporcionan una señal detectable directamente sin interacción con uno o más agentes químicos. Ejemplos de marcadores directamente detectables incluyen marcadores fluorescentes. Los marcadores indirectamente detectables son esos marcadores que interactúan con uno o más miembros para proporcionar una señal detectable. En esta última modalidad, el marcador es un miembro de un sistema productor de señal que incluye dos o más agentes químicos que trabajan juntos para proporcionar la señal detectable. . Ejemplos de marcadores indirectamente detectables incluyen biotina o digoxigenina, que pueden ser detectados por un anticuerpo apropiado acoplado a un fluorocromo o una enzima, tal como fosfatasa alcalina. En muchas modalidades preferidas, el marcador es un marcador directamente detectable. Los marcadores directamente detectables de interés particular incluyen marcadores fluorescentes. Los marcadores fluorescentes que encuentran uso en las modalidades descritas en la presente descripción incluyen una porción de fluoróforo. Los colorantes fluorescentes específicos de interés incluyen: colorantes de xanteno, por ejemplo, colorantes de fluoresceína y rodamina, tales como isotiocianato de fluoresceína (FITC), monoclóhidrato de 2-[etilamino)-3-(etilimino)-2-7-dimetil-3H-xanten-9-il]ácido benzoico etil éster (R6G)(emite una radiación respuesta en la longitud de onda que varía desde aproximadamente 500 a 560 nm), yoduro de 1,1,3,3',3'-Hexametilindodicarbocianina (HIDC) (emite una radiación respuesta en la longitud de onda que varía desde aproximadamente 600 a 660 nm), 6-carboxifluoresceína (comúnmente conocido por las abreviaturas FAM y F), 6-carboxi-2',4',7',4,7-hexaclorofluoresceína (HEX), 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína (JOE o J), N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA o T), 6-carboxi-X-rodamina (ROX o R), 5-carboxirodamina-6G (R6G5 o G5), 6-carboxirodamina-6G (R6G6 o G6), y rodamina 110; colorantes de cianina, por ejemplo Cy3, Cy5 y Cy7; cumarinas, por ejemplo, umbeliferona; colorantes bencimida, por ejemplo, Hoechst 33258; colorantes de fenantridina, por ejemplo, Texas Red; colorantes de etidio; colorantes de acridina; colorantes de carbazol; colorantes de fenoxazina; colorantes de porfirina; colorantes de polimetina, por ejemplo, colorantes de cianina tales como Cy3 (emite una radiación respuesta en la longitud de onda que varía desde aproximadamente 540 a 580 nm), Cy5 (emite una radiación respuesta en la longitud de onda que varía desde aproximadamente 640 a 680 nm), etc; colorantes BODIPY y colorantes de quinolina. Los fluoróforos específicos de interés incluyen: pireno, cumarina, dietilaminocumarina, FAM, clorotriazinil fluoresceína, fluoresceína, R110, eosina, JOE, R6G, HIDC, tetrametilrodamina, TAMRA, Lissamina, ROX, Naftofluoresceína, Texas Red, Naftofluoresceína, verde SYBR, Cy3, y Cy5, y similares.

En modalidades preferidas, las composiciones y métodos descritos en este documento incluyen una sonda de baliza molecular, una sonda TAQMAN™, o una sonda SCORPION™. Por ejemplo, en algunas modalidades, las composiciones y métodos descritos en la presente descripción incluyen una o más sondas de baliza molecular, en donde las sondas comprenden la secuencia de secs. con núm. de ident.:5, 10, 31, 32, ó 33, *por ejemplo*, una sonda como se muestra en una cualquiera de las secs. con núm. de ident.:25, 26, 27, 28, 32, y/o 33:

```
ccagcgTATGGYACCACCAACGATATCGCGGcgctgg (sec. con núm. de ident.:5)
cgaggcGCGGCGCTGGARAAAAGCAGgcctcg (sec. con núm. de ident.:10)
cgcgatcACACGACCGGCAACCACCGCAgatcgcg (sec. con núm. de ident.:36)
cgcgatcGCTGCCGCTGTGCTGGCTCGgatcgcg (sec. con núm. de ident.:39)
cggcgatAAGCARAGTGAAACGCAAAAGatcgccg (sec. con núm. de ident.:31)
cCaCcaAcgaTatcgCg (sec. con núm. de ident.:32)
TGGYACCACCAACGATATCGCGGT (sec. con núm. de ident.:33)
```

En algunas modalidades, las sondas, por ejemplo las sec. con núms. de ident.: 25-28 y 32-33, se marcan mediante el uso de una molécula silenciadora de fluoróforo FAM y un silenciador de DABCYL . En algunas modalidades, las sondas son sondas TAQMAN™, sondas de baliza molecular, o sondas SCORPION™. En algunas modalidades, el uno o más de los cebadores de amplificación pueden ser marcados, por ejemplo, con una porción fluorescente, tal como verde SYBR, o similares.

Las secuencias de cebadores y sondas descritos en la presente descripción pueden ser modificadas para incluir nucleótidos adicionales en el extremo 5' o 3' terminal. Del mismo modo, en algunas modalidades, las secuencias de cebadores y sondas pueden ser modificadas para tener nucleótidos sustituidos dentro de la secuencia. Se reconoce que las secuencias de cebadores y sondas deben contener suficiente complementariedad para hibridar específicamente con la secuencia de ácido nucleico diana respectiva. De esta manera, al menos 1, 2, 3, 4, o hasta aproximadamente 5 nucleótidos pueden ser sustituidos.

Las sec. con núms. de ident. 32 y 33 son las dos específicas para los grupos 1 y 2 de CTX-M En algunas modalidades, la sonda de sec. con núm. de ident. 32 puede contener cinco ácidos nucleicos cerrados (LNA). En algunas modalidades, la sec. con núm. de ident.:33 es una sonda TAQMAN™. En algunas modalidades, la sec. con núm. de ident. 33 contiene una o más bases redundantes, y específicamente hibrida (por ejemplo, en condiciones de hibridación rigurosas y/o condiciones estándar de PCR) tanto con CTX-M 1 como con CTX-M 2.

Los métodos de síntesis química que pueden ser usados para hacer los cebadores de las modalidades descritas en la presente descripción, incluyen, pero sin limitarse a, el método del fosfotriéster descrito por Narang y otros (1979) Methods in Enzymology 68:90, el método del fosfodiéster descrito por Brown y otros (1979) Methods in Enzymology 68:109, el método del dietilfosforamidato descrito por Beaucage y otros (1981) Tetrahedron Letters 22:1859, y el método de soporte sólido descrito en la patente de los Estados Unidos núm. 4,458,066.

Se contempla además el uso de un sintetizador automático de oligonucleótidos para preparar cebadores de oligonucleótidos sintéticos de las modalidades descritas en la presente descripción.

Hibridación y Unión Específica

En algunas modalidades, la unión o apareamiento de los cebadores y/o sondas a secuencias diana de ácidos nucleicos se lleva a cabo a través de la hibridación. Un experto en la técnica apreciará que la hibridación específica se logra mediante la selección de secuencias que son al menos sustancialmente complementarias a la diana o a la secuencia de referencia de ácido nucleico. Esto incluye el apareamiento de bases de la secuencia de oligonucleótidos del ácido nucleico diana por toda la longitud de la secuencia de oligonucleótidos. Tales secuencias pueden ser referidas como "totalmente complementaria" con respecto a la otra. Cuando se haga referencia a un oligonucleótido como "sustancialmente complementario" con respecto a una secuencia de ácido nucleico en la presente descripción, las dos secuencias pueden ser totalmente complementarias, o pueden formar apareamientos erróneos tras la hibridación, pero conservan la capacidad de hibridarse en condiciones rigurosas o condiciones estándar de PCR como se discute más abajo.

En algunas modalidades, la muestra o espécimen se pone en contacto con un conjunto de cebadores de amplificación y una sonda. Preferentemente, los cebadores de amplificación y sondas hibridan con ácidos nucleicos diana bajo un solo conjunto de condiciones, es decir, condiciones rigurosas, que incluyen condiciones estándar de PCR discutidas a continuación. Como se usa en la presente descripción, el término "condiciones rigurosas" condiciones rigurosas de hibridación pueden variar (por ejemplo a partir de las concentraciones de sal de menos de aproximadamente 1 M, más usualmente menos de aproximadamente 500 mM y preferentemente menos de aproximadamente 200 mM) y las temperaturas de hibridación pueden variar (por ejemplo, desde tan bajas como 0°C hasta mayores que 22°C, mayor que aproximadamente 30°C y (más frecuentemente) en exceso de aproximadamente 37°C en dependencia de las longitudes y/o la composición de ácido nucleico de las sondas. Los fragmentos más largos pueden requerir temperaturas de hibridación mayores para la hibridación específica. Como varios factores afectan la rigurosidad de la hibridación, la combinación de parámetros es más importante que la medida absoluta de un solo factor. Por consiguiente, a modo de ejemplo, el término "condiciones de hibridación rigurosas" puede referirse a cualquiera o ambos de lo siguiente: a) 6 x SSC a aproximadamente 45°C, seguido de uno o más lavados en 0.2 x SSC, 0.1% SDS a 65°C, y b) NaCl 400 mM, PIPES 40 mM pH 6.4, EDTA 1 mM, 50°C o 70°C durante 12-16 horas, seguido de lavado. En algunas modalidades, el término "condiciones rigurosas" puede referirse a condiciones estándar de PCR.

En algunas modalidades, la muestra o espécimen se pone en contacto con un conjunto de cebadores de amplificación en condiciones estándar de PCR. Para una revisión de la tecnología de PCR, que incluyen condiciones estándar de PCR, aplicada a la microbiología clínica, ver DNA Methods in Clinical Microbiology, Singleton P., publicado por Dordrecht; Boston: Kluwer Academic, (2000) Molecular Cloning to Genetic Engineering White, B.A. Ed. en Methods in Molecular Biology 67: Humana Press, Totowa (1997) y "PCR Methods and Applications", from 1991 to 1995 (Cold Spring Harbor Laboratory Press). Los ejemplos no limitantes de "condiciones de PCR" incluyen las condiciones descritas en las referencias citadas en la presente descripción, tales como, por ejemplo, KCl 50 mM, Tris-HCl (pH 9.0) 10 mM, 0.1% de Triton X-100, MgCl₂ 2.5 mM, con una temperatura de hibridación de 72°C; o 4mM MgCl₂, Tris 100mM, pH 8.3, KCl 10mM, (NH₄)₂SO₄ 5mM, 0.15mg de BSA, 4% de trehalosa, con una temperatura de hibridación de 59°C, o KCl 50 mM, Tris-HCl (pH 9.0) 10 mM, 0.1% de Triton X-100, MgCl₂ 2.5 mM, con una temperatura de hibridación de 55°C, o similar.

En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente descripción comprenden una PCR, por ejemplo, QPCR, basado en el método de amplificación y detección de ESB, tales como ácidos nucleicos CTX-M, mediante el uso de los cebadores y sondas descritos en la presente descripción. En varias modalidades, los métodos descritos en la presente descripción son capaces de detectar la presencia de ESB, tales como CTX-Ms a una concentración de bacterias que está dentro de los intervalos fisiológicos (es decir, la concentración de bacterias en una muestra obtenida de un sujeto infectado con las bacterias). Así, una muestra se puede seleccionar directamente sin la necesidad de aislar, concentrar, o expandir (por ejemplo, cultivar) la población bacteriana con el fin de detectar la presencia de una ESB, por ejemplo, una CTX-M. En varias modalidades, los métodos descritos en la presente descripción son capaces de detectar la presencia de un ESB a partir de una muestra que tiene una concentración de bacterias de aproximadamente 1x 10³ CFU/ml, aproximadamente 1 x 10⁴ CFU/ml, aproximadamente 1x 10⁵ CFU/ml, o aproximadamente 1x 10⁶ CFU/ml.

Numerosos protocolos diferentes de PCR o QPCR se conocen en la técnica y se ejemplifican en la presente descripción

más abajo y se pueden aplicar directamente o adaptarse para usar con el empleo de las composiciones actualmente descritas para la detección de ESB, que incluyen CTX-Ms en una muestra.

Generalmente, en la PCR, una secuencia de polinucleótido diana se amplifica por reacción con al menos un cebador de oligonucleótido o un par de cebadores de oligonucleótidos. El cebador (es) se hibridan con una región complementaria del ácido nucleico diana y una ADN polimerasa extiende el cebador (es) para amplificar la secuencia diana. En condiciones suficientes para proporcionar productos de amplificación de ácido nucleico basado en la polimerasa, un fragmento de ácido nucleico de un tamaño domina los productos de reacción (la secuencia de polinucleótido diana que es el producto de amplificación). El ciclo de amplificación se repite para aumentar la concentración de la secuencia única del polinucleótido diana. La reacción se puede realizar en cualquier termociclador usado comúnmente para PCR. Sin embargo, se prefieren los cicladores con capacidades de medición de fluorescencia en tiempo real, por ejemplo, SMARTCYCLER® (Cepheid, Sunnyvale, CA), ABI PRISM 7700® (Applied Biosystems, Foster City, CA), ROTOR-GENE™; (Corbett Research, Sydney, Australia), LIGHTCYCLER® (Roche Diagnostics Corp, Indianapolis, IN), ICYCLER® (Biorad Laboratories, Hercules, CA) y MX4000® (Stratagene, La Jolla, CA).

Algunas modalidades proporcionan métodos que incluyen PCR cuantitativa (QPCR) (también conocida como PCR en tiempo real). QPCR puede proporcionar mediciones cuantitativas, y además proporcionar los beneficios de la reducción del tiempo y la contaminación. Como se usa en la presente descripción, "PCR cuantitativa" (o "QPCR de tiempo real") se refiere a la monitorización directa del progreso de una amplificación por PCR mientras está ocurriendo sin la necesidad del muestreo repetido de los productos de reacción. En QPCR, los productos de reacción pueden ser controlados a través de un mecanismo de señalización (por ejemplo, fluorescencia) a medida que se generan y se realiza un seguimiento después que la señal se eleva por encima de un nivel inicial, pero antes que la reacción alcanza una meseta. El número de ciclos requeridos para alcanzar un nivel de fluorescencia detectable o "umbral" (referido en la presente descripción como ciclo umbral o "CT") varía directamente con la concentración de dianas amplificables en el comienzo del proceso de PCR, lo que permite una medida de intensidad de la señal para proporcionar una medida de la cantidad de ácido nucleico diana en una muestra en tiempo real.

En algunas modalidades, una sonda marcada se puede usar para detectar el producto de extensión generado mediante amplificación por PCR. Cualquier formato de sonda que utiliza una sonda marcada que comprende secuencias descritas en la presente descripción se pueden usar, por ejemplo, sondas SCORPION™, sondas sunrise, sondas TAQMAN™, o sonda de baliza molecular como se conoce en la técnica o descritos en otra parte en la presente descripción. En algunas modalidades, las sondas pueden usarse a una concentración de aproximadamente 0.01 µM, 0.02 µM, 0.03 µM, 0.04 µM, 0.05 µM, 0.06 µM, 0.07 µM, 0.08 µM, 0.09 µM, 0.1 µM, 0.11 µM, 0.12 µM, 0.13 µM, 0.14 µM, 0.15 µM, 0.16 µM, 0.17 µM, 0.18 µM, 0.19 µM, 0.2 µM, 0.21 µM, 0.22 µM, 0.23 µM, 0.24 µM, 0.25 µM, 0.26 µM, 0.27 µM, 0.28 µM, 0.29 µM, 0.3 µM, 0.31 µM, 0.32 µM, 0.33 µM, 0.34 µM, 0.35 µM, 0.36 µM, 0.37 µM, 0.38 µM, 0.39 µM, 0.4 µM, 0.42 µM, 0.46 µM, 0.48 µM, 0.5 µM, o más, o cualquier concentración intermedia. En algunas modalidades, la reacción puede incluir aproximadamente 0.1 µM de la sec. con núm. de ident. 32 y/o aproximadamente 0.3 µM de la sec. con núm. de ident. 33.

Los métodos para montar una reacción de PCR son bien conocidos para los expertos en la técnica. La mezcla de reacción comprende mínimamente ácido nucleico molde (excepto en el caso de un control negativo tal como se describe más abajo y cebadores de oligonucleótidos y/o sondas en combinación con tampones adecuados, sales, y similares, y una concentración apropiada de una polimerasa de ácido nucleico. Como se usa en la presente descripción, "polimerasa de ácido nucleico" se refiere a una enzima que cataliza la polimerización de nucleósidos trifosfato. Generalmente, la enzima iniciará la síntesis en el extremo 3' del cebador hibridado a la secuencia diana, y procederá en la dirección 5' a lo largo del molde hasta que la síntesis termina. Una concentración apropiada incluye uno que cataliza esta reacción en los métodos descritos actualmente. Las ADN polimerasas conocidas útiles en los métodos descritos en la presente descripción incluyen, por ejemplo, ADN polimerasa I de E. coli, ADN polimerasa T7, ADN polimerasa de Thermus thermophilus (Tth), ADN polimerasa de Bacillus stearothermophilus, ADN polimerasa de Thermococcus litoralis, ADN polimerasa de Thermus aquaticus (Taq) y ADN polimerasa de Pyrococcus furiosus (Pfu).

Adicionalmente de los componentes anteriores, la mezcla de reacción de los presentes métodos incluye cebadores, sondas, y desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs).

Usualmente la mezcla de reacción comprenderá además cuatro tipos diferentes de dNTPs correspondientes a las cuatro bases de nucleósidos de origen natural, es decir, dATP, dTTP, dCTP, y dGTP. En algunas de las modalidades descritas en la presente descripción, cada dNTP estará presente típicamente en una cantidad que varía de aproximadamente 10 a 5000 µM, usualmente de aproximadamente 20 a 1000 µM, aproximadamente de 100 a 800 µM, o aproximadamente 300 a 600 µM.

La mezcla de reacción preparada en la primera etapa de los métodos de las modalidades descritas en la presente descripción incluye, además, un medio de tampón acuoso que incluye una fuente de iones monovalentes, una fuente de cationes divalentes, y un agente tampón. Cualquier fuente conveniente de iones monovalentes, tales como cloruro de

potasio, acetato de potasio, acetato de amonio, glutamato de potasio, cloruro de amonio, sulfato de amonio, y similares pueden ser empleadas. El catión divalente puede ser magnesio, manganeso, cinc, y similares, donde el catión será típicamente magnesio. Cualquier fuente conveniente de catión magnesio se puede emplear, que incluyen cloruro de magnesio, acetato de magnesio, y similares. La cantidad de magnesio presente en el tampón puede variar de 0.5 a 10 mM, y puede variar de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 mM, o aproximadamente de 3 a aproximadamente 5 mM. Los agentes tampón representativos o sales que pueden estar presentes en el tampón incluyen Tris, Tricina, HEPES, MOPS, y similares, donde la cantidad de agente tampón variará típicamente de aproximadamente 5 a 150 mM, usualmente de aproximadamente 10 a 100 mM, y más usualmente de aproximadamente 20 a 50 mM, donde en ciertas modalidades preferidas el agente tampón estará presente en una cantidad suficiente para proporcionar un pH que varía de aproximadamente 6.0 a 9.5, por ejemplo, un pH de aproximadamente pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, ó 9.5. Otros agentes que pueden estar presentes en el medio tampón incluyen agentes quelantes, tales como EDTA, EGTA, y similares. En algunas modalidades, la mezcla de reacción puede incluir BSA, o similares.

En la preparación de la mezcla de reacción, los varios componentes constituyentes se pueden combinar en cualquier orden conveniente. Por ejemplo, el tampón se puede combinar con el cebador, la polimerasa, y después el ácido nucleico molde, o la totalidad de los varios componentes constituyentes se pueden combinar al mismo tiempo para producir la mezcla de reacción.

Alternativamente, los reactivos mezclados previamente disponibles comercialmente pueden ser utilizados en los métodos descritos en la presente descripción de acuerdo con la instrucciones del fabricante, o modificados para mejorar las condiciones de reacción (por ejemplo, modificación de concentración de tampón, concentración de cationes, o la concentración de dNTP, según sea necesario), que incluyen, por ejemplo, TAQMAN® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), OMNIMIX® o SMARTMIX® (Cepheid), IQ® (Bio-Rad Laboratories), LIGHTCYCLER® FastStart (Roche Applied Science, Indianapolis, IN), o BRILLIANT® QPCR Master Mix (Stratagene, La Jolla, CA).

A continuación de la preparación de la mezcla de reacción, la mezcla de reacción se puede someter a condiciones de reacción de extensión del cebador ("condiciones suficientes para proporcionar productos de amplificación de ácido nucleico basado en la polimerasa"), es decir, condiciones que permiten la extensión del cebador mediada por la polimerasa mediante la adición de nucleótidos al extremo de la molécula de cebador con el uso de la cadena molde como un molde. En muchas modalidades, las condiciones de reacción de extensión del cebador son condiciones de amplificación, que incluyen una pluralidad de ciclos de reacción donde cada ciclo de reacción comprende: (1) una etapa de desnaturalización, (2) una etapa de hibridación, y (3) una etapa de polimerización. El número de ciclos de reacción variará en dependencia de la aplicación que se ejecuta pero usualmente será al menos 15, más usualmente al menos 20, y puede ser tan alto como 60 o superior, donde el número de ciclos diferentes típicamente variará de aproximadamente 20 a 40. Para los métodos donde se realizan más de aproximadamente 25, usualmente más de aproximadamente 30 ciclos, puede ser conveniente o deseable introducir polimerasa adicional en la mezcla de reacción tal que las condiciones adecuadas para la extensión del cebador enzimática se mantengan.

La etapa de desnaturalización comprende calentar la mezcla de reacción a una temperatura elevada y mantener la mezcla a la temperatura elevada durante un período de tiempo suficiente para que cualquier ácido nucleico de doble cadena o hibridado presente en la mezcla de reacción se disocie. Para la desnaturalización, la temperatura de la mezcla de reacción usualmente se elevará, y mantendrá a una temperatura que varía de aproximadamente 85 a 100°C, usualmente de aproximadamente 90 a 98 °C, y más usualmente de aproximadamente 93 a 96 °C, durante un período de tiempo que oscila de aproximadamente 3 a 120 segundos, usualmente de aproximadamente 3 seg.

A continuación de la desnaturalización, la mezcla de reacción se someterá a condiciones suficientes para la hibridación del cebador al ácido nucleico molde presente en la mezcla (si está presente), y para la polimerización de nucleótidos a los extremos del cebador de una manera tal que el cebador se extienda en una dirección 5' a 3' mediante el uso del ácido nucleico al que se hibrida como un molde, es decir, condiciones suficientes para la producción enzimática del producto de extensión del cebador. En esta modalidad, los procesos de hibridación y extensión se producen en la misma etapa. La temperatura a la que la mezcla de reacción se reduce para lograr estas condiciones usualmente se seleccionará para proporcionar una eficiencia óptima y especificidad, y generalmente variará de aproximadamente 50 a 75 °C, usualmente de aproximadamente 55 a 70°C, y más usualmente de aproximadamente 60 a 68 °C, más particularmente alrededor de 60°C. Las condiciones de hibridación se mantendrán por un período de tiempo que varía de aproximadamente 15 seg a 30 min, usualmente de aproximadamente 20 segundos a 5 min, o aproximadamente de 30 segundos a 1 minuto, o aproximadamente de 30 segundos.

Esta etapa puede comprender, opcionalmente, una de cada una de etapa de hibridación y etapa de extensión con la variación y la optimización de la temperatura y la duración de tiempo para cada etapa. En una extensión e hibridación de dos etapas, la etapa de hibridación se deja proseguir como anteriormente. A continuación de la hibridación del cebador con el ácido nucleico molde, la mezcla de reacción se someterá adicionalmente a condiciones suficientes para proporcionar para la polimerización de nucleótidos a los extremos del cebador como anteriormente. Para lograr

condiciones de polimerización, la temperatura de la mezcla de reacción típicamente se elevará a o se mantendrá a una temperatura que varía de aproximadamente 65 a 75°C, usualmente de aproximadamente 67 a 73°C y se mantendrá por un período de tiempo que varía de aproximadamente 15 seg. a 20 min, usualmente de aproximadamente 30 seg a 5 min.

En algunas modalidades, el ciclo puede incluir una desnaturalización inicial de 15 minutos a 95°C, que se realiza sólo una vez, seguido de una etapa de desnaturalización a 95°C durante 1 segundo, y una etapa de hibridación/elongación a 60°C por 25 segundos. Este ciclo de dos etapas se puede repetir varias veces, *por ejemplo*, aproximadamente 45 veces. En algunas modalidades, una etapa de elongación final se puede añadir a 72°C durante 10 minutos.

En algunas modalidades, el ciclo puede incluir una etapa de desnaturalización inicial de 15 minutos a 95°C, es seguida por múltiples ciclos (por ejemplo, aproximadamente 45 ciclos) de: desnaturalización a 95°C durante 1 segundo, hibridación a 60°C durante 9 segundos y elongación a 72°C durante 9 segundos. Una etapa de elongación final se puede adicionar de 72°C durante 10 minutos.

Los ciclos anteriores de desnaturalización, hibridación, y polimerización se pueden realizar mediante el uso de un dispositivo automatizado, típicamente conocido como un ciclador térmico. Los cicladores térmicos que se pueden emplear se describen en otra parte en la presente descripción, así como en las patentes de los Estados Unidos núms. 5,612,473; 5,602,756; 5,538,871; y 5,475,610.

Los métodos descritos en la presente descripción además pueden usarse en aplicaciones no basadas en PCR para detectar una secuencia de ácido nucleico diana, donde tal diana se puede inmovilizar sobre un soporte sólido. Los métodos de inmovilización de una secuencia de ácido nucleico sobre un soporte sólido se conocen en la técnica y se describen en Ausubel y otros, eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology* (Greene Publishing y Wiley-Interscience, NY), y en los protocolos proporcionados por los fabricantes, por ejemplo, para membranas: Pall Corporation, Schleicher & Schuell; para perlas magnéticas: Dynal; para placas de cultivo: Costar, Nalgenunc; para plataformas de arreglos de perlas: Luminex y Becton Dickinson; y, para otros soportes útiles en las modalidades descritas en la presente descripción, CPG, Inc.

El experto en la técnica de amplificación de ácidos nucleicos conoce la existencia de otros procedimientos de amplificación rápidos, tales como la reacción en cadena de la ligasa (LCR), los sistemas de amplificación basados en la transcripción (TAS), la replicación auto-sostenida de secuencia (3SR), amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) y ADN ramificado (bDNA) (Persing y otros (1993) *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications* (American Society for Microbiology, Washington, DC). El alcance de la modalidades descritas en la presente descripción no se limita al uso de la amplificación por PCR, sino que más bien incluye el uso de cualquiera de los métodos rápidos de amplificación de ácidos nucleicos o cualesquiera de otros procedimientos que pueden ser útiles con las secuencias de las modalidades descritas en la presente descripción para la detección y/o cuantificación de gen(es) de resistencia a los antibióticos ESBL (s), *por ejemplo*, genes CTX-M.

Además, las variaciones en las cantidades exactas de los diversos reactivos y en las condiciones para la PCR u otro procedimiento de amplificación adecuado (por ejemplo, condiciones de tampón, los tiempos de ciclo, etc.) que conducen a resultados de amplificación o detección/cuantificación similares se conocen por los expertos en la técnica y se consideran equivalentes. En una modalidad, la detección QPCR en cuestión tiene una sensibilidad de detectar menos de 50 copias (preferentemente menos de 25 copias, más preferentemente menos de 15 copias, aún con mayor preferencia menos de 10 copias) de ácido nucleico diana (es decir, ácidos nucleicos de ESBL, que incluyen genes CTX-M) en una muestra. En una modalidad, se realiza una reacción de PCR de arranque en caliente (por ejemplo, mediante el uso de una ADN Taq polimerasa de arranque en caliente) con el fin de mejorar la reacción de PCR por disminución de fondo de la amplificación no específica y para aumentar la amplificación del producto de extensión deseado.

Controles

En algunas modalidades, las reacciones de PCR o QPCR descritas en la presente descripción pueden contener varios controles. Tales controles pueden incluir un control negativo "sin molde", en el que los cebadores, tampón, enzima(s) y otros reactivos necesarios (por ejemplo, cloruro de magnesio, nucleótidos) se someten al ciclo en ausencia de muestra de ensayo añadida. Un control positivo que incluye un ácido nucleico diana conocido también se puede ejecutar en paralelo. En algunas modalidades, tanto un control positivo como un control negativo pueden ser incluidos en la reacción de amplificación. Una sola reacción puede contener un control positivo, un control negativo, o un molde de muestra, o una sola reacción puede contener tanto un molde de muestra como un control positivo.

Adicionalmente a los controles "sin molde", los controles negativos pueden incluir además reacciones de amplificación con ácidos nucleicos diana no específicos incluidos en la reacción, o pueden ser muestras preparadas mediante el uso de cualquiera o todas las etapas de preparación de muestras (desde extracción de ácidos nucleicos hasta la

preparación de amplificación) sin la adición de una muestra de ensayo (por ejemplo, cada etapa usa lo mismo ninguna muestra de prueba o una muestra conocida que esté libre de ESBL, tal como CTX-M).

Los controles positivos y negativos son útiles para establecer los parámetros dentro de los cuales una muestra de prueba se clasificará como que tiene o no tiene una ESBL.

Por ejemplo, en una reacción de QPCR, el umbral de ciclo en el que una ESBL, *por ejemplo*, una CTX-M se detecta en una muestra de control positivo se puede usar para establecer el umbral para clasificar una muestra como "positiva", y el umbral de ciclo en el que la ESBL de interés, *por ejemplo*, CTX-M se detecta en una muestra de control negativo se puede usar para establecer el umbral para clasificar una muestra como "negativa." El CT de una sola reacción puede ser usado para cada control, o se puede usar la mediana o la media de muestras replicadas. En aún otra modalidad, se pueden usar los valores de control históricos. El nivel mínimo de detección para cada uno de los controles negativos y positivos se fija típicamente en el extremo inferior del intervalo de confianza del 95% del CT medio por las múltiples reacciones. Este valor se puede ajustar en dependencia de los requerimientos de la prueba de diagnóstico.

Preferentemente, los controles de PCR se deben realizar al mismo tiempo que la muestra de prueba, mediante el uso de los mismos reactivos, en la misma reacción de amplificación.

Algunas modalidades tienen en cuenta la determinación de la identidad y/o cantidad de productos diana de amplificación. La identidad de la extensión del cebador o producto de amplificación se puede confirmar mediante el uso de técnicas moleculares estándar, que incluyen (por ejemplo) un ensayo de transferencia Southern. En un ensayo de transferencia Southern, los productos de amplificación se separan mediante electroforesis, se transfieren a una membrana (es decir, nitrocelulosa, nailon, etc.), se hacen reaccionar con una sonda de oligonucleótido o cualquier porción de la secuencia de ácido nucleico de interés. La sonda se modifica después para permitir la detección. Los métodos de modificación pueden ser la incorporación de un nucleótido radiomarcado o cualquier número de marcadores no radiactivos (tal como biotina). La sonda de oligonucleótido usada en el ensayo de transferencia Southern se deriva de la secuencia de ácido nucleico y por lo tanto, es específica para ácidos nucleicos de CTX-M, y puede ser una sonda que comprende la secuencia que se expone en las sec. con núms. de ident.; 5, 10 31, 32, y 33. La sonda usada en el ensayo de transferencia Southern se puede preparar mediante el uso de métodos estándar, de rutina. Por ejemplo, la sonda se puede aislar, clonar, y restringir mediante el uso de técnicas de rutina conocidas en la técnica o se pueden hacer con el uso de métodos de síntesis química descritos previamente en la presente descripción.

Alternativamente, los productos de amplificación se pueden detectar mediante el uso del análisis de transferencia puntual. El análisis de transferencia puntual implica adherir una sonda de oligonucleótido (tal como la descrita previamente) a una nitrocelulosa o soporte sólido tal como, pero sin limitarse a, una perla (tal como, pero sin limitarse a, perlas de poliestireno, perlas magnéticas, o perlas no magnéticas, etc.), las paredes de una bandeja de reacción, tiras (tales como, pero sin limitarse a, tiras de nitrocelulosa), un tubo de ensayo. La muestra que contiene el producto de amplificación marcado se adiciona, reacciona, se lava para la muestra no unida eliminada, y un producto amplificado, marcado unido a la sonda se visualiza mediante el uso de técnicas de rutina conocidas en la materia. Una manera más rigurosa para verificar el producto de extensión del cebador o producto de amplificación es a través de técnicas de secuenciación directa mediante el uso de técnicas bien conocidas en la materia.

Estuches

Además se proporcionan en la presente descripción "estuches" que contienen los elementos necesarios para llevar a cabo los métodos descritos en la presente. Tal un estuche puede comprender un portador que está compartimentado para recibir en confinamiento cerrado en el mismo uno o más recipientes, tales como tubos o frascos. Uno de los recipientes puede contener al menos un cebador o sonda no marcada o marcada de forma detectable descritos en la presente descripción. El cebador o cebadores pueden estar presentes en forma liofilizada o en un tampón apropiado según sea necesario. Uno o más recipientes pueden contener una o más enzimas o reactivos para ser utilizados en reacciones de PCR. Estas enzimas pueden estar presentes por sí mismas o en mezclas, en forma liofilizada o en tampones apropiados.

Por último, el estuche puede incluir todos los elementos adicionales necesarios para llevar a cabo los métodos divulgados en la presente descripción, tales como tampones, reactivos de extracción, enzimas, pipetas, placas, ácidos nucleicos, nucleósidos trifosfato, papel de filtro, materiales en gel, materiales de transferencia, suministros de autorradiografía, y similares.

Preferentemente, los estuches incluyen al menos: (a) un oligonucleótido marcado, donde el estuche incluye dos o más oligonucleótidos distinguibles, por ejemplo, que hibridan con una secuencia de nucleótidos que codifica una EMBL, por ejemplo, un gen CTX-M; y (b) instrucciones para usar el (los) oligonucleótido(s) marcado(s) proporcionado(s) en una amplificación de alta fidelidad, por ejemplo, reacción, PCR, tal como QPCR. En una modalidad los dos oligonucleótidos distinguibles serán seleccionados del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.; 1-24.

- 5 En algunas modalidades, los estuches incluyen reactivos adicionales que se requieren para o convenientes y/o deseables para incluir en la mezcla de reacción preparada durante los métodos descritos en la presente descripción, donde dichos reactivos incluyen: uno o más polimerasas; un medio tampón acuoso (ya sea preparado o presente en sus componentes constituyentes, donde uno o más de los componentes se pueden mezclar previamente o todos los componentes pueden estar separados), y similares. Los diversos componentes de reactivos de los estuches pueden estar presentes en recipientes separados, o todos se pueden combinar previamente en una mezcla de reactivos para la combinación con el ácido nucleico molde.
- 10 Adicionalmente a los componentes anteriores, en algunas modalidades, los estuches pueden incluir además instrucciones para practicar los métodos descritos en la presente descripción. Estas instrucciones pueden estar presentes en los estuches en una variedad de formas, una o más de las cuales pueden estar presentes en el estuche. Una forma en la que estas instrucciones pueden estar presentes es como información impresa en un medio o sustrato adecuado, por ejemplo, una pieza o piezas de papel en el que la información se imprime, en el embalaje del estuche, en un prospecto, etc. Aún otros medios serían un medio legible por ordenador, por ejemplo, disquete, CD, etc., en los que la información ha sido registrada. Aún otros medios que pueden estar presentes es una dirección de sitio web que se puede usar a través de Internet para acceder a la información en un sitio separado. Cualquier medio conveniente
- 15 pueden estar presentes en los estuches.
- 20

Referencias

1. Rasmussen y Bush. 1997. Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother* 41 : 223-232.
2. Woodford y otros 2004. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Producing a New Carbapenem-Hydrolyzing Class A β -Lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrob. Agents Chemother* 48 : 4793-4799.
3. Yigit y otros 2001. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother* 45 : 1151-1161.
4. Manual of Microbiology, 81o. edición. Editado por PR Murray, EJ Baron, JH Jorgensen, MA Tenover, y RH Tenover. ASM Press, Washington D.C., 2003.
5. Clinical and Laboratory Standard Institute. 2008. Performance, Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement M100-S18. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, Pa.
6. Dieffenbach & Dveksler. 2003. PCR Primer: A Laboratory Manual. CSHL Press, 520 p.
7. Devor, E.J. 2005. Locked Nucleic Acids (LNAs). *Molecular Genetics and Bioinformatics: Integrated DNA technologies*.

Lista de Secuencias

5 <110> GENE OHM SCIENCES, INC.
Catherine Lippe
Isabelle Duteaud
Celine Roger-Dalbert

10 <120> MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE BETA LACTAMASAS DE ESPECTRO
EXTENDIDO

<130> GENOM.097VPC

15 <150> 61/153954
<151> 2009-02-19

<160> 51

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

20 <210> 1
<211> 18
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

30 <220>
<221> caract._misceláneas
<222> (0) ... (0)
<223> y = t o c

35 <400> 1
cygcttctcg ggttggtg 18

40 <210> 2
<211> 20
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido sintético
<220>
<221> caract._misceláneas
<222> (0) ... (0)
<223> r = g o a

50 <400> 2
20 ttgrggctgg gtgaagtaag

55 <210> 3
<211> 18
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Oligonucleótido sintético
<220>
<221> caract._misceláneas
<222> (0) ... (0)
<223> m = a o c

5
 <220>
 <221> caract._misceláneas
 <222> (0) ... (0)
 <223> s = g o c

10
 <220>
 <221> caract._misceláneas
 <222> (0) ... (0)
 <223> w = a o t

15
 <400> 3
 ggtmtgccga aatswtgg 18

20
 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN.
 <213> Secuencia artificial

25
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

30
 <220>
 <221> caract._misceláneas
 <222> (0) ... (0)
 <223> h = a, c o t

35
 <400> 4
 cgcagccaga ahatcccgac 20

40
 <210> 5
 <211> 37
 <212> ADN.
 <213> Secuencia artificial

45
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

50
 <220>
 <221> caract._misceláneas
 <222> (0) ... (0)
 <223> y = t o c

55
 <400> 5
 ccagcgtatg gyaccaccaa cgatatcgcg gcgctgg 37

60
 <210> 6
 <211> 18
 <212> ADN.
 <213> Secuencia artificial

65
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

70
 <220>
 <221> caract._misceláneas
 <222> (0) ... (0)
 <223> s = g o c

75
 <400> 6
 tgtrtgcscg ggccaacg 18

80
 <210> 7
 <211> 22

	<212> ADN.	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> caract._misceláneas	
10	<222> (0) ... (0)	
	<223> y = t o c	
	<400> 7	
	gtagagcgtc tgtgygttat cg	22
15	<210> 8	
	<211> 18	
	<212> ADN.	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 8	
25	tttatgcgca gacgagtg	18
	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> ADN.	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 9	
35	aaagcacctg cgtattatct	20
	<210> 10	
	<211> 32	
40	<212> ADN.	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
45	<220>	
	<221> caract._misceláneas	
	<222> (0) ... (0)	
	<223> r = g o a	
50	<400> 10	
	cgaggcgcgg cgctggaraa aagcaggcct cg	32
	<210> 11	
	<211> 19	
	<212> ADN.	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
60	<220>	
	<221> caract._misceláneas	
	<222> (0)...(0)	
	<223> y = t o c	

	<220>	
	<221> caract._misceláneas	
	<222> (0) ... (0)	
5	<223> w = a o t	
	<400> 11	
	gyattcaggc wggactgcc	19
10	<210> 12	
	<211> 18	
	<212> ADN.	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 12	
	gggggataaa accggcag	18
20	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> ADN.	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> caract._misceláneas	
30	<222> (0) ... (0)	
	<223> r = g o a	
	<400> 13	
	gctttctgcc ttaggttgrg	20
35	<210> 14	
	<211> 19	
	<212> ADN.	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> caract._misceláneas	
45	<222> (0) ... (0)	
	<223> r = g o a	
	<400> 14	
50	artgaccaga atcagcggc	19
	<210> 15	
	<211> 18	
	<212> ADN.	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
60	<220>	
	<221> caract._misceláneas	
	<222> (0) ... (0)	
	<223> r = g o a	

	<400> 15 tagcgcgagc attcrggc	
5	<210> 16 <211> 18 <212> ADN. <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
15	<220> <221> caract._misceláneas <222> (0) ... (0) <223> k = g o t	
20	<400> 16 tgggkagtgg gcgataaa	18
25	<210> 17 <211> 20 <212> ADN. <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
35	<400> 17 tacgatttc gccgccgcag	20
40	<210> 18 <211> 18 <212> ADN. <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
50	<220> <221> caract._misceláneas <222> (0) ... (0) <223> y = t o c	
55	<400> 18 gacggytttc cgccttct 18	
60	<210> 19 <211> 19 <212> ADN. <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<220> <221> caract._misceláneas <222> (0) ... (0) <223> y = t o c	
	<220> <221> caract._misceláneas <222> (0) ... (0) <223> r = g o a	

	<220>	
	<221> caract._misceláneas	
	<222> (0) ... (0)	
5	<223> a = g o c	
	<400> 19	
	ygccgctgtr tgcscaggc	19
10	<210> 20	
	<211> 18	
	<212> ADN.	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> caract._misceláneas	
20	<222> (0) ... (0)	
	<223> s = g o c	
	<400> 20	
	acgaygttca rcaaaagc	18
25	<210> 21	
	<211> 19	
	<212> ADN.	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<220>	
35	<221> caract._misceláneas	
	<222> (0) ... (0)	
	<223> r = g o a	
	<400> 21	
40	ctcrtcggcg cggtagagc	19
	<210> 22	
	<211> 21	
	<212> ADN.	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
50	<220>	
	<221> caract._misceláneas	
	<222> (0) ... (0)	
	<223> y = t o c	
55	<220>	
	<221> caract._misceláneas	
	<222> (0) ... (0)	
	<223> r = g o a	
60	<400> 22	
	tatcggcggt gtyaatcarc g	21
	<210> 23	
	<211> 19	

	<212> ADN.	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
10	<220> <221> caract._misceláneas <222> (0) .3.. (0) <223> r = g o a	
15	<220> <221> caract._misceláneas <222> (0)...(0) <223> m = a o c	
20	<400> 23 crmcgcttta tgcgcagac	19
25	<210> 24 <211> 18 <212> ADN. <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
35	<220> <221> caract._misceláneas <222> (0) ... (0) <223> r = g o a	
40	<220> <221> caract._misceláneas <222> (0)...(0) <223> k = g o t	
45	<400> 24 artgcgkgkc arcaaaag	18
50	<210> 25 <211> 20 <212> ADN. <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
60	<220> <221> caract._misceláneas <222> (0)...(0) <223> k = g o t	
	<220> <221> caract._misceláneas <222> (0) ... (0) <223> y = t o c	
	<400> 25 tatctkyggt atcgatgagc	20
	<210> 26 <211> 20	

<212> ADN.
 <213> Secuencia artificial

 5 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 26
 gttcatcacc gcgataaagc 20

 10 <210> 27
 <211> 19
 <212> ADN.
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 27
 cagcaccagt aargtgatg 19

 20 <210> 28
 <211> 22
 <212> ADN.
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 28
 ttgtagttaa ycargtcyga rg 22

 30 <210> 29
 <211> 18
 <212> ADN.
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 29
 cggatgatgaa cgctttcc 18

 40 <210> 30
 <211> 18
 <212> ADN.
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 30
 atcggcaggc ttgatctc 18

 50 <210> 31
 <211> 35
 <212> ADN.
 <213> Secuencia artificial

 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 31
 cggcgataag caragtgaaa cgcaaaagat cgccg 35

 60

5	<210> 32 <211> 17 <212> ADN. <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
10	<400> 32 ccaccaacga tatcgcg	17
15	<210> 33 <211> 24 <212> ADN. <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
20	<400> 33 tggycacc aacgatatcg cggt	24
25	<210> 34 <211> 18 <212> ADN. <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 34 aactgacact gggctctg	18
35	<210> 35 <211> 18 <212> ADN. <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
45	<400> 35 atacmctccg caggttc	18
50	<210> 36 <211> 35 <212> ADN. <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
55	<400> 36 cgcgatcaca cgaccggeaa ccaccgcaga tcgcg	35
60	<210> 37 <211> 18 <212> ADN. <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	

	<400> 37 gatrgatacc ggctcagg	18
5	<210> 38 <211> 18 <212> ADN. <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
15	<400> 38 gtaacggatg ggtgtgtc	18
20	<210> 39 <211> 34 <212> ADN. <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
30	<400> 39 cgcgatcgct gccgctgtgc tggctcggat cgcg	34
35	<210> 40 <211> 20 <212> ADN. <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
45	<400> 40 gacgatgtca ctggctgagc	20
50	<210> 41 <211> 19 <212> ADN. <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
60	<400> 41 agccgccgac gctaataca	19
	<210> 42 <211> 22 <212> ADN. <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 42 gcgacctggt taactacaat cc	20
	<210> 43 <211> 21 <212> ADN. <213> Secuencia artificial	

	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
5	<400> 43 cggtagtatt gcccttaagc c	21	
	<210> 44		
	<211> 21		
10	<212> ADN.		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
15	<400> 44 cgctttgccca tgtgcagcac c	21	
	<210> 45		
	<211> 18		
20	<212> ADN.		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
25	<400> 45 gctcagtacg atcgagcc	18	
	<210> 46		
	<211> 20		
30	<212> ADN.		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
35	<400> 46 gctggagaaa agcagcggag	20	
	<210> 47		
	<211> 20		
40	<212> ADN.		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
45	<400> 47 gtaagctgac gcaacgtctg	20	
	<210> 48		
	<211> 806		
	<212> ADN.		
	<213> Secuencia artificial		
50			
55	<220>		
	<223> Secuencia ADN consenso		
	<220>		
	<221> caract. misceláneas		
60	<222> (0) ... (0)		
	<223> n = a, t, c o g		
	<400> 48		

5
10
15
tgcgcgtgta tgcgcgaaacg ggcgacgtac agcaaaaaact tgccgaatta gagcggcagt 60
cgggaggcag actgggtgtg gcattgatta acacagcaga taattcgcaa atactttatc 120
gtgctgatga gcgcttttgcg atgtgcagca ccagtaaagt gatggccgcg gccgcggtgc 180
tgaagaaaag tgaagcgaa ccgaatctgt taaatcagcg agttgagatc aaaaaatctg 240
acctgggttaa ctataatncc gattgcgga aagcacgtca atgggacgat gtcactggct 300
gagcttagcg cggccgcgct acagtacagc gataacgtgg cgatgaataa gctgattgct 360
cacgttggcg gcccggttag cgtcaccgcg ttcgcccgcg agctgggaga cgaaacgttc 420
cgtgtcgacc gtaccgagcc gacgttaaac accgccattc cgggcgatcc gcgtgatacc 480
acttcacctc gggcaatggc gcaaactctg cggaatctga cgctgggtaa agcattgggc 540
gacagccaac gggcgacgt ggtgacatgg atgaaaggca ataccaccgg tgcagcgagc 600
attcaggctg gactgcctgc ttcctgggtt gtgggggata aaaccggcag cggtgactat 660
ggcaccacca acgatatcgc ggtgatctgg ccaaaagatc gtgcgcgct gattctggct 720
acttacttca cccagcctca acctaaggca gaaagccgtc gcgatgtatt agcgtcggcg 780
gctaaaatcg tcaccacggg ttgtaa 806

20
<210> 49
<211> 806
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
25
<220>
<223> Secuencia ADN consenso
30
<400> 49

30
35
40
caacgctgca tgcgcaggcg aacagcgtgc aacagcagct ggaagccctg gagaaaagtt 60
cgggaggctc gcttggcgtt gcgctgatta acaccgccga taattcgagc attctctacc 120
gtgccgatga acgtttttgcg atgtgcagta ccagtaagggt gatggcggcc gccgcggtgc 180
ttaaacagag cgagagcgat aagcacctgc taaatcagcg cgttgaaatc aagaagagcg 240
acctgggttaa ctacaatccc attgcggaga aacacgttaa cggcacgatg acgctggctg 300
agcttggcgc agcggcgctg cagtatagcg acaatactgc catgaataag ctgattgccc 360
atctgggtgg tcccgataaa gtgacggcgt ttgctcgtc gttgggtgat gagaccttc 420
gtctggacag aaccgagccc acgctcaata ccgccattcc aggcgacccg cgtgatacca 480
ccacgcccgt cgcgatggcg cagaccctga aaaatctgac gctgggtaa gcgctggcgg 540
aaactcagcg ggcacagttg gtgacgtggc ttaagggcaa tactaccggt agcgcgagca 600
ttcgggcggt tctgccgaaa tcatgggtag tgggcgataa aaccggcagc ggagattatg 660
gcaccaccaa cgatatcgcg gttatctggc cggaaaacca cgcaccgctg gttctggtga 720
cctactttac ccaaccggag cagaaggcgg aaagccgtcg ggatattctg gctgcggcgg 780
cgaaaatcgt aaccacggg ttctga 806

45
<210> 50
<211> 806
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
50
<220>
<223> Secuencia ADN consenso
<400> 50

55

60

ES 2 545 793 T3

```

5      tgccgctgtg tgccagggcg aacgatgttc aacaaaagct cgccggcgctg gagaaaagca 60
      gcggggggacg actgggtgtg gcgttgatta acaccgccga taacacgcag acgctctacc 120
      gcgccgacga gcgtttttggc catgtgcagc accagtaaag tgatggcggc agcggcggtg 180
      ttaagcaaag tgaaacgcaa aagggtcttg tgagtcagcg gggtgaaatt aagccctcag 240
      acttgattaa ctacaacccc attgcggaag aacacgtcaa tggcacgatg acattcgggg 300
      agttgagcgc ggccggcgcta cagtacagcg ataatactgc catgaataag ctgattgccc 360
      atctcggggg gcgggataaa gtgacggcat ttgccgtac gattggcgat gacacgttcc 420
      ggctcgatcg taccgagccg acgctcaaca ccgcatccc cgccgacccg cgcgatacca 480
10     ccacgccgtt agcgatggcg caggctctgc gcaatctgac gttgggcaat gccctgggtg 540
      acactcagcg tgcgcagctg gtgatgtggc tgaaaggcaa caccaccggc gctgccagca 600
      ttcaggcagg gctacccaca tcgtgggttg tcgggggataa aaccggcagc ggcgattatg 660
      gtacgacgaa tgatatcgcg gttatttggc cggaagggtcg cgcgccgctc gttctggtga 720
      cttacttcac ccagtcggag ccgaaggcag agagccgctcg tgacgtgctc gctgctgccg 780
15     ccagaattgt caccgacggg tattaat                                     806

```

<210> 51

<211> 806

<212> ADN.

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia ADN consenso

25 <400> 51

```

      cgccgcttta tgcgcagacg agtgcggtgc agcaaaagct ggccggcgctg gagaaaagca 60
      gcggagggcg gctgggcgtc gcgctcatcg ataccgcaga taatacgcag gtgctttatc 120
30     gcggtgatga acgctttcca atgtgcagta ccagtaaagt tatggcggcc gcggcggtgc 180
      ttaagcagag tgaaacgcaa aagcagctgc ttaatcagcc tgtcgagatc aagcctgccg 240
      atctgggtta ctacaatccg attgccgaaa aacacgtcaa cggcacaatg acgctggcag 300
      aactgagcgc ggccgcgttg cagtacagcg acaataccgc catgaacaaa ttgattgccc 360
      agctcggtgg cccgggaggc gtgacggctt ttgcccgccg gatcggcgat gagacgtttc 420
      gtctggatcg cactgaacct acgctgaata ccgccattcc cggcgacccg agagacacca 480
      ccacgcccgcg ggcgatggcg cagacgttgc gtcagcttac gctgggtcat gcgctgggcg 540
      aaaccagcg ggccgagttg gtgacgtggc tcaaaggcaa tacgaccggc gcagccagca 600
      ttcggggccgg cttaccgacg tcgtggactg tgggtgataa gaccggcagc ggcgactacg 660
      gcaccacca tgaattatgc gtgatctggc cgcagggtcg tgcgcgctg gttctggtga 720
      cctattttac ccagccgcaa cagaacgcag agagccgccg cgatgtgctg gcttcagcgg 780
      cgagaatcat cgccgaaggg ctgtaa                                     806

```

Reivindicaciones

1. Un método para la detección y/o identificación de la presencia de microbios con una β -lactamasa de espectro extendido de CTX-M en un espécimen, que comprende:

obtener una muestra del espécimen para ser analizada para la presencia de una β -Lactamasa de espectro extendido de CTX-M;

poner en contacto la muestra con un conjunto de cebadores de amplificación en condiciones suficientes para proporcionar productos de amplificación de ácidos nucleicos basados en la polimerasa, en donde el conjunto de cebadores de amplificación comprende al menos un par de cebadores que comprende un primer y segundo cebador, dichos cebadores primero y segundo que comprenden al menos 12 nucleótidos consecutivos seleccionados del grupo que consiste en:

sec. con núms. de ident.; 1 y 2 ;

sec. con núms. de ident.; 3 y 4;

sec. con núms. de ident.; 6 y 7;

sec. con núms. de ident.; 8 y 9;

sec. con núms. de ident.; 27 y 28; y

sec. con núms. de ident.; 29 y 30; o las complementarias de estas,

en donde dicho conjunto de cebadores comprende uno o más cebadores con una base universal, en donde dicho conjunto de cebadores de amplificación se hibridan conjuntamente, y producen productos de amplificación diana en la presencia de isoformas de CTX-M 1-82;

proporcionar reactivos y condiciones para la extensión de los cebadores para generar los productos de amplificación diana; y

determinar la presencia y/o cantidad de los productos de amplificación diana, en donde la presencia del producto de amplificación diana indica la presencia de dicha β -lactamasa de espectro extendido de CTX-M.

2. El método de la reivindicación 1, que además comprende poner en contacto dicha muestra con al menos una sonda que hibrida con al menos un producto de amplificación diana.

3. El método de la reivindicación 1, caracterizado además porque dicho conjunto de cebadores de amplificación comprende una pluralidad de pares de cebadores de amplificación, en donde dicha pluralidad de pares de cebadores de amplificación se hibridan conjuntamente con, y producen productos de amplificación diana en la presencia de ácidos nucleicos de CTX-M a partir de cada una de las cepas bacterianas enumeradas en la Tabla 1.

4. El método de la reivindicación 2, caracterizado además porque dicha sonda se selecciona del grupo que consiste en una sonda de baliza molecular, una sonda fluorescente TAQMAN™, y una sonda fluorescente scorpion.

5. El método de la reivindicación 1, que además comprende poner en contacto dicha muestra con una o más sondas, en donde dicha una o más sondas hibrida conjuntamente con los productos de amplificación diana de los grupos de CTX-M CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, y CTX-M-25, bajo condiciones suficientes para proporcionar productos de amplificación de ácidos nucleicos basados en la polimerasa.

6. El método de la reivindicación 1, caracterizado además porque dicho conjunto de cebadores de amplificación comprende al menos dos cebadores, en donde cada cebador se selecciona del grupo que consiste en:

CYGCTTCCTGGGTTGTGG (sec. con núm. de ident.:1);

TTGRGGCTGGGTGAAGTAAG (sec. con núm. de ident.:2);

GGTMTGCCGAAATSWTGG (sec. con núm. de ident.:3);

CGCAGCCAGAAHATCCCGAC (sec. con núm. de ident.:4);

TGTRTGCSCAGGCGAACG (sec. con núm. de ident.:6);

GTAGAGCGTCTGTGYGTTAFCG (sec. con núm. de ident.:7);

TTTATGCGCAGACGAGTG (sec. con núm. de ident.:8);

AAAGCACCTGCGTATTATCT (sec. con núm. de ident.:9); o la complementaria de estas.

7. El método de la reivindicación 6, que además comprende poner en contacto dicha muestra con al menos una sonda, en donde dicha al menos una sonda comprende al menos 12 nucleótidos consecutivos seleccionados del grupo que consiste en la sec. con núm. de ident.: 5, sec. con núm. de ident.:10, sec. con núm. de ident.:31, sec. con núm. de ident.:32, y sec. con núm. de ident.:33.

8. El método de la reivindicación 1, caracterizado además porque dicho conjunto de cebadores de amplificación comprende al menos dos cebadores, en donde cada cebador comprende al menos 12 nucleótidos consecutivos seleccionados del grupo que consiste en :

CYGCTTCCTGGGTTGTGG (sec. con núm. de ident.:1);
 TTGRGGCTGGGTGAAGTAAG (sec. con núm. de ident.:2);
 GGTMTGCCGAAATSWTGG (sec. con núm. de ident.:3);
 CGCAGCCAGAAHATCCCGAC (sec. con núm. de ident.:4);
 CAGCACCAGTAARGTGATG (sec. con núm. de ident.:27);
 TTGTAGTTAAYCARGTCYGARG (sec. con núm. de ident.:28);
 CGGTGATGAACGCTTTCC (sec. con núm. de ident.:29);
 ATCGGCAGGCTTGATCTC (sec. con núm. de ident.:30); o la complementaria de estas.

9. El método de la reivindicación 8, que además comprende poner en contacto dicha muestra con al menos una sonda, en donde dicha al menos una sonda comprende al menos 12 nucleótidos consecutivos seleccionados del grupo que consiste en la sec. con núm. de ident.:5, sec. con núm. de ident.:10, sec. con núm. de ident.:31, sec. con núm. de ident.:32, y sec. con núm. de ident.: 33.

10. Un estuche para la detección y/o identificación de la presencia de microbios con β -lactamasas de espectro extendido de CTX-M en un espécimen, que comprende:

un conjunto de cebadores de amplificación en donde el conjunto de cebadores de amplificación comprende una pluralidad de pares de cebadores, y en donde dicho conjunto de cebadores de amplificación comprende uno o más cebadores con una base universal, en donde dicha pluralidad de pares de cebadores de amplificación se hibridan conjuntamente a, y produce productos de amplificación diana en la presencia de, isoformas 1-82 de CTX-M bajo condiciones suficientes para proporcionar productos de amplificación de ácidos nucleicos basados en la polimerasa, en donde el conjunto de cebadores de amplificación comprende al menos un par de cebadores que comprende un primer y segundo cebador, dichos primero y segundo cebadores que comprenden al menos 12 nucleótidos consecutivos seleccionados del grupo que consiste en:

sec. con núms. de ident.; 1 y 2
 sec. con núms. de ident.; 3 y 4;
 sec. con núms. de ident.; 6 y 7;
 sec. con núms. de ident.; 8 y 9;
 sec. con núms. de ident.; 27 y 28; y
 sec. con núms. de ident.; 29 y 30; o las complementarias de estas.

11. El estuche de la reivindicación 10, que además comprende al menos una sonda que se hibrida con al menos una secuencia diana.

12. El estuche de la reivindicación 11, caracterizado además porque dicha sonda se selecciona del grupo que consiste en un sonda de baliza molecular, una sonda fluorescente TAQMAN™, y una sonda fluorescente scorpion.

13. El estuche de la reivindicación 10, que además comprende al menos una sonda que se puede hibridar con los productos de amplificación diana de al menos dos productos de amplificación diana del grupo CTX-M bajo dichas condiciones suficientes para proporcionar productos de amplificación de ácidos nucleicos basados en la polimerasa.

14. El estuche de la reivindicación 10, que además comprende una o más sondas, en donde dichas una o más sondas se pueden hibridar conjuntamente a los productos de amplificación diana de los grupos CTX-M CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, y CTX-M-25, bajo condiciones estándar de PCR.

15. El estuche de la reivindicación 10, caracterizado además porque dicho conjunto de cebadores de amplificación comprende al menos dos cebadores, seleccionados del grupo que consiste en:

CYGCTTCCTGGGTTGTGG (sec. con núm. de ident.:1);
 TTGRGGCTGGGTGAAGTAAG (sec. con núm. de ident.:2);
 GGTMTGCCGAAATSWTGG (sec. con núm. de ident.:3);
 CGCAGCCAGAAHATCCCGAC (sec. con núm. de ident.:4);
 TGTRTGCSAGGCGAACG (sec. con núm. de ident.:6);
 GTAGAGCGTCTGTGYGTTATCG (sec. con núm. de ident.:7);
 TTTATGCGCAGACGAGTG (sec. con núm. de ident.:8);
 AAAGCACCTGCGTATTATCT (sec. con núm. de ident.:9); o la complementaria de estas.

- 5 **16.** El estuche de la reivindicación 15, que además comprende al menos una sonda, en donde dicha al menos una sonda comprende al menos 12 nucleótidos consecutivos seleccionados del grupo que consiste en la sec. con núm. de ident.:5, sec. con núm. de ident.:10, sec. con núm. de ident.:31, sec. con núm. de ident.:32, y sec. con núm. de ident.:33.
- 10 **17.** El estuche de la reivindicación 10, caracterizado además porque dicho conjunto de cebadores de amplificación comprende al menos dos cebadores, en donde cada cebador se selecciona del grupo que consiste en:
- 15 CYGCTTCCTGGGTTGTGG (sec. con núm. de ident.:1);
 TTGRGGCTGGGTGAAGTAAG (sec. con núm. de ident.:2);
 GGTMTGCCGAAATSWTGG (sec. con núm. de ident.:3);
 CGCAGCCAGAAHATCCCGAC (sec. con núm. de ident.:4);
 CAGCACCAAGTAARGTGATG (sec. con núm. de ident.:27);
 TTGTAGTTAAYCARGTCYGARG (sec. con núm. de ident.:28);
 CGGTGATGAACGCTTTCC (sec. con núm. de ident.:29);
 ATCGGCAGGCTTGATCTC (sec. con núm. de ident.:30); o la complementaria de estas.
- 20 **18.** El estuche de la reivindicación 17, que además comprende al menos una sonda, en donde dicha al menos una sonda comprende al menos 12 nucleótidos consecutivos seleccionados del grupo que consiste en la sec. con núm. de ident.:5, sec. con núm. de ident.:10, sec. con núm. de ident.:31, sec. con núm. de ident.:32, y sec. con núm. de ident.:33.
- 25 **19.** El estuche de la reivindicación 10, que además comprende un par de cebadores de amplificación que se hibrida con ácidos nucleicos que flanquean una secuencia diana dentro o que incluyen parte de un gen carbapenamasa.

Figura 1. Árbol filogenético de todos los genes CTX-M agrupados en 4 grupos, con *Klebsiella oxytoca* como un grupo externo

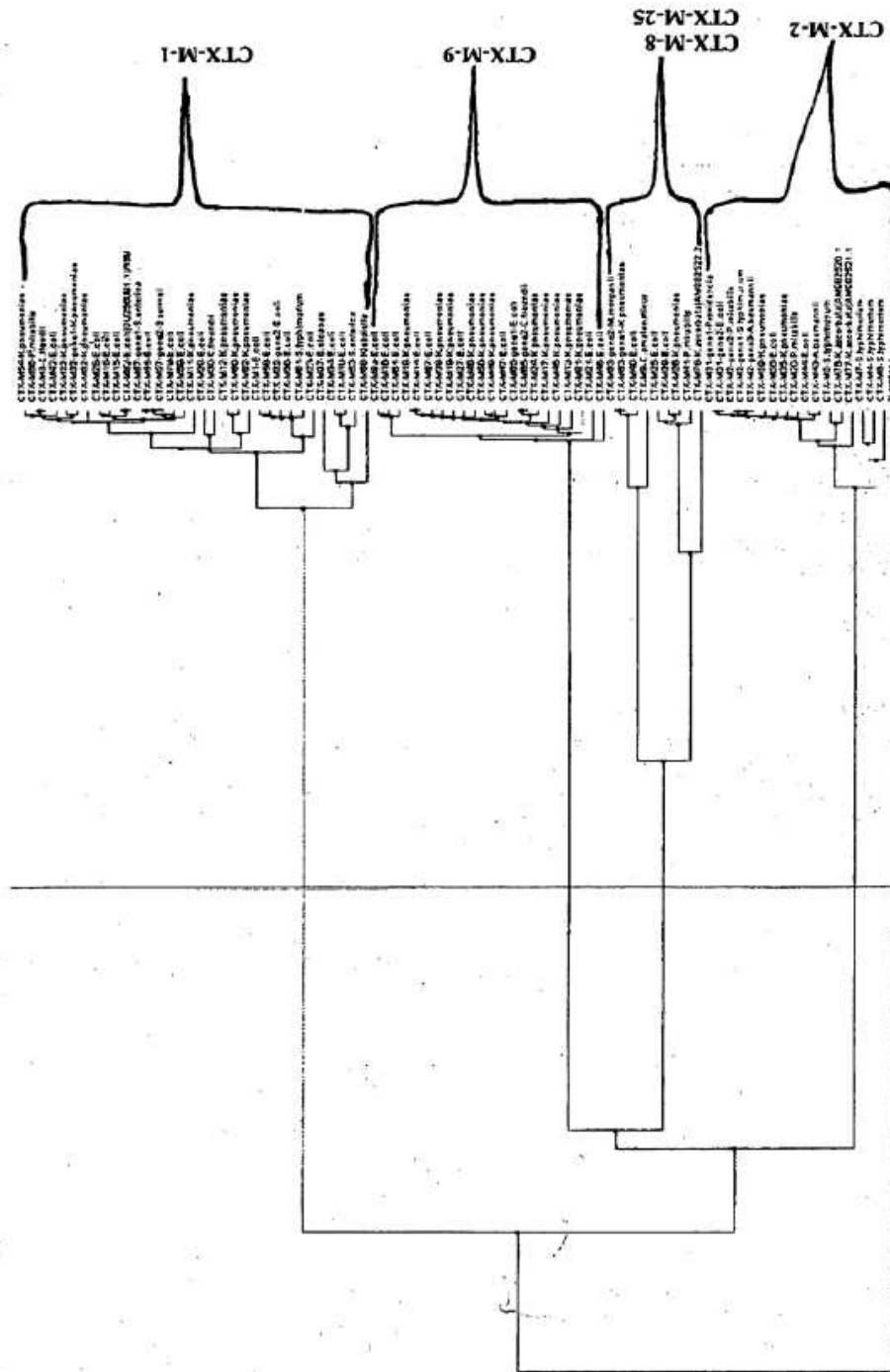




Figura 3. Cebadores desarrollados por el grupo CTX.M2 (ver Figura 1). Los cebadores de la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos US2007248954A1 se marcan con un asterisco (*)

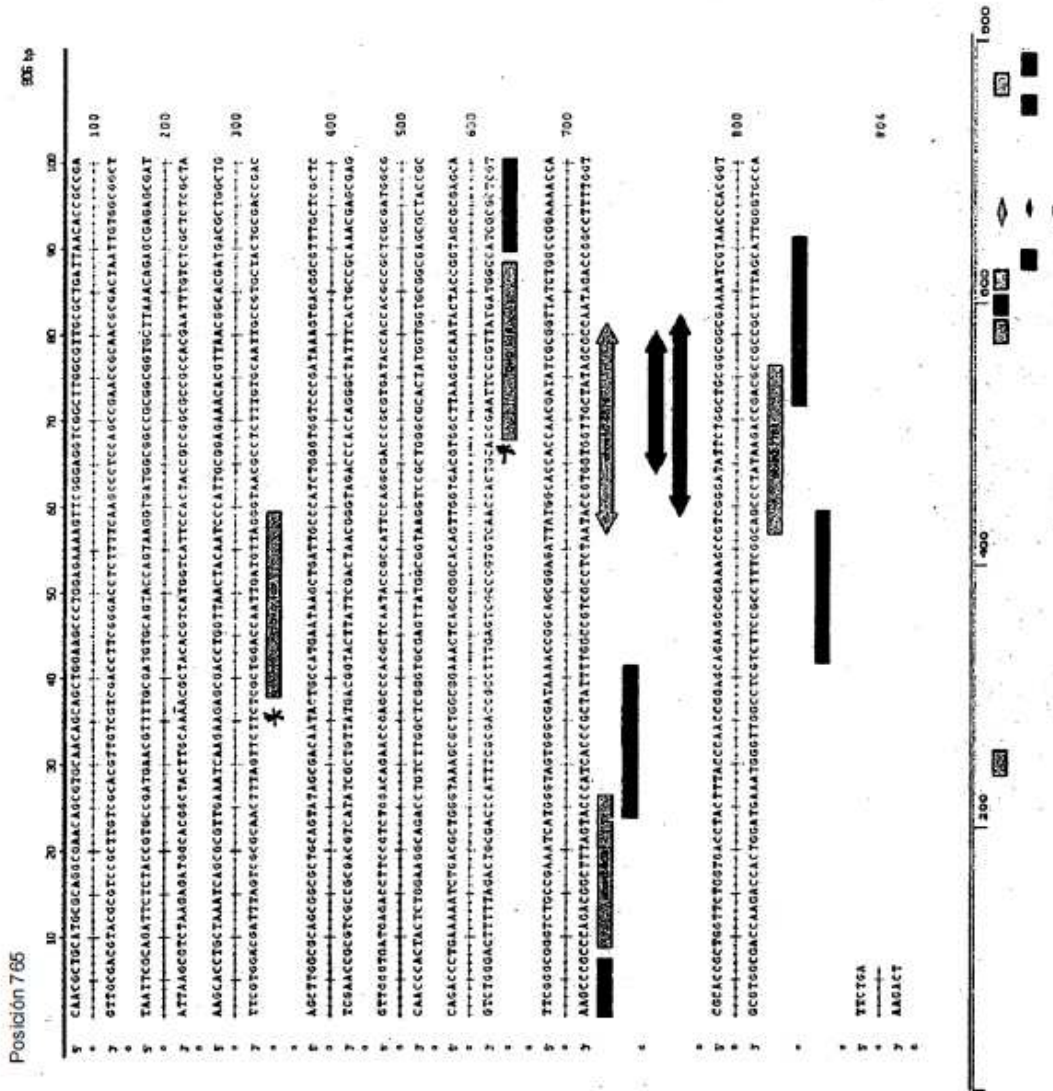
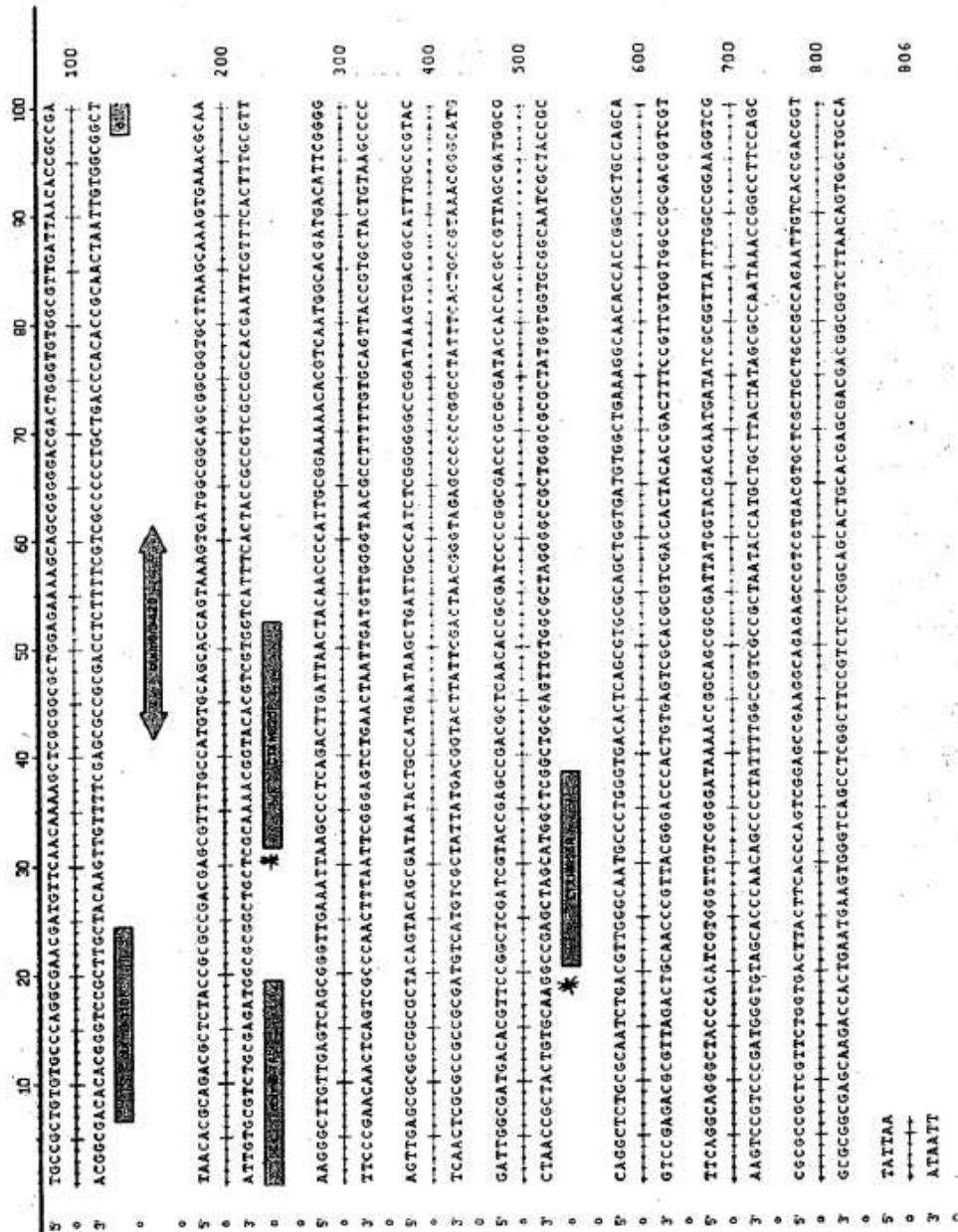


Figura 4. Cebadores desarrollados por el grupo CTX-M-8 (ver Figura 1). Los cebadores descritos anteriormente se marcan con un asterisco (*)



CGCCGCTTATGCGCAGACGAGTGCCTGTCAGCAAAAGCTGGCGCGCTGGAGAAAGACAGCGAGAGGCGCGCTGGGCGCTCGCGCTCATCGATACCGCAGA
TAATACGACGGTGCTTATTCGCGGTGATGAACGCTTTCMAATGTGCAGTACCACTGAATAAGTTATGGCGGCGCGCGGCTGTCTTAAGCAGAGTGAACGCAAA
ATTATCGCTCCACGAAATAGCGCACTACITGCGAAAGTTACACGTATGGTTCATTTCAATACCGCGGCGCGCGCAAGTAATTCGTCTCACTTTGCGCTT
AAAGCAGCTGCTTAATCAGCCTGTGAGATCAAGGCTCCGCAATCTGGTTAACTACAAATCCGATTCGCGAAACACGTCACAGGCGCAATAGACCTGTGGCAG
TTGCTGCGAATTAATTCGAGACGCTAGTTTCGAGCGGCTAGACCAATTCGATTTAGGCTTAACGGCTTTTGTGACGTTGCGGTGCTTACGCGACCGTC
AACTAGCGCGCGCGGCTGCTAGTACAGCGACAAATACGCCATGAAACAAATGGATTGCCCCAGCTCGGTGGCGCGCGGAGCGGTGACCGGCTTTTTCGCCCGCGC
TTGACTCGCGCGCGCGCAACGCTCATGTGCTGTTATGCGCGTACTTGTTTAACTAAAGGCTGAGCGCAACCGCGGCGCTCCGCACTGCGCGAAACGCGCGCGG
GATCGCGGATGAGACGTTCTGTGATCGCACGTGAACCTAGCTGTAATACCGGCAATTCGCGGCGACCCCGAGAGACACACACACCGCGCGCGGCGCGATGGCGG
CTAGCGGCTACTCTGCAAGCAGACCTAGCGTGACTTGGATGCGACTTATGGCGGTAAGGCGCGCTGGGCTCTCTGTGTGGTGGTGGCGCGCGCTTACCGCG
CAGACGTTGCTCAGCTTACGCTGGGTCAATGCGCTGGCGGCAACCCAGCGGCGCGAGTGTGTGAGTGGCTCAAAAGCAATACAGACCGCGCGCAGCGCAGCA
GTCTGCAACGACGTGAAATCGGACCCAGTACGCGACCGCGCTTGGGTCGCGCGCTCAACCACTGACCGAGTTTCCGTTATGCTGGCGCGCGCTCGGCTGCT
TTGCGGCGCGCTTACCGACGCTGTGAGATGTGGGTGATAGACCGCGCAGCGCGGCTAGCGCACACCAATGATATTCGCGCGCTGATGCGGTGGTGGTTACTATAACGCGCACTAGACCGCGCGCTGCCAGCG
AAGCGCGCGCGGCGAATGGCTGACGACCTGACACCCACTATTCTGGCGCGCTCGCGCGCTGATGCGGTGGTGGTTACTATAACGCGCACTAGACCGCGCGCTGCCAGCG
TGCAGCGCGCTGTGTGTGAGCTATTTTACCGACGCGCAACAGACGAGAGAGCGCGCGCGGCTGTGTGTGCTTTCAGCGCGCGCGAGAACTATCGCGCGAGAGGG
ACGCGCGGACCAAGACCACTGGATAAATGGGTGGCGGTTGTCTTTCGCTCTCTCGCGCGCGCGCTACACGACCGGAAATGCGCGCTCTTATGAGCGGCTTCCC
CTGTAA
GACATT