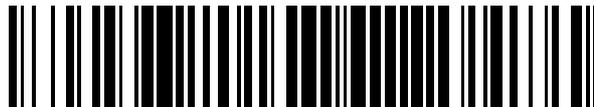


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 777**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2010 E 10825677 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2015 EP 2491144**

54 Título: **Métodos para analizar secuencias de ácido nucleico monocatenario**

30 Prioridad:

21.10.2009 US 253715 P

01.03.2010 US 309265 P

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

02.11.2015

73 Titular/es:

BRANDEIS UNIVERSITY (100.0%)

415 South Street

Waltham, MA 02453-2728, US

72 Inventor/es:

WANGH, LAWRENCE;

RICE, JOHN;

REIS, ARTHUR y

SANCHEZ, J. AQUILES

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 549 777 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 analizar secuencias de ácido nucleico monocatenario

5 **Campo**

Se proporcionan en el presente documento métodos de detección mediante fluorescencia de secuencias de ácidos nucleicos.

10 **Antecedente**

Se conoce bien la detección homogénea de secuencias de ácidos nucleicos. La detección puede incluir un colorante, por ejemplo Verde SYBR, que fluoresce en presencia de un producto de la reacción de amplificación bicatenario de una sonda de hibridación de oligonucleótidos marcada fluorescentemente. Para las sondas de hibridación, "detección homogénea" significa una detección que no requiere la separación entre las sondas unidas (hibridadas a dianas) de las sondas no unidas. Entre las sondas adecuadas para la detección homogénea están las sondas lineales marcadas en un extremo con un fluoróforo y en el otro extremo con un inactivador cuyo espectro de absorción solapa sustancialmente el espectro de emisión del fluoróforo para la inactivación de FRET (las sondas 5' exonucleasa descritas en, por ejemplo, Livak et al. (1995) PCR Methods Appl. 4:357-362), las sondas en horquilla marcadas en un extremo con un fluoróforo y en el otro extremo con un inactivador (sondas de baliza molecular descritas en, por ejemplo, Tyagi et al. (1996) Nature Biotechnology 14:303-308), sondas bicatenarias que tienen un fluoróforo en una hebra y un inactivador en la otra hebra (sondas yin-yang descritas en, por ejemplo, Li y col., (2002) Nucl. Acids Res. 30, N° 2 e5), sondas lineales que tienen un fluoróforo que absorbe emisión de un colorante fluorescente y la reemite a una longitud de onda más larga (sondas descritas en, por ejemplo, la solicitud de patente publicada de los Estados Unidos US2002/0110450), y parejas de sondas lineales, una marcada con un fluoróforo donante y una marcada con un fluoróforo aceptor que se hibrida cerca de una hebra diana de tal manera que sus marcas interactúan mediante FRET (parejas de sondas FRET descritas en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.140.054). Los métodos de detección incluyen métodos para detectar secuencias de ácidos nucleicos en dianas monocatenarias, dianas bicatenarias, o ambas.

Las secuencias de ácidos nucleicos diana adecuadas para el sondaje pueden en algunos casos obtenerse directamente mediante el aislamiento y la purificación del ácido nucleico en una muestra. En otros casos se requiere la amplificación del ácido nucleico. Los métodos de amplificación para uso en la detección homogénea incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), incluyendo la PCR simétrica, la PCR asimétrica y la PCR-LATE, cualquiera de las cuales se puede combinar con la transcripción inversa amplificando las secuencias de ARN, NASBA, SDA, amplificación en círculo rodante. Los métodos para detectar la amplificación pueden basarse en la fluorescencia debido a la sonda de hibridación, o se pueden basar en la digestión de sondas hibridadas durante la amplificación, por ejemplo, el método para detectar la amplificación de la 5' nucleasa. Si una muestra contiene o se amplifica para que contenga dianas bicatenarias, por ejemplo, el producto de amplificación de una reacción de la PCR simétrica, pero se desean dianas monocatenarias, la separación entre las hebras positivas y negativas se puede llevar a cabo por métodos conocidos, por ejemplo, marcando un cebador con biotina y separando las hebras del producto que contienen biotina de las otras hebras mediante captura en una superficie que contiene avidina, que a continuación se lava.

Determinadas sondas fluorescentes útiles para la detección homogénea contienen una hebra marcada con fluoróforo que emite una señal detectable cuando se hibrida con su secuencia diana en una muestra. Por ejemplo, una sonda de baliza molecular es monocatenaria y emite una señal fluorescente detectable tras la hibridación. Una sonda ResonSense® es también monocatenaria y señala solo cuando se hibrida siempre que la muestra contenga un colorante, generalmente un colorante SYBR, que estimula las sondas hibridadas mediante FRET cuando se estimula el colorante. Las sondas yin-yang son sondas bicatenarias inactivadas que incluyen una hebra marcada con fluoróforo que emite una señal detectable cuando se hibridan con su diana. Las parejas de sondas FRET, por otra parte, son parejas de sondas que emiten una señal fluorescente detectable cuando ambas sondas de la pareja se hibridan con sus secuencias diana. Algunos ensayos de amplificación, de forma notable el ensayo de la 5' nucleasa, incluye la generación de señales producidas por el corte de la sonda para generar fragmentos de sonda fluorescentes más bien que simplemente la hibridación de la sonda.

Se pueden construir determinadas sondas que generan una señal tras la hibridación de tal manera que sean "específicas de alelo", esto es, que se hibriden solamente a las secuencias diana perfectamente complementarias, o que sean tolerantes al emparejamiento incorrecto, esto es, que se hibriden tanto a las secuencias diana que son perfectamente complementarias pero que contienen uno o más emparejamientos incorrectos. Las sondas de baliza molecular específicas de alelo tienen secuencias de sonda relativamente cortas, generalmente bucles monocatenarios de no más de 25 nucleótidos de longitud con tallos en horquilla de 4-6 nucleótidos de longitud, y son útiles para detectar, por ejemplo, polimorfismos de nucleótidos únicos. Marras et al. (1999) Genetic Analysis: Biomolecular Engineering 14: 151-156, describe un ensayo de PCR simétrica en tiempo real que incluye en la mezcla de reacción cuatro balizas moleculares que tienen secuencias de sondas de 16 nucleótidos de longitud y tallos de 5 nucleótidos, donde cada sonda tiene un color diferente, esto es, incluye un fluoróforo que es distinguible

de forma detectable por su longitud de onda de emisión, y una secuencia de sonda que difiere de las otras en un único nucleótido. La muestra se analiza tras cada ciclo de la PCR para detectar qué color surge e identificar por tanto cuál de las cuatro posibles secuencias diana perfectamente complementarias de una de las sondas está presente en una muestra. Las sondas de baliza molecular tolerantes al emparejamiento incorrecto tienen secuencias de sonda más largas, son generalmente bucles monocatenarios de hasta 50 o incluso 60 nucleótidos con tallos en horquilla mantenidos con 4-7 nucleótidos. Tyagi et al. Patente europea N° 1230387, describe una amplificación de la PCR simétrica y un ensayo de detección homogéneo que utiliza un conjunto de cuatro sondas de baliza molecular tolerantes para el emparejamiento incorrecto coloreadas de manera diferente que tienen secuencias de sonda diferentes de 40-45 nucleótidos de longitud y tallos de 5-7 nucleótidos de longitud, que se hibridan competitivamente con, y cuestionan por tanto, una secuencia hipervariable de 42 nucleótidos de longitud de genes del ARN micobacteriano de 16S para determinar cuál de las ocho especies de micobacterias está presente en una muestra. La muestra se analiza determinando la relación entre las intensidades de los fluoróforos a una o más temperaturas para identificar la especie que está presente. El-Hajj et al (2009) J. Clin. Microbiology 47:1190-1198, describe la amplificación de la PCR-LATE y un ensayo de detección homogéneo que utiliza de manera similar un conjunto de cuatro sondas de baliza molecular tolerantes para el emparejamiento incorrecto coloreadas de manera diferente que tienen secuencias de sonda diferentes de 36-39 nucleótidos de longitud y tallos de 5-7 nucleótidos de longitud que se hibridan competitivamente a, y cuestionan por tanto, una secuencia hipervariable de 39 nucleótidos de longitud de genes del ARN de 16S micobacteriano para determinar cuál de las veintisiete especies de micobacterias está presente en una muestra. Cada una de las cuatro sondas es una "sonda consenso", esto es, tiene un bucle monocatenario complementario de múltiples especies pero que no es perfectamente complementario de ninguna de ellas. El ADN genómico de alguna de las 27 especies diferentes se amplificó por separado, se determinó la Tf de cada sonda mediante el análisis de fusión posterior a la amplificación, y se tabularon los datos. Para analizar una muestra que contenía especies desconocidas, la muestra se amplificó y se analizó como anteriormente. Las Tf de las cuatro sondas se compararon con los resultados tabulados para identificar las especies presentes en la muestra.

Se han usado múltiples sondas, tanto tolerantes al emparejamiento incorrecto como específicas de alelo, para interrogar múltiples secuencias diana así como secuencias diana más largas que una única sonda específica de alelo. Se han usado sondas de baliza molecular específicas de alelo más largas que una secuencia de sonda bajo cualquiera de dos soluciones. Piatek et al. (1998) Nature Biotechnology 16:359-363, describe ensayos de amplificación de la PCR simétrica que se llevan a cabo en paralelo en tiempo real conteniendo cada uno de cinco balizas moleculares específicas de alelo marcadas con fluoresceína, que abarcan conjuntamente una secuencia de 81 nucleótidos de longitud de una hebra de una región del núcleo del gen *rpoB* de *M. tuberculosis* de una manera solapante. El análisis fue la detección de las intensidades de fluorescencia de la sonda después de cada ciclo de la PCR. El fracaso de una cualquiera de las sondas en hibridarse a la secuencia diana amplificada mediante la PCR ("amplicón") y emitir su señal fluorescente se tomó como una indicación de la resistencia del fármaco. El-Hajj et al. (2001) J. Clin. Microbiology 39:4131-4137, describe la forma de llevar a cabo un único ensayo de la PCR simétrica multiplexada en tiempo real que contiene cinco balizas moleculares específicas de alelo coloreadas de forma diferente, tres complementarias de una hebra amplicón y dos complementarias de la otra hebra amplicón, que abarcan conjuntamente una secuencia de 81 nucleótidos de longitud de una región del núcleo del gen *rpoB* de *M. tuberculosis* de una manera solapante. De nuevo aquí, se obtuvieron las intensidades de fluorescencia de la sonda, y se tomó el fracaso de una cualquiera de las sondas en hibridarse y la señal como una indicación de la resistencia del fármaco. La patente estadounidense asignada a Wittwer et al. con número 6.140.054 describe un ensayo de la PCR simétrica multiplexada para detectar emparejamientos incorrectos de parejas de bases únicas y dobles en dos secuencias (sitios C282Y y H63D) del gen HFE humano utilizando una pareja de cebadores para cada sitio, una pareja de sondas FRET para cada sitio, y una ciclación térmica rápida. Cada pareja de sondas incluye una sonda donante marcada con fluoresceína tolerante al emparejamiento de 20-30 nucleótidos de longitud, situada para hibridarse a los sitios diana de posibles variaciones, y una sonda aceptora Cy5 de 35-45 nucleótidos de longitud, denominada sonda de "anclaje", ya que permanece hibridada a medida que la sonda de fluoresceína compañera se deshidrida de la secuencia diana a una temperatura de fusión dependiente de su grado de complementariedad. La pareja de sondas de un sitio, el sitio C282Y, tiene un intervalo de Tf inferior para las dianas naturales y mutantes que la pareja de la sonda para H63D. Cada pareja de la sonda tiene una Tf de fusión mayor frente a su diana mutante que frente a su diana natural. Como describe Witter, la temperatura de fusión de al menos una de las sondas, normalmente la sonda aceptora, está por encima de la temperatura de hibridación de ambos cebadores utilizados en una amplificación de la PCR simétrica, y la cinética de reacción se sigue en tiempo real. Tras la amplificación, se analiza una muestra determinando las Tf de ambas parejas de sondas a partir de las emisiones de las sondasceptoras (Cy5). Una secuencia diana que tiene un emparejamiento incorrecto de nucleótidos únicos con su sonda donante marcada con fluoresceína, esto es, una secuencia natural, hace que la sonda donante se funda a una temperatura inferior, disminuyendo por tanto la temperatura de fusión en aproximadamente 5 °C, revelando la presencia de un emparejamiento incorrecto. El genotipo de un genoma se establece tanto homocigótico como heterocigótico basándose en si se observa una señal a una o dos temperaturas específicas cuyas posiciones se anticipan por adelantado. Los genomas heterocigóticos tienen concentraciones iguales de dos alelos posibles.

El análisis de secuencias de ácidos nucleicos utilizando sondas múltiples para secuencias diana largas, tanto una secuencia diana única larga como múltiples secuencias diana, mediante los anteriores métodos está limitado por la cantidad de información que se puede obtener. En el análisis de sondas FRET, por cada sonda donante cuyo comportamiento de fusión se detecta, existe una correspondiente sonda aceptora de Tf altas que sirve simplemente

como un "anclaje" y no cuestiona la diana de una manera detectable. Los métodos que utilizan balizas moleculares, tanto específicas de alelo como tolerantes al emparejamiento incorrecto, están limitados por el número de colores de fluoróforos que se pueden distinguir en una única mezcla de reacción (de forma máxima siete u ocho para algunos instrumentos de detección, pero solo cuatro colores para otros instrumentos), y determinados métodos de balizas moleculares están limitados a secuencias diana relativamente cortas. La patente de los EE.UU. n° 7.385.043 describe un ensayo previsto para superar la limitación del color. Describe un ensayo de cribado de una entre muchas de cincuenta o incluso setenta posibles dianas que tienen una sonda específica para cada diana, específicamente una sonda de baliza molecular discriminadora de alelos por subdivisión de cada sonda en múltiples partes, y marcado de cada parte con un fluoróforo diferente, para crear un código multicolor que identifica cada sonda. Los ensayos que utilizan esta solución son complicados y, por tanto, caros, ya que las sondas deben tener múltiples fluoróforos.

La septicemia ilustra la necesidad de analizar secuencias diana de ácidos nucleicos largos. El análisis de la septicemia se complica adicionalmente por la necesidad de diferenciar entre numerosas especies bacterianas, cualquiera de las cuales podría ser el origen de la infección. Existe necesidad de ensayos de cribado de tubos individuales para infecciones patógenas tales como la septicemia, particularmente, ensayos que se pueden llevar a cabo en laboratorios diferentes a los laboratorios CLIA, de elevada complejidad, esto es, laboratorios diagnósticos en puntos de atención médica localizados o próximos al sitio de cuidados del paciente. El documento US 2004/229253 describe composiciones y métodos para multiplétes de polinucleótidos.

Sumario

En algunas realizaciones, se proporciona en el presente documento un método de ensayo homogéneo para analizar al menos una única secuencia diana de ácido nucleico monocatenario en una muestra, que comprende a) proporcionar una muestra que contiene al menos una secuencia diana de ácido nucleico y múltiples conjuntos de sondas distinguibles de forma detectable, donde las sondas de los conjuntos de sondas se hibridan de manera adyacente de tal manera que incluso los nucleótidos de la secuencia diana están cubiertos, y donde cada conjunto de sondas comprende una sonda marcada con un inactivador no fluorescente, y (ii) una sonda marcada con un resto fluorescente; donde tras la hibridación de dicha sonda marcada con un resto fluorescente con dicha al menos una secuencia diana en dicha muestra en ausencia de dicha sonda marcada con un inactivador no fluorescente, dicho resto fluorescente emite una señal sobre de fondo, donde, si ambas sondas de un conjunto de sondas se hibridan con dicha al menos secuencia diana, el inactivador no fluorescente inactiva la señal procedente del resto fluorescente; y b) analizar la hibridación de dichos conjuntos de sondas con dicha al menos una secuencia diana en función de la temperatura.

Otro aspecto proporcionado en el presente documento es el método anterior donde las sondas de señalización incluyen fluoróforos inactivados.

Otro aspecto proporcionado en el presente documento es el método anterior donde la temperatura de fusión de la sonda de señalización en un conjunto es mayor que la temperatura de fusión de una sonda de inactivación asociada.

Otro aspecto proporcionado en el presente documento es el método anterior donde la inactivación cuando ambas sondas se hibridan con la secuencia diana es la inactivación por contacto.

Otro aspecto proporcionado en el presente documento es el método anterior donde al menos una secuencia diana de ácido nucleico comprende al menos dos secuencias diana, y donde el conjunto de sonda de cada secuencia diana incluye sondas de señalización que son diferentes de manera detectable de las sondas de señalización de cada conjunto de sonda diferente.

Otro aspecto proporcionado en el presente documento es el método anterior donde proporcionar la muestra que comprende al menos una secuencia diana en forma monocatenaria comprende amplificar la(s) secuencia(s) diana de ácido nucleico, preferentemente mediante el método de amplificación de la PCR-LATE.

Otro aspecto proporcionado en el presente documento es el uso del método anterior en ensayos de cribado de un tubo único (por ejemplo, tubos, pocillos, etc.) para identificar qué secuencia o secuencias diana de ácido nucleico procedentes de un grupo de múltiples secuencias diana posibles está o están posibles en una muestra, donde el grupo de múltiples secuencias diana comprende una secuencia variable flanqueada por secuencias conservadas, o al menos relativamente conservadas, y se genera una muestra de secuencia diana en forma monocatenaria mediante un método de amplificación que genera amplicones monocatenarios, por ejemplo, un método de reacción en cadena de la polimerasa no simétrico (PCR), de forma más preferente PCR-LATE, utilizando solo unas pocas parejas de cebadores, generalmente no más de tres parejas, preferentemente no más de dos parejas y más preferentemente solo una única pareja de cebadores, que se hibridan con las secuencias flanqueantes, y donde los cebadores y al menos un conjunto de señalización y sondas inactivadoras, preferentemente al menos dos conjuntos, están incluidos en la mezcla de reacción de amplificación.

En algunas realizaciones, los conjuntos de sondas (por ejemplo, sondas de señalización e inactivadoras) se

configuran para hibridarse con la secuencia variable y para diferenciarse entre múltiples secuencias diana (por ejemplo, en una muestra o mezcla única). En algunas realizaciones, las sondas se hibridan a diferentes Tf con las secuencias variables de las diferentes secuencias diana. En alguna realización, una o ambas sondas de un conjunto de sondas (por ejemplo, sondas de señalización y/o inactivadoras) comprenden diferentes grados de complementariedad con las regiones variables de las diferentes secuencias diana. En algunas realizaciones, una sonda de señalización y/o una sonda inactivadora se configura para hibridarse con la secuencia variable (por ejemplo, solapando la diferencia real de secuencias) de múltiples secuencias diana (por ejemplo, a diferentes Tf para las diferentes secuencias diana). En algunas realizaciones, una sonda de señalización se configura para hibridarse con la secuencia variable de múltiples secuencias diana (por ejemplo, a diferentes Tf para las diferentes secuencias diana). En algunas realizaciones, una sonda inactivadora se configura para hibridarse con la secuencia variable de múltiples secuencias diana (por ejemplo, a diferentes Tf para las diferentes secuencias diana).

Se describe también en el presente documento un kit reactivo para el uso de los anteriores métodos que comprenden cebadores para amplificar cada una de al menos una secuencia diana de ácido nucleico y al menos un conjunto de sonda, e incluye preferentemente reactivos para amplificar la secuencia o secuencias diana de ácido nucleico.

Los métodos de sondeo y análisis proporcionados en el presente documento se aplican a las muestras que contienen secuencias diana de ácido nucleico monocatenario. Los métodos de la presente invención incluyen el análisis de una secuencia única, el análisis de dos o más secuencias en la misma hebra, el análisis de secuencias en diferentes hebras, y las combinaciones de las anteriores. Una secuencia diana de ácido nucleico monocatenario puede ser una secuencia control añadida a una muestra. Una secuencia diana de ácido nucleico puede ser ADN, ARN o una mezcla de ADN y ARN. Puede provenir de cualquier fuente. Por ejemplo, puede producirse naturalmente, o la secuencia diana puede producirse en forma bicatenaria, en cuyo caso, la secuencia diana monocatenaria se obtiene por separación y purificación de hebras. Si la secuencia diana de ácido nucleico monocatenario es una secuencia de ADNc, se obtiene a partir de una fuente de ARN mediante transcripción inversa.

En muchos casos, una fuente natural no contendrá una secuencia diana en un número de copias suficiente para el sondeo y el análisis. En dichos casos, la secuencia diana monocatenaria se obtiene mediante amplificación, generalmente un método de amplificación que incluye la amplificación exponencial. Los métodos de amplificación útiles incluyen los métodos de amplificación isotérmica y los métodos de amplificación mediante ciclación térmica. La reacción de amplificación puede generar la secuencia diana de ácido nucleico monocatenario directamente, o puede generar la secuencia diana en forma bicatenaria, en cuyo caso la secuencia diana monocatenaria se obtiene mediante separación y purificación de hebras, como se ha indicado anteriormente. Los métodos de amplificación útiles que se pueden emplear incluyen, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), incluyendo la PCR simétrica, la PCR asimétrica y la PCR-LATE, cualquiera de las cuales se puede combinar con la transcripción inversa amplificando las secuencias de ARN, NASBA, SDA, TMA, amplificación en círculo rodante. Si la secuencia diana de ácido nucleico monocatenario es una secuencia de ADNc, el método de amplificación incluirá la transcripción inversa, por ejemplo, RT-PCR. En algunas realizaciones, cuando se utiliza la amplificación no simétrica, se incluyen conjuntos de sondas en la mezcla de reacción de amplificación antes de la amplificación para evitar la contaminación.

Los conjuntos de sondas útiles en los métodos proporcionados en el presente documento incluyen una sonda de señalización y una sonda inactivadora asociada. La sonda de señalización es una sonda de hibridación que emite una señal detectable, preferentemente una señal fluorescente, que se hibrida con una secuencia diana de ácido nucleico monocatenario en una muestra, donde la señal es inactivable mediante la sonda inactivadora asociada. La sonda inactivadora no emite energía luminosa visible. En general, una sonda de señalización tiene un resto fluorescente unido covalentemente. Las sondas de señalización incluyen sondas marcadas con fluoróforos u otros restos fluorescentes, por ejemplo, puntos cuánticos. En algunas realizaciones, se prefieren sondas marcadas con fluoróforos. Un tipo de sonda de señalización es una sonda ResonSense®. Una sonda ResonSense® es un oligonucleótido monocatenario marcado con un fluoróforo que acepta fluorescencia de un colorante de ADN y reemite luz visible a una longitud de onda más larga. El uso de una sonda Reson-Sense® implica el uso de un colorante de ADN bicatenario, una molécula que se vuelve fluorescente cuando se asocia con ADN bicatenario, que en este caso es el híbrido formado cuando la sonda se hibrida a la secuencia diana del ácido nucleico monocatenario. Para el uso de una sonda ResonSense®, un colorante de ADN, por ejemplo, Verde SYBR u Oro SYBR, se incluye en la muestra que contiene la secuencia diana de ácido nucleico monocatenario junto con el conjunto o conjuntos de sondas. El análisis incluye excitar el colorante y la emisión de detección de la sonda o sondas ResonSense®. Las sondas de señalización no unidas no necesitan eliminarse, ya que no se excitan directamente y permanecen monocatenarias. En algunas realizaciones, las sondas de señalización preferidas son sondas inactivadoras; esto es, sondas que emiten poca o ninguna señal cuando están en solución, incluso si se estimulan, pero que no están inactivadas y aun así emiten una señal cuando se hibridan con una secuencia de ácido nucleico monocatenario en una muestra que se está analizando. Las sondas yin-yang son sondas de señalización inactivadas. Una sonda yin-yang es una sonda bicatenaria que contiene un fluoróforo en una hebra y un inactivador no fluorescente que interactúa en otra hebra, que es una hebra más corta. Cuando una sonda yin-yang está en solución a la temperatura de detección, el fluoróforo se inactiva. La secuencia diana de ácido nucleico monocatenario desplaza a la hebra marcada con el inactivador para unirse a la hebra marcada con fluoróforo. En

consecuencia, la hebra marcada con fluoróforo se hibrida a la secuencia diana del ácido nucleico monocatenario y la señaliza. Las sondas de señalización especialmente preferidas para algunas realizaciones proporcionadas en el presente documento son sondas de balizas moleculares, oligonucleótidos que forman horquillas monocatenarias que soportan un agente fluorescente, normalmente un fluoróforo, en un extremo, y un inactivador, normalmente un cromóforo no fluorescente, en el otro extremo. Cuando la sonda está en solución, esta asume una conformación cerrada donde el inactivador interactúa con el agente fluorescente, y la sonda es oscura. Cuando la sonda se hibrida con su diana, sin embargo, se ve forzada a una conformación abierta donde el agente fluorescente está separado del inactivador, y la sonda señaliza. Las parejas de sondas FRET no cumplen los criterios anteriores y, por tanto, no son adecuadas para su uso en la presente invención, ya que sus sondas de señalización, las sondasceptoras, no emiten una señal detectable tras la hibridación; en su lugar, emiten una señal detectable solamente cuando la sonda está marcada con el donante y la sonda está marcada con el aceptor.

En sondas de señalización inactivadas, la inactivación puede conseguirse mediante cualquier mecanismo, normalmente mediante FRET (Transferencia de Energía de Resonancia mediante Fluorescencia) entre un fluoróforo y un resto de inactivación no fluorescente o inactivando el contacto. En algunas realizaciones, las sondas de señalización preferidas son oscuras o prácticamente oscuras para minimizar la fluorescencia del fondo. La inactivación por contacto consigue más generalmente este objetivo, aunque la inactivación de FRET es adecuada con algunas combinaciones de fluoróforo-inactivador y construcciones de sondas.

La sonda inactivadora de un conjunto de sonda es, o incluye una hebra de ácido nucleico que incluye un inactivador no fluorescente. El inactivador puede ser, por ejemplo, un cromóforo no fluorescente tal como dabcylo o un inactivador Black Hole (los inactivadores Black Hole, disponibles de Biosearch Technologies, son inactivadores adecuados, uno u otro de los cuales se recomienda por el fabricante para el uso con un fluoróforo concreto). En algunas realizaciones, las sondas de inactivación preferidas incluyen un cromóforo no fluorescente. En algunas realizaciones, los inactivadores son inactivadores Black Hole. La sonda inactivadora de un conjunto se hibrida con la secuencia diana de ácido nucleico monocatenario adyacente o próxima a la sonda de señalización de tal manera que cuando ambas se hibridan, la sonda inactivadora se inactiva, o se vuelve oscura la sonda de señalización. La inactivación puede ser por transferencia de energía de resonancia mediante fluorescencia (FRET o FET) o mediante toque ("inactivación por colisión" o "inactivación por contacto").

La Fig. 1 representa gráficamente una realización que ilustra el funcionamiento de los conjuntos de sondas en los métodos analíticos proporcionados en el presente documento. En esta realización existen dos conjuntos de sondas, sondas 2, 4 y sondas 6, 8. La sonda 2 es una sonda de señalización, una sonda de baliza molecular soporta el fluoróforo 3. La sonda 6 es también una sonda de señalización, una sonda de baliza molecular soporta el fluoróforo 7. Los fluoróforos 3, 7 son iguales. Las sondas 4, 8 son sondas inactivadoras marcadas solo con los inactivadores Black Hole 5 y 9, respectivamente. Las temperaturas de fusión (Tf) de los híbridos sonda-diana (sondas hibridadas con una secuencia diana 1 de ácido nucleico monocatenario) son como sigue: sonda a Tf 2 > sonda a Tf 4 > sonda a Tf 6 > sonda a Tf 8. A medida que la temperatura de la muestra disminuye desde una temperatura elevada a la cual no se unen las sondas, sondas 2, 4, 6 y 8 se unen a una secuencia diana 1 de ácido nucleico monocatenario de acuerdo con sus características de hibridación. La sonda 2, una sonda de señalización, se une en primer lugar. La Fig. 1, Panel A, representa gráficamente la sonda 2 hibridada a la secuencia 1. A medida que la temperatura de la muestra continúa disminuyendo, la sonda inactivadora 4 se une a la siguiente sonda 2 adyacente de tal manera que el inactivador 5 y el fluoróforo 3 están próximos entre sí o se tocan. La Fig. 1, Panel B, representa gráficamente la sonda 4 hibridada a la secuencia 1 de ácido nucleico monocatenario adyacente a la sonda 2. En este momento, la sonda 2 es oscura, o al menos casi oscura. Si, sin embargo, la sonda de señalización 6 ha comenzado a unirse, emitirá fluorescencia independientemente de las sondas 2, 4. La Fig. 1, Panel C, representa gráficamente la sonda 6 hibridada a la secuencia diana 1 monocatenaria adyacente a la sonda 4. Finalmente, a medida que la temperatura continúa disminuyendo, se unirá la sonda 8, y su inactivador 9 inactivará la emisión de fluorescencia procedente del fluoróforo 7 de la sonda 6. La Fig. 1, Panel D, representa gráficamente la sonda 8 hibridada adyacente a la sonda 6. El análisis mediante hibridación se muestra en la Fig. 1, Panel E, que representa gráficamente el aumento y la disminución de la fluorescencia procedente de los fluoróforos 3, 7 en función de la temperatura. Dichas curvas se pueden obtener como curvas de recocido (hibridación) a medida que disminuye la temperatura, o se pueden obtener como curvas de fusión a medida que aumenta la temperatura. A medida que la temperatura de la muestra disminuye de 70 °C, la curva de fluorescencia 10 del Panel E aumenta en primer lugar a medida que la sonda 2 se hibrida a una secuencia 1 de ácido nucleico monocatenario, a continuación disminuye a medida que la sonda 4 se une, a continuación aumenta de nuevo a medida que la sonda 6 se hibrida, y finalmente disminuye hasta un nivel muy bajo a medida que la sonda 8 se hibrida. Se puede deducir a partir de la curva 10 que cada sonda de señalización tiene una Tf mayor que su sonda inactivadora asociada.

Las sondas de señalización e inactivación útiles en los métodos proporcionados en el presente documento pueden ser específicas de alelo (se hibridan solo a una secuencia diana de ácido nucleico monocatenario perfectamente complementaria en el método) o tolerante al emparejamiento incorrecto (se hibridan a secuencias diana de ácido nucleico monocatenario que contienen uno o más nucleótidos emparejados incorrectamente, o deleciones o adiciones). En algunas realizaciones, una sonda de un conjunto puede ser específica de alelo; y la otra sonda, tolerante al emparejamiento incorrecto. Los experimentos realizados durante el desarrollo de las realizaciones proporcionadas en el presente documento han demostrado que la estructura secundaria de una hebra diana externa

a las secuencias a las cuales se hibridan las sondas puede afectar los resultados de los análisis de hibridación o fusión. Un conjunto de sonda puede incluir una sonda de señalización específica de alelo y una sonda inactivadora específica de alelo, una sonda de señalización tolerante al emparejamiento incorrecto y una sonda inactivadora tolerante al emparejamiento incorrecto, una sonda de señalización específica de alelo y una sonda inactivadora tolerante al emparejamiento incorrecto, o una sonda de señalización tolerante al emparejamiento incorrecto y una sonda inactivadora tolerante de alelo. Una sonda tolerante al emparejamiento incorrecto puede ser perfectamente complementaria con una variante de una secuencia diana variable, o puede ser una sonda consenso que no es perfectamente complementaria a ninguna variante. Múltiples conjuntos de sondas pueden incluir combinaciones de conjuntos de cualquiera de los tipos anteriores. Además, los métodos analíticos proporcionados en el presente documento pueden utilizar uno o más conjuntos de sondas de señalización/inactivación junto con una o más sondas convencionales que señalizan tras la hibridación a su diana, por ejemplo, sondas de balizas moleculares.

Las sondas útiles en los métodos proporcionados en el presente documento pueden ser de ADN, ARN, o una combinación de ADN y ARN. Pueden incluir nucleótidos no naturales, por ejemplo, PNA, LNA, o 2' o-metil ribonucleótidos. Pueden incluir enlaces internucleótidos no naturales, por ejemplo, enlaces fosforotioato. La longitud de una sonda particular depende de su temperatura de fusión deseada (T_f), tanto si esta es específica de alelo o tolerante al emparejamiento incorrecto, y su composición, por ejemplo, el contenido de GC de una sonda de ADN. Hablando de manera general, las sondas específicas de alelo son más cortas que las sondas tolerantes al emparejamiento incorrecto. Por ejemplo, una sonda de baliza molecular de ADN específica de alelo puede tener una secuencia que se hibrida a la diana, el bucle, en el intervalo de 10-25 nucleótidos de longitud, con un tallo bicatenario de 4-6 nucleótidos de longitud. La sonda de baliza molecular de ADN tolerante al emparejamiento incorrecto puede tener un bucle algo más largo, generalmente de no más de 50 nucleótidos de longitud, y un tallo bicatenario más corto, preferentemente tanto de uno como de dos nucleótidos de longitud.

En algunas realizaciones, cada sonda de señalización tiene una sonda de inactivación separada asociada con esta. En algunas realizaciones, sin embargo, una sonda puede ser una parte de dos conjuntos de sondas. Por ejemplo, una sonda inactivadora puede marcarse con un inactivador en cada extremo, por lo cual los extremos interactúan con diferentes sondas de señalización, en cuyo caso tres sondas comprenden dos conjuntos de sondas. Asimismo, algunas realizaciones pueden utilizar ambos extremos de una sonda de señalización inactivada, por ejemplo, una sonda de señalización de baliza molecular que tiene un fluoróforo en un extremo y un inactivador en el otro extremo. El fluoróforo interactúa con una sonda inactivadora, que comprende un conjunto, y el inactivador interactúa con una sonda de señalización, que comprende otro conjunto.

Para el análisis de una muestra, los conjuntos de sondas que se usan son distinguibles de forma detectable, por ejemplo, mediante longitud de onda de emisión (color) o temperatura de fusión (T_f). Hacer un conjunto de sondas distinguible mediante T_f de otros conjuntos de sondas se puede llevar a cabo de manera adecuada. Por ejemplo, todas las sondas de señalización en un ensayo pueden tener T_f diferentes. Como alternativa, todas las sondas de señalización podrían tener la misma T_f pero las sondas inactivadoras podrían tener T_f diferentes. Algunos detectores de fluorescencia pueden resolver hasta ocho fluoróforos coloreados de manera diferente; otros, solo cuatro. El mismo emisor de fluorescencia, por ejemplo, el mismo fluoróforo, puede utilizarse en más de una sonda de señalización para una muestra, si la señalización de la sonda puede diferenciarse de la detección mediante sus temperaturas de fusión. En los ensayos proporcionados en el presente documento, las T_f deben separarse en al menos 2 °C, preferentemente en al menos 5 °C y, en determinadas realizaciones en al menos 10 °C. El espacio de temperatura disponible limita el uso de múltiples sondas de señalización que tienen el mismo fluoróforo. Si se diseña un ensayo para el análisis de hibridación y/o fusión en un intervalo de 80 °C a 20 °C, por ejemplo, se pueden utilizar más conjuntos de sondas que comparten un color que puede utilizarse en un ensayo diseñado para dicho análisis en un intervalo de 70 °C a 40 °C, para el cual se puede ser capaz de utilizar solo conjuntos de 3-5 sondas que comparten un color. Utilizando cuatro colores y solo dos conjuntos de sondas que comparten cada color, un detector de cuatro colores resulta ser equivalente a un detector de ocho colores utilizado con ocho sondas distinguibles solo por el color. Con el uso de tres conjuntos de sondas que comparten cada uno de cuatro colores, se podrían distinguir doce conjuntos de sondas diferentes.

Se prefiere generalmente que las sondas inactivadoras tengan T_f inferiores, que sus sondas de señalización asociadas. Con esta relación, la sonda de señalización emite una señal dependiente de la temperatura a lo largo del intervalo de temperaturas de hibridación de ambas sondas del conjunto a medida que la temperatura de la solución disminuye durante un análisis de la curva de hibridación, y a lo largo del intervalo de temperaturas de fusión de ambas sondas del conjunto a medida que aumenta la temperatura de la solución para un análisis de la curva de fusión. Si, por otra parte, la sonda inactivadora de un conjunto de sondas tiene una T_f mayor que su sonda de señalización asociada, la emisión de la sonda de señalización se inactiva a lo largo del intervalo de temperaturas de hibridación y el intervalo de temperaturas de fusión de ambas sondas del conjunto, y no se emite señal fluorescente para la detección. Se puede discernir esto mediante el examen de la curva de hibridación o la curva de fusión. La ausencia de señal proporciona menos información acerca de la secuencia diana de ácido nucleico monocatenario que la de una curva de fluorescencia de la sonda como una función de la temperatura. En algunas realizaciones, cuando se usan sondas tolerantes al emparejamiento incorrecto para el análisis de una secuencia variable, se usan sondas inactivadoras con las T_f inferiores que las de sus sondas de señalización asociadas con respecto a todas pero no una de las variantes de la secuencia diana. Si una sonda inactivadora tiene una T_f mayor frente a solo una

variante, el fallo de la señal revelará esta variante, siempre que el fallo de la muestra incluya la secuencia diana del ácido nucleico monocatenario (particularmente el fallo de una reacción de amplificación) para una sonda control o para otro conjunto de sondas para la secuencia diana del ácido nucleico monocatenario. De manera similar, si no se conocen todas las variantes, dicho fallo de señal revelará la presencia de una variante desconocida. En algunas realizaciones, se prefiere que en un ensayo que utiliza múltiples conjuntos de sondas para al menos una secuencia diana de ácido nucleico, la sonda inactivadora de al menos un conjunto de sondas tiene una T_f menor que la de su sonda de señalización asociada.

Temperatura de fusión, T_f , significa la temperatura a la cual un híbrido de ácido nucleico, por ejemplo, un híbrido sonda-diana o un híbrido cebador-diana, es 50% bicatenario y 50% monocatenario. Para un ensayo particular, se puede medir la T_f relevante. La T_f puede calcularse también utilizando técnicas conocidas. En algunas realizaciones, las técnicas preferidas se basan en el método del "vecino más próximo" (Santa Lucia, J. (1998), PNAS (USA) 95: 1460-1465; y Allawi, H.T. y Santa Lucia, J. (1997), Biochem. 36: 10581-10594) en programas informáticos que utilizan la fórmula del "vecino más próximo" están disponibles para el uso en el cálculo de la sonda y la T_f del cebador frente a sus secuencias diana perfectamente complementarias y frente a las secuencias diana con emparejamiento incorrecto. Para los ejemplos en esta memoria descriptiva, se ha utilizado el programa Visual OMP (DNA Software, Ann Arbor, Michigan, EE.UU.), que utiliza el método del vecino más próximo para el cálculo de la T_f . En esta solicitud, la T_f de un cebador o sonda se proporciona algunas veces con respecto a una secuencia a la cual se hibrida. Sin embargo, si no se proporciona dicha secuencia, para las sondas tolerantes al emparejamiento incorrecto que son perfectamente complementaria con una variante de una secuencia diana de ácido nucleico monocatenario, la T_f es la T_f frente a la variante perfectamente complementaria. En muchas realizaciones existirá una secuencia diana que es perfectamente complementaria a la sonda. Sin embargo, los métodos pueden utilizar uno o más cebadores o sondas tolerantes al emparejamiento incorrecto que son "cebadores consenso" o "sondas consenso". Un cebador o sonda consenso es un cebador o sonda que no es complementario con ninguna secuencia diana variante o, si no se conocen todas las posibles secuencias diana, para cualquier secuencia esperada o conocida. Un cebador consenso es útil para cebar múltiples variantes de una secuencia diana a una temperatura de hibridación de la amplificación seleccionada. Una sonda consenso que es útil para encoger el espacio de temperatura necesario para el análisis de múltiples variantes. Para una sonda o cebador consenso, si no se proporciona la secuencia diana correspondiente, la T_f se refiere a la T_f más elevada frente a las variantes conocidas, lo que permite la posibilidad de que una variante desconocida puede ser más complementaria al cebador o la sonda y, por tanto, tiene una T_f cebador-diana o T_f sonda-diana superior.

Los ensayos proporcionados en el presente documento pueden utilizar concentraciones de sondas que son mayores que o menores que la concentración del ácido nucleico diana. Se conocen las concentraciones de sondas sobre la base de la información proporcionada por el fabricante de la sonda. En el caso de las secuencias diana que no están amplificadas, se conocen las concentraciones diana sobre la base del recuento directo o indirecto del número de células, núcleos, cromosomas, o moléculas que están presentes en la muestra, así como cuando el número esperado de secuencias diana usualmente presentes por célula, núcleo, cromosoma, o molécula. En el caso de las secuencias diana que están amplificadas, existen numerosas maneras de establecer como se han generado muchas copias de una secuencia diana en el curso de una reacción de amplificación. Por ejemplo, en el caso de una reacción de amplificación de la PCR-LATE, el número de amplicones monocatenarios puede calcularse como sigue: utilizando una sonda de señalización sin un inactivador (en el caso de una sonda de señalización inactivada que significa la sonda menos el inactivador) en una concentración limitante tal como 50 nM y su correspondiente sonda inactivadora en una cantidad en exceso tal como 150 nM, el número de ciclos hace disminuir la fluorescencia a cero (o, en términos prácticos, a su nivel de fondo mínimo) es proporcional a la velocidad de amplificación de amplicones monocatenario. Cuando la fluorescencia alcanza el cero (nivel de fondo mínimo), todas las sondas de señalización han alcanzado sus dianas, y la concentración de los amplicones excede la de la sonda de señalización. En el Ejemplo 10 se presenta otro método para estimar la concentración del amplicón en la amplificación PCR-LATE de la solicitud de patente publicada EP 1805199 A2. En determinadas realizaciones puede continuarse una reacción de amplificación hasta que el amplicón que se ha producido alcanza una "concentración terminal". Los experimentos realizados durante el desarrollo de las realizaciones proporcionadas en el presente documento han demostrado que una amplificación PCR-LATE que ha comenzado con diferentes cantidades de dianas tiende a producir eventualmente la misma concentración máxima de amplicón (la "concentración terminal"), incluso aunque la amplificación haya comenzado con una elevada cantidad inicial de diana, alcanza este máximo en unos pocos ciclos que dan lugar a que la amplificación comience con una baja cantidad inicial de diana. Conseguir que la concentración terminal comience con una cantidad baja de diana puede requerir extender la amplificación a lo largo de 70 o incluso 80 ciclos.

Algunas realizaciones utilizan conjuntos de sondas en los cuales la concentración de la sonda de señalización es menor que la concentración de su sonda inactivadora asociada. Esto asegura que, cuando ambas sondas se hibridan a sus al menos secuencias diana de ácido nucleico, la sonda de señalización se inactiva hasta el grado más grande posible, minimizando por tanto la fluorescencia de fondo. Se apreciará que la fluorescencia de fondo en un ensayo es el fondo acumulado de cada sonda de señalización de un color dado y que las sondas de diferente color pueden contribuir adicionalmente a la señal de fondo.

Los métodos proporcionados en el presente documento incluyen analizar la hibridación de los conjuntos de sondas

de las secuencias diana de ácido nucleico monocatenario. En los métodos proporcionados en el presente documento, se analiza la hibridación de las sondas de señalización y de las sondas inactivadoras como una función de la temperatura a identificar, caracterizar o analizar de otra manera al menos una secuencia diana de ácido nucleico en una muestra. En algunas realizaciones, el análisis incluye obtener una curva o, si se usan múltiples colores, curvas de señales a partir de sondas de señalización a medida que disminuye la temperatura de la muestra (véase la FIG. 1, Panel E) u obtener una curva o curvas de señales a medida que aumenta la temperatura de la muestra o ambas. Se sabe que las formas de los dos tipos de curvas no son necesariamente idénticas debido a las estructuras secundarias. Se pueden comparar cualquiera o ambas de aquellas curvas con una curva previamente establecida para una secuencia diana de ácido nucleico monocatenario conocida como parte del análisis, por ejemplo, identificar la secuencia diana de ácido nucleico monocatenario que se está sondando. Se pueden utilizar también las curvas derivadas para obtener, por ejemplo, la T_f de una sonda de señalización frente a una secuencia diana de ácido nucleico. Esto no es siempre necesario, y puede no ser deseable, utilizar las curvas de fluorescencia completas o sus derivados. En determinadas realizaciones el análisis de hibridación de las sondas de señalización y de las sondas inactivadoras incluye obtener lecturas de la fluorescencia a una o a varias temperaturas a medida que la temperatura de la muestra disminuye o aumenta, donde aquellas lecturas reflejan un efecto sobre cada sonda de señalización debido a su sonda inactivadora asociada. Por ejemplo, si se desea distinguir entre variantes conocidas de una secuencia diana, y se conocen a partir de las curvas de hibridación de las variantes qué fluorescencia a dos temperaturas distingue las variantes, se necesita adquirir fluorescencia a solo aquellas dos temperaturas para cualquier comparación directa o para el cálculo de las relaciones que se pueden comparar. En la mayoría de las realizaciones, el análisis incluirá el aumento de la señal, la disminución de la señal o ambos, a partir de cada sonda de señalización.

En los métodos analíticos proporcionados en el presente documento, la provisión de al menos una secuencia diana de ácido nucleico puede incluir la amplificación del ácido nucleico. Algunos métodos preferidos son aquellos que generan la secuencia o secuencias diana en forma monocatenaria. La amplificación PCR-LATE de secuencias de ADN o secuencias de ARN (RT-LATE-PCR) se prefiere especialmente en algunas realizaciones. Se describen ensayos y ensayos de amplificación PCR-LATE en, por ejemplo, la patente europea EP 1.468.114 y la patente correspondiente de los Estados Unidos 7.198.897; y la solicitud de patente europea publicada EP 1805199 A2; Sanchez et al., (2004) Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 101: 1933-1938; y Pierce et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 102: 8609-8614. La PCR-LATE es un método de amplificación del ADN no simétrico que emplea el proceso de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando un cebador de oligonucleótido (el "cebador en exceso") en al menos un exceso de cinco veces con respecto al otro cebador (el "cebador limitante"), que se utiliza por sí mismo a baja concentración, hasta 200 nM, de tal manera que se agota en ciclos de la PCR aproximadamente suficientes para producir un amplicón bicatenario detectable de manera fluorescente. Después que se agota el cebador limitante, la amplificación continúa durante un número deseado de ciclos para producir un producto monocatenario que utiliza solo el cebador en exceso, denominado en el presente documento hebra del cebador en exceso. La PCR-LATE tiene en cuenta la temperatura de fusión ajustada a la concentración del cebador limitante al inicio de la amplificación, $T_f[0]L$, la temperatura de fusión ajustada a la concentración del cebador en exceso al inicio de la amplificación, $T_f[0]X$, y la temperatura de fusión del producto de amplificación monocatenario ("amplicón"), T_fA . Para los cebadores de PCR-LATE, $T_f[0]$ se puede determinar empíricamente, según sea necesario cuando se utilizan nucleótidos no naturales, o se calcula de acuerdo con el método del "vecino más próximo" (Santa Lucia, J. (1998), PNAS (USA) 95: 1460-1465; y Allawi, H.T. y Santa Lucia, J. (1997), Biochem. 36: 10581-10594) utilizando un ajuste de la concentración salina, que en las amplificaciones de los inventores es generalmente la concentración 0,07 M del catión monovalente. Para la PCR-LATE se calcula la temperatura de fusión del amplicón utilizando la fórmula: $T_f = 81,5 + 0,41 (\%G+\%C) - 500/L + 16,6 \log [M]/(1 + 0,7 [M])$, donde L es la longitud de nucleótidos y [M] es la concentración molar de los cationes monovalentes. Se pueden calcular las temperaturas de fusión de los plegamientos lineales, o aleatorios, como para los cebadores. Se pueden determinar las temperaturas de fusión de las sondas estructuradas, por ejemplo, las sondas de balizas moleculares, empíricamente o se pueden aproximar como la T_f de la porción (el bucle o el bucle más una porción del tallo) que se hibrida al amplicón. En la reacción de amplificación PCR-LATE, $T_f[0]L$ es preferentemente no superior a 5 °C por debajo de $T_f[0]X$, más preferentemente al menos tan alta e incluso más, preferentemente mayor de 3-10 °C, y la T_fA es preferentemente no más de 25 °C mayor de $T_f[0]X$, y para algunas realizaciones preferidas preferentemente no superior a aproximadamente más de 18°.

La PCR-LATE es una amplificación de la PCR no simétrica que, entre otras ventajas, proporciona un gran "espacio de temperatura" en el cual pueden emprenderse acciones. Véase el documento WO 03/054233 y Sanchez et al. (2004), citados anteriormente. Determinadas realizaciones de las amplificaciones PCR-LATE incluyen el uso de sondas de hibridación, en este caso, conjuntos de sondas de señalización y de sondas inactivadoras, cuyas T_f están por debajo, más preferentemente al menos 5 °C por debajo, de la temperatura de hibridación del cebador promedio durante la amplificación exponencial tras los primeros ciclos. Los conjuntos de sondas de señalización e inactivadoras se incluyen en las mezclas de amplificación PCR-LATE antes del inicio de la amplificación. Un colorante de ADN, si se usa, también se puede incorporar a la mezcla de reacción antes del inicio de la amplificación.

Los métodos de amplificación y detección proporcionados en el presente documento permiten ensayos homogéneos de un único tubo para detectar variantes de una secuencia variable concreta, por ejemplo, una secuencia de ARN

ribosómico, cuyas variantes se encuentran en un grupo de organismos, incluyendo, pero sin limitarse a bacterias, hongos, protozoos, seres humanos y otros animales, plantas verdes, y algas verde azuladas, donde la secuencia variable concreta está flanqueada por secuencias que están conservadas, o relativamente conservadas, entre los miembros del grupo. A continuación se pueden amplificar variantes de la secuencia variable mediante un método de
 5 amplificación dependiente de cebador, preferentemente un método de amplificación que genera secuencias diana de ácido nucleico monocatenario, tales como el método de amplificación del ADN con la reacción en cadena de la polimerasa no simétrica (PCR), de forma más preferente PCR-LATE (con transcripción inversa, si las variantes son ARN), utilizando solo unas pocas parejas, algunas veces solo una única pareja, de cebadores que se hibridan con las secuencias flanqueantes. Los conjuntos de sondas de señalización y de sondas inactivadoras se incluyen en la
 10 mezcla de la reacción de amplificación, y el producto o productos de la amplificación se analizan con los métodos analíticos proporcionados en el presente documento.

Se describen también en el presente documento kits que comprenden combinaciones de sondas de señalización e inactivadoras, que pueden denominarse "conjuntos de oligonucleótidos", para uso en los métodos anteriores, así
 15 como kits que incluyen adicionalmente alguno o todos los cebadores, reactivos de amplificación, tales como tampones de amplificación, ADN polimerasa y, cuando sea adecuado, transcriptasa inversa. Los kits pueden incluir también reactivos control (por ejemplo, controles positivos y negativos) o cualesquiera otros componentes que sean útiles, necesarios, o suficientes para llevar a la práctica cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, así como las instrucciones, programas informáticos de análisis (por ejemplo, que facilitan la recogida,
 20 análisis, presentación, y notificación de los datos), dispositivos informáticos, instrumentos, u otros sistemas o componentes.

Se describen también en el presente documento mezclas de reacción para llevar a cabo los métodos de ensayo de amplificación de la presente invención. Dichas mezclas de reacción incluyen reactivos para proporcionar la
 25 secuencia o secuencias diana de ácido nucleico monocatenario que se van a analizar, y conjuntos de sondas de señalización e inactivadoras para el análisis. Algunas mezclas de reacción incluyen reactivos para la amplificación no simétrica, más preferentemente amplificación mediante PCR-LATE y RT-LATE-PCR.

Breve descripción de los dibujos

30 La Fig. 1, Paneles A-D, son esquemas que muestran la hibridación de dos conjuntos de sondas de señalización e inactivadoras de una secuencia diana de ácido nucleico monocatenario en una muestra en función de la temperatura; y la Fig. 1, Panel E, muestra la fluorescencia frente a la temperatura de la muestra.

35 La Fig. 2 es una representación esquemática de una secuencia de ácido nucleico monocatenario del Ejemplo 1 que muestra las localizaciones de unión de la sonda y las localizaciones de unión al cebador.

Las Figs. 3A y 3B presentan los análisis de la curva de fusión de las amplificaciones descritas en el Ejemplo 1 para varias hebras.

Las Figs. 4A-4D presentan las curvas de fusión derivadas de mezclas de hebras TB en diversas proporciones como se ha descrito en el Ejemplo 2.

40 La Fig. 5 es una representación esquemática de una secuencia de ácido nucleico monocatenario del Ejemplo 3 que muestra las localizaciones de unión de la sonda y las localizaciones de unión al cebador.

La Fig. 6 es una representación esquemática de otra secuencia de ácido nucleico monocatenario del Ejemplo 3 que muestra las localizaciones de unión de la sonda y las localizaciones de unión al cebador.

45 Las Figs. 7A-7C son gráficas de fluorescencia frente a temperatura para cada uno de los fluoróforos en la muestra del Ejemplo 3.

La Fig. 8 es una representación esquemática de una secuencia de ácido nucleico monocatenario del Ejemplo 4 que muestra las localizaciones de unión de la sonda y las localizaciones de unión al cebador.

Las Figs. 9A-9C son gráficas de fluorescencia frente a temperatura para cada uno de los fluoróforos en el Ejemplo 4 frente a una secuencia diana de ácido nucleico monocatenario.

50 Las Figs. 10A-10C son gráficas de fluorescencia frente a temperatura para cada uno de los fluoróforos en el Ejemplo 4 frente a otra secuencia diana de ácido nucleico monocatenario.

Las Figs. 11A-11C son códigos de barras realizados a partir de los datos de la curva de fluorescencia que se muestran en la FIG. 9.

55 La Fig. 12 es una representación esquemática de una región seleccionada del gen 16s de algunas especies de bacterias que muestran las localizaciones de unión de la pareja de cebadores y de los cuatro conjuntos de sondas de señalización e inactivadoras utilizados en el Ejemplo 5.

La Fig. 13 es una gráfica que presenta las curvas de hibridación (fluorescencia frente a temperatura) de los conjuntos de sondas del Ejemplo 5 tras la amplificación de la región seleccionada partiendo del ADN genómico de diferentes especies de bacterias.

60 La Fig. 14 es una gráfica que presenta las primeras curvas derivadas (-dF/dT) de las curvas de hibridación de la Fig. 13.

La Fig. 15 es una gráfica que presenta las curvas de hibridación de los conjuntos de sondas del Ejemplo 5 tras la amplificación de las mezclas del ADN genómico descrito en el Ejemplo 6.

65 La Fig. 16 es una representación esquemática de una región seleccionada del gen 16s de *Acinetobacter baumannii* que muestra las localizaciones de unión de la pareja de cebadores y cuatro conjuntos de sondas de señalización e inactivadoras usadas en el Ejemplo 7.

La FIG 17A es una gráfica que presenta las curvas de hibridación del fluoróforo Cal Red 61D tras la amplificación de diferentes especies diana en el Ejemplo 7.

La FIG 17B es una gráfica que presenta las curvas de hibridación del fluoróforo Quasar 67D tras la amplificación de diferentes especies diana en el Ejemplo 7.

5 La Fig. 18 es una gráfica que presenta las curvas de hibridación (fluorescencia frente a temperatura) para la reacción de amplificación descrita en el Ejemplo 4.

La Fig. 19 es una gráfica ilustrativa que muestra como una curva de hibridación (Fluorescencia frente a temperatura) de una reacción tal como se describe en el Ejemplo 4 cambia con concentraciones crecientes de moléculas diana.

10 La Fig. 20 es una gráfica que presenta curvas de fusión normalizadas (fluorescencia, temperatura) del conjunto de sondas del Ejemplo 9 tras la amplificación de los alelos SNP homocigóticos y de la mezcla heterocigótica.

La Fig. 21 es una gráfica que presenta las curvas de primera derivada ($-dF/dT$) de las curvas de fusión de la Fig. 20.

15 La Fig. 22 es una gráfica que presenta la primera derivada ($-dF/dT$) de las curvas de hibridación posteriores a la amplificación de doce muestras MRSA que utilizan el conjunto único de sondas ON/OFF descrito en el Ejemplo 10.

Descripción detallada

20 En algunas realizaciones, las sondas de señalización útiles son sondas de hibridación que emiten una señal detectable por encima de la de fondo cuando se hibridan con una secuencia diana. Algunas sondas de señalización preferidas son sondas inactivadas, esto es, sondas cuya fluorescencia se inactiva cuando las sondas están en solución. En algunas realizaciones, las sondas de señalización son sondas de baliza molecular, que son oligonucleótidos monocatenarios que tienen un extremo fluoróforo de señalización unido covalentemente y un resto inactivador, por ejemplo, otro fluoróforo, preferentemente un inactivador no fluorescente, por ejemplo, un inactivador Dabeyl o un inactivador Black Hole, en el otro extremo. Las sondas de baliza molecular tienen una secuencia complementaria diana central flanqueada por secuencias brazos que se hibridan entre sí en ausencia de la secuencia diana, haciendo que la sonda adopte una conformación de tallo-bucle donde el resto de inactivación inactiva la fluorescencia procedente del fluoróforo de señalización por transferencia de energía de resonancia mediante fluorescencia (FRET) o mediante inactivación por colisión (o contacto). Las sondas de baliza molecular tienen una baja fluorescencia de fondo debido a una inactivación eficaz de la estructura tallo-bucle. Cuando la secuencia complementaria diana, esto es, el bucle o el bucle más alguno o todos los nucleótidos del tallo, se hibrida con una secuencia diana, las secuencias del brazo se separan entre sí, y el resto de inactivación de la sonda deja de inactivar la fluorescencia del fluoróforo de señalización. Véase Tyagi y Kramer (1996) *Nature Biotechnology* 14: 303-308; y El-Hajj et al. (2001) *J. Clin. Microbiology* 39: 4131-4137. Se pueden usar también otros tipos de sondas de hibridación de oligonucleótidos que emiten una señal fluorescente detectable tras la hibridación. Estos incluyen, por ejemplo, sondas lineales monocatenarias marcadas en extremos opuestos con un fluoróforo de señalización y un fluoróforo inactivador. (véase, Livak et al. (1995) *PCR Methods Appl.* 357-362); sondas de oligonucleótidos bicatenarios que tienen un fluoróforo de señalización en una hebra y un resto de inactivación en la otra hebra (véase Li et al. (2002) *Nucl. Acid. Res.* 30(2)e5); y sondas ResonSense®, sondas monocatenarias lineales marcadas con un fluoróforo de señalización que emite energía recibida mediante FRET de un colorante de ADN tal como Verde SYBR que se asocia con el híbrido sonda-diana (véase la publicación de patente de los Estados Unidos 2002/0119450).

45 Las sondas inactivadoras pueden ser estructuralmente similares a las sondas de señalización pero sin un fluoróforo de señalización, esto es, solamente con un resto inactivador. Como las sondas inactivadoras no contribuyen a la fluorescencia de fondo, pueden ser sondas lineales. Para una sonda inactivadora que se "asocia" a una sonda de señalización, esto es, que pueda inactivar la sonda de señalización cuando ambas se hibridan a la secuencia diana del ácido nucleico monocatenario que se está analizando, el fluoróforo de señalización de la sonda de señalización se localiza en o próximo al extremo más cercano a la sonda inactivadora, y el resto de inactivación de la sonda inactivadora se localiza en o próximo al extremo de la sonda inactivadora, de tal manera que el fluoróforo y el resto de inactivación pueden interactuar mediante FRET o por inactivación con contacto. En algunas realizaciones, los restos de inactivación para las sondas inactivadoras son cromóforos no fluorescentes tales como los inactivadores Dabeyl y Black Hole.

55 Las sondas de señalización y las sondas de inactivación pueden ser tanto específicas de secuencia como tolerantes al emparejamiento incorrecto. Una sonda específica de secuencia se hibrida en el ensayo solo con una secuencia diana que es perfectamente complementaria de la sonda. Una sonda tolerante al emparejamiento incorrecto se hibrida en el ensayo, no solo con una secuencia diana que sea perfectamente complementaria de la sonda, sino también con variaciones de la secuencia diana que contienen uno o más emparejamientos incorrectos debido a las sustituciones, adiciones o deleciones. Para las sondas tolerantes al emparejamiento incorrecto, cuanto mayor es la variación de la diana de complementariedad perfecta, menor es la T_f del híbrido sonda-diana. Las combinaciones de las sondas específicas de secuencia y tolerantes con el emparejamiento incorrecto se pueden usar en un ensayo único. Si una sonda es específica de secuencia, cualquier emparejamiento incorrecto en la secuencia diana hará que la sonda no se hibride, y esta falta de hibridación se mostrará en la curva de fusión y en la curva derivada. Por ejemplo, si una sonda de señalización se hibrida, produciendo un aumento en la fluorescencia, pero su sonda inactivadora asociada no se hibrida, la fluorescencia no disminuirá a medida que disminuye la temperatura a lo largo

de las Tf de la sonda inactivadora, lo que revela que la sonda inactivadora no se ha hibridado e indica una mutación diana en la secuencia complementaria de la sonda inactivadora. Esto es un resultado satisfactorio, si lo que se desea es determinar si existe o no alguna mutación. Esto no es satisfactorio, sin embargo, si lo que se desea es determinar cuál de varias posibles mutaciones de esta secuencia está presente. Por este motivo, es preferible que la sonda inactivadora asociada sea tolerante con el emparejamiento incorrecto, de tal manera que se pueden distinguir diferentes mutaciones por sus diferentes efectos en la curva de fusión (y en la curva derivada) debido a diferentes efectos de la Tf de diferentes mutaciones.

En algunas realizaciones preferidas, una sonda de señalización de un conjunto tiene una Tf mayor con respecto a la secuencia diana del ácido nucleico monocatenario que se asocia a su sonda inactivadora. Con esta relación, a medida que una muestra se somete a un análisis de fusión, por ejemplo, a medida que aumenta la temperatura aumenta, la señal aumenta al principio a medida que la sonda inactivadora se elimina por fusión y a continuación disminuye a medida que la sonda de señalización se elimina por fusión. Con la relación opuesta, la señal permanece inactivada a medida que la sonda de señalización de la Tf inferior se elimina por fusión y a continuación no aumenta a medida que la sonda inactivadora de la Tf superior se elimina por fusión. La relación preferida proporciona, por tanto, más información. En algunas realizaciones, se prefiere que la sonda inactivadora de un conjunto reduzca la señal de su sonda de señalización asociada en un grado muy amplio. En dichas realizaciones, se prefiere que la concentración de la sonda inactivadora iguale o exceda la concentración de la sonda de señalización. Para maximizar la amplitud de la señal, determinadas realizaciones utilizan concentraciones de sondas que están en exceso con respecto a la secuencia diana de ácido nucleico monocatenario, garantizando de esta forma que todas o casi todas las copias de la secuencia diana tengan sondas hibridadas.

Los métodos proporcionados en el presente documento incluyen el uso de un único conjunto de sondas de señalización e inactivadoras interactuantes. Los métodos incluyen también el uso de múltiples conjuntos de sondas de señalización e inactivadoras interactuantes, donde cada sonda de señalización es distinguible de forma detectable de las otras. La distinción de las sondas fluorescentes puede ser mediante color (longitud de onda de emisión), mediante la Tf, o mediante una combinación de color y Tf. Se pueden usar múltiples conjuntos de sondas interactuantes para cuestionar una única secuencia diana o múltiples secuencias diana en una muestra, incluyendo múltiples secuencias diana en la misma hebra diana o múltiples secuencias diana en diferentes hebras. La detección multiplete de múltiples secuencias diana puede utilizar, por ejemplo, uno o más conjuntos de sondas de señalización/inactivadoras específico de cada secuencia diana. En algunas realizaciones, los métodos multiplexados utilizan un color fluorescente diferente para cada secuencia diana. Algunas realizaciones utilizan el mismo color para dos secuencias diana diferentes, lo que permite disponer de un espacio de temperatura.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden analizar la hibridación de los conjuntos de sondas de señalización/inactivadoras para una o más secuencias diana de ácido nucleico monocatenario en función de la temperatura. La señal, preferiblemente la señal fluorescente, procedente de la sonda o sondas de señalización puede adquirirse a medida que disminuye (hibridación) o aumenta (fusión) la temperatura de la muestra. El análisis puede incluir la adquisición de una curva de hibridación o fusión completa, incluyendo las señales de aumento y disminución procedentes de cada sonda de señalización, como se ilustra en la Fig. 1, Panel E. Como alternativa, el análisis puede basarse solamente en el aumento de la señal o en la disminución de la señal. El análisis puede utilizar solamente señales a temperaturas seleccionadas en lugar de todas las temperaturas pertinentes a la hibridación o a la fusión. Se puede digitalizar el análisis realizado para alguna o todas las temperaturas para crear una firma para una secuencia diana, por ejemplo, un código de barras tal como se describe en el Ejemplo 4 y se muestra en la Fig. 11. El análisis puede incluir la comparación de la hibridación de una secuencia diana de un ácido nucleico monocatenario con la hibridación de secuencias diana conocidas que se han establecido previamente, por ejemplo, una compilación de curvas de fusión de especies conocidas o una tabla de datos digitalizados de especies conocidas.

En los métodos proporcionados en el presente documento, se pueden proporcionar una o más secuencias diana de ácidos nucleicos conocidos que se van a analizar mediante la amplificación del ácido nucleico, generalmente una amplificación exponencial. Se puede usar cualquier método de amplificación del ácido nucleico adecuado. Los métodos de amplificación preferidos son aquellos que generan un producto amplificado (amplicón) en forma monocatenaria de tal manera que no se requiere la eliminación de hebras complementarias procedentes de las secuencias diana monocatenarias que se van a analizar. Los conjuntos de sondas se pueden incluir en dichas mezclas de la reacción de amplificación antes del inicio de la amplificación, de forma que los recipientes de reacción que contienen el producto amplificado no necesiten abrirse. Cuando la amplificación tiene lugar en presencia de conjuntos de sondas, se prefiere que el sistema esté diseñado de tal manera que las sondas no interfieran con la amplificación. En algunas realizaciones se utiliza un método de la PCR no simétrico tal como una PCR asimétrica o, se utiliza la PCR-LATE para generar copias bicatenarias. Puede combinarse la amplificación de la PCR con la transcripción inversa para generar amplicones a partir de dianas de ARN. Por ejemplo, la transcripción inversa puede combinarse con la PCR-LATE para generar amplicones de ADN que corresponden a dianas de ARN o a los complementos de dianas de ARN. En algunas realizaciones, no se prefieren los métodos de amplificación que generan solamente amplicones bicatenarios, porque se requiere el aislamiento de secuencias diana en forma monocatenaria, y el análisis de la curva de fusión es más difícil con amplicones bicatenarios debido a la tendencia de los dos amplicones a colapsar y eyectar las sondas de hibridación. En algunas realizaciones, los métodos

proporcionados en el presente documento no utilizan generación de señales detectables mediante la digestión de las sondas de señalización, tal como se produce en ensayos de amplificación de la 5' nucleasa. En la reacción de amplificación de la PCR, por ejemplo, se puede conseguir evitar la digestión de la sonda utilizando tanto sondas cuyas Tf están por debajo de la temperatura de extensión del cebador, utilizando sondas tales como las que comprenden 2'-O-metil ribonucleótidos que resisten la degradación por las ADN polimerasas, o utilizando ADN polimerasas que carecen de actividad 5'-exonucleasa. La evitación de la interferencia de la sonda con las reacciones de amplificación se lleva a cabo utilizando sondas cuyas Tf están por debajo de la temperatura de extensión del cebador de tal manera que las sondas eliminan por fusión sus secuencias complementarias durante la extensión del cebador y, de manera más preferida, durante la hibridación del cebador, al menos la hibridación del cebador tras los primeros ciclos de amplificación. Por ejemplo, en el método de ensayo de amplificación del Ejemplo 1, el método de amplificación de la PCR-LATE utiliza la PCR en dos etapas con una temperatura de hibridación del cebador/extensión del cebador de 75 °C en presencia de un conjunto de sondas de baliza molecular tolerantes con el emparejamiento incorrecto que tienen Tf para las secuencias diana naturales (con las cuales las sondas fueron perfectamente complementarias) que variaban de 75 °C a 50 °C, lo que garantiza que ninguna de las sondas interfirió significativamente con la amplificación de la secuencia diana.

En la amplificación mediante PCR-LATE, por ejemplo, la hebra del Cebador en exceso es el amplicón monocatenario al que se hibrida la sonda. Por tanto, esta es o contiene la secuencia de ácido nucleico monocatenario que se analiza. Su extremo 5' es el Cebador en exceso, y su extremo 3' es el complemento del Cebador limitante. Si la secuencia que se va a analizar se encuentra entre el Cebador en exceso y el Cebador limitante, tanto la secuencia de partida que se amplifica como la hebra del Cebador en exceso contienen esta secuencia. Si en la secuencia de partida que se va a amplificar la secuencia deseada que se va a analizar incluye una parte de cualquier región de cebado, se requiere que el cebador sea perfectamente complementario de dicha parte de tal manera que la hebra de Cebador en exceso contenga la secuencia deseada. Los cebadores no necesitan ser perfectamente complementarios de otras porciones de las regiones de cebado. Algunas realizaciones de los métodos proporcionan secuencias diana de ácidos nucleicos monocatenarios que se van a analizar mediante reacciones de amplificación que utilizan "cebadores consenso" que no son perfectamente complementarios de la secuencia de partida que se va a amplificar, y debe tenerse cuidado para garantizar que la hebra del Cebador en exceso, que es o contiene la secuencia diana monocatenaria que se analiza realmente, incluye la secuencia deseada.

Se ilustran las características y las realizaciones de los métodos proporcionados en el presente documento en los Ejemplos que se muestran a continuación junto con las Figuras acompañantes. Todos los Ejemplos ilustrados se proporcionan como secuencia o secuencias diana monocatenarias que se van a analizar mediante la hebra del Cebador en exceso de la amplificación de la PCR-LATE. Los conjuntos de sondas de los Ejemplos se diseñan para inactivar por contacto las sondas de señalización mediante sondas inactivadoras.

El Ejemplo 1 es un caso donde la región de cebado de la secuencia diana de preamplificación se ha incluido en la secuencia deseada que se va a analizar. Tal como se muestra en la Fig. 2, se han incluido ocho nucleótidos complementarios del Cebador limitante en la secuencia que se va a sondear. El Ejemplo 1 ilustra también el uso de un cebador que contiene un emparejamiento incorrecto. En este caso, el cebador queda fuera de los ocho nucleótidos incluidos en la secuencia que se va a sondear, y la secuencia de la hebra del Cebador en exceso que se analiza es idéntica a la secuencia diana 21 de la preamplificación. El Ejemplo 1 ilustra el uso de múltiples conjuntos de sondas (tres sondas de señalización y tres sondas inactivadoras) para cuestionar una secuencia diana (una secuencia de 101 nucleótidos de longitud del gen *rpoB* de *Mycobacterium tuberculosis*). En la Fig. 2 se muestra esquemáticamente la diseminación de las sondas a lo largo de la secuencia diana. El Ejemplo 1 ilustra el uso de múltiples sondas de señalización del mismo color (todas incluyen el fluoróforo Quasar 670). Las sondas de señalización 2, 4 y 5 se hibridan con diferentes partes de la secuencia diana y tienen diferentes Tf calculadas con respecto a la secuencia diana natural – 63 °C, 67 °C y 75 °C, respectivamente. En el Ejemplo 1, cada sonda de señalización tiene su propia sonda inactivadora asociada que se hibrida cerca de esta, esto es, suficientemente cercana de tal manera que su resto inactivador pueda inactivar el resto fluoróforo de la sonda de señalización. Las sondas inactivadoras 3, 5 y 6 están asociadas a las sondas de señalización 2, 4 y 5, respectivamente. El Ejemplo 1 ilustra el uso de sondas de señalización que tienen Tf mayores que sus respectivas sondas inactivadoras. Las sondas inactivadoras 3, 5 y 6 tienen Tf con respecto a la secuencia diana natural de 50 °C, 56 °C y 63 °C, respectivamente, de tal manera que cada sonda inactivadora se elimina por fusión de la secuencia diana antes de asociarse con la sonda de señalización. Los dos conjuntos de sondas no se pueden distinguir por su color, pero se pueden distinguir por su Rf. El Ejemplo 1 ilustra además el uso de una sonda de señalización (Sonda 2) y una sonda inactivadora (Sonda 3) de tal manera que cada una tiene un nucleótido complementario del mismo nucleótido de la secuencia diana del ácido nucleico monocatenario. Las seis sondas eran tolerantes al emparejamiento incorrecto. Las sondas de señalización y las sondas inactivadoras se hibridaron en este caso de forma adyacente y de esta manera cubrieron cada nucleótido de la secuencia diana que se iba a analizar. El Ejemplo 1 ilustra el uso de sondas de señalización inactivadas ya que cada una de las sondas de señalización 2, 4 y 5 es una sonda de baliza molecular con un tallo de dos nucleótidos de longitud. El ejemplo ilustra el uso de una sonda inactivadora que tiene una estructura en horquilla (sonda 1) y de sondas inactivadoras que son sondas lineales (Sonda 3 y Sonda 6). Los tres conjuntos de sondas se sometieron a ensayo frente a una cepa sensible a fármaco y frente a dos cepas a fármaco diferentes. El análisis de hibridación de las seis sondas frente a la hebra del Cebador en exceso procedente

de la amplificación de las tres cepas fue mediante fusión. Las Figs. 3A-3B presentan curvas que muestran la primera derivada de las lecturas de fluorescencia (derivada de las curvas de fusión). Como se puede observar en las Figs. 3A-3B, la curva de cada cepa resistente a fármaco difirió de la curva de la cepa sensible a fármaco y entre sí. De esta manera, el conjunto de sondas fue capaz de determinar si la muestra contenía la secuencia sensible a fármaco o cualquiera de las secuencias resistentes a fármaco. Puesto que cada hebra resistente a fármaco tenía una curva que era diferente de manera distinguible, el conjunto de las seis sondas fue capaz de determinar cuál hebra resistente estaba presente en una muestra. Las tres curvas obtenidas a partir de estas tres secuencias conocidas podrían utilizarse como una biblioteca con la que comparar las curvas de las muestras que contengan cepas desconocidas.

El Ejemplo 2 ilustra el uso de un método proporcionado en el presente documento para analizar una mezcla de dos dianas de partida, en este caso, dos variantes de una secuencia amplificada mediante una única pareja de cebadores. Utilizando las dianas de partida del Ejemplo 1 (la cepa sensible a fármaco y una cepa resistente a fármaco), junto con los cebadores y las seis sondas del Ejemplo 1, las mezclas de dos hebras en proporciones que variaban de 20% a 1% de la hebra resistente a fármaco se amplificaron mediante PCR-LATE para generar mezclas de dos hebras del cebador en exceso diferentes en proporciones variables. Tal como se muestra en las Figs. 4A-4B, el ensayo puede determinar la proporción de cepa resistente al fármaco en las mezclas. El Ejemplo 2 también el uso de adquisición de datos de fluorescencia de una fusión posterior a la primera fusión (en este caso, se usaron los promedios de la segunda, tercera y cuarta fusiones). Los experimentos llevados a cabo durante el desarrollo de las realizaciones proporcionadas en el presente documento demostraron que, en algunas realizaciones, la segunda curva de fusión difiere algo de la primera, y las posteriores curvas de fusión son análogas a la segunda. En algunas realizaciones, se contempla que esto sea debido a la estructura secundaria que se altera durante la primera fusión, aunque las realizaciones proporcionadas en el presente documento no están limitadas por ningún mecanismo concreto de acción y no es necesaria una comprensión del mecanismo de acción para practicar las realizaciones. Para acomodar el efecto, sin embargo, pueden adquirirse datos de hibridación, tanto datos de hibridación como datos de fusión, tras una fusión inicial, que puede ser una fusión rápida.

El Ejemplo 3 ilustra una realización que incluye el análisis de tres secuencias variantes diferentes en la misma muestra utilizando al menos un conjunto de sondas para cada secuencia, donde los conjuntos de sondas para las tres secuencias son distinguibles de manera detectable por el color y donde diferentes conjuntos de sondas para una secuencia son distinguibles de manera detectable mediante la Tf. Cada secuencia variante que se va a analizar se proporciona mediante amplificación por PCR-LATE utilizando un Cebador en exceso y un Cebador limitante, y se usa una pareja de cebadores diferente para cada una de las tres secuencias variantes. Tal como se muestra en la Fig. 5, el Ejemplo 3 ilustra: el uso de una sonda (Sonda 3), una parte de dos conjuntos de sondas; el uso de una sonda (Sonda 1 inactivadora) que no forma parte de ningún conjunto de sondas; y sondas que se hibridan con la secuencia diana de ácido nucleico monocatenario con un hueco de un nucleótido entre ellos (Sonda 2 y Sonda 3). Ambas sonda 2 y sonda 3 son sondas de baliza molecular con un tallo de dos nucleótidos de longitud, pero aunque ninguno de los nucleótidos del tallo de la sonda 2 sea complementario de la secuencia diana, los dos nucleótidos del tallo de la sonda 3 son complementarios de la secuencia diana.

Las Figs. 8-11, que acompañan al Ejemplo 4, ilustran la flexibilidad de los métodos proporcionados en el presente documento para analizar los conjuntos de sondas de señalización y sondas inactivadoras que son distinguibles de manera detectable mediante el análisis de fusión o hibridación con color. La secuencia diana seleccionada es una porción de 500 pares de bases del gen de la subunidad 1 de la citocromo c oxidasa mitocondrial (cox 1), que solapa una secuencia que se ha utilizado como identificador de numerosas especies mediante secuenciación (Herber, PD (2003) Proc. Bol. Sci. 270 Supl. 1:596-9). Las secuencias de este gen para 264 especies diferentes de nematodos se alinearon y se utilizaron para identificar la porción seleccionada, un área que contenía secuencias de elevada variabilidad flanqueadas por secuencias conservadas. En estas regiones conservadas se diseñaron tres Cebadores limitantes de la PCR-LATE y un único Cebador en exceso. Los tres Cebadores limitantes consenso proporcionaron suficiente complementariedad para permitir la amplificación de las 264 especies por encima de 50 °C. El procedimiento de diseño de todas las sondas fue secuencia consenso que hibridaría las 264 variantes a temperaturas en el intervalo de 30-60 °C. La lógica de esta solución se aplica por igual a otras secuencias de longitud variable, por ejemplo, secuencias en cloroplastos de células vegetales y secuencias de bacterias tales como genes ribosómicos. La Fig. 8 muestra la hebra del cebador en exceso que contiene una secuencia complementaria a los dos cebadores limitantes para la variante de *Caenorhabditis elegans* con las diez sondas hibridadas. En el Ejemplo 4 se identificaron los emparejamientos incorrectos entre cada sonda y esta variante.

El Ejemplo 4 ilustra el uso de una curva de hibridación para analizar la hibridación de las sondas para cada color utilizado. Las Figs. 9A-9C y las Figs. 10A-10C presentan curvas de hibridación para los tres fluoróforos de dos especies, incluyendo *C. elegans*. El análisis puede incluir la preparación de un archivo de referencia con las curvas de hibridación de las 260 especies, y la comparación manual de las curvas de una muestra desconocida con las curvas del archivo de referencia. Se llevaron a cabo los experimentos durante el desarrollo de las realizaciones proporcionadas en el presente documento para desarrollar un procedimiento de digitalización de las curvas que permita comparaciones por ordenador. Las Figs. 11A-11C presentan los resultados digitalizados en forma gráfica con un código de barras, que se puede usar para comparar manualmente un archivo de códigos de barras de referencia. El Ejemplo 5 describe una realización de un ensayo de cribado, es este caso, un ensayo de cribado de

septicemia. El Ejemplo 5 ilustra algunas características y realizaciones proporcionadas en el presente documento. Ilustra el sondeo y el análisis de una secuencia variable para determinar qué variante está presente entre las numerosas posibles variantes. Ilustra el uso de múltiples conjuntos de sondas de señalización y sondas inactivadoras donde, además, las sondas de señalización tienen el mismo fluoróforo y emiten el mismo color. Ilustra (Tabla 3) no solo el uso de sondas de señalización cuyas temperaturas de fusión sean mayores en comparación a las posibles secuencias diana de sus sondas inactivadoras asociadas, sino también la inclusión de un conjunto de una sonda de señalización y una sonda inactivadora cuando lo opuesto es el caso de una o más posibles secuencias diana (sondas Quasar 1 ON y Quasar 1 Off). Aunque esto no forme parte de la invención, se ilustra además el uso de múltiples conjuntos de sondas donde determinadas sondas individuales, de señalización o inactivadoras, no tengan que hibridarse cada posible secuencia diana en el intervalo de temperaturas de detección, aquí 80 °C a 25 °C (véase la Tabla 3).

El Ejemplo 5 ilustra el análisis de hibridación de las sondas de señalización e inactivadoras, incluyendo el efecto de hibridación de las sondas inactivadoras sobre las señales de emisión de la fluorescencia procedentes de las sondas de señalización en función de la temperatura utilizando las curvas de hibridación (Fig. 13) y las curvas derivadas (Fig. 14), cualquiera o ambas se pueden mantener como una biblioteca con la que comparar las curvas de muestras desconocidas, y utilizar la información digitalizada derivada de dichas curvas (Tabla 4), que también se puede mantener como biblioteca.

El Ejemplo 5 ilustra el uso de la amplificación de ácido nucleico para proporcionar una muestra, o mezcla de reacción, que contiene una secuencia diana en forma monocatenaria, es este caso un método de amplificación no simétrico que genera un amplicón monocatenario, la secuencia diana que se va a analizar. El Ejemplo 5 ilustra además la amplificación utilizando una única pareja de cebadores que se hibridan a secuencias conservadas que flanquean una secuencia variable de tal manera que generan una secuencia diana procedente de cualquiera de las secuencias variables que esté presente. Se apreciará que, como se ha indicado anteriormente, un método como el del Ejemplo 5 o un método como el del Ejemplo 4 puede comenzar con una muestra que contiene ARN e incluye la transcripción inversa antes de la amplificación. El Ejemplo 5 ilustra también no solo la detección homogénea donde las sondas de señalización unidas no tienen que separarse de las sondas de señalización no unidas antes de la detección, sino también un método de "tubo único" donde se llevan a cabo la amplificación y la detección sin la necesidad de abrir el recipiente de reacción tras la amplificación. Las sondas de señalización del Ejemplo 5 señalizan tras su hibridación a una diana, y los híbridos sonda-diana tienen temperaturas de fusión (Tabla 3) por debajo de las temperaturas de ciclación de la amplificación y, por tanto, las sondas no se hibridan a los productos de la amplificación durante la reacción de amplificación. Las sondas no interfieren con la amplificación y no se escinden durante la extensión del cebador mediante una polimerasa que tiene actividad 5' exonucleasa, tal como la ADN polimerasa Taq. La escisión de la sonda produciría la fluorescencia de fondo durante el posterior análisis de fusión. Las sondas a baja temperatura pueden estar presentes en la mezcla de la reacción de amplificación en lugar de añadirse tras la amplificación. Las Figs. 13 y 14 y la Tabla 4 muestran que el ensayo del Ejemplo 5 puede distinguir entre secuencias variables que difieren poco entre sí. El ensayo distinguió *Staphylococcus epidermis* (SE) de *Staphylococcus haemolyticus* (SH), que difieren entre sí solo en dos posiciones de nucleótidos. De esta manera, como ensayo de cribado para la septicemia, el ensayo puede diferenciar entre diferentes secuencias diana no solo entre géneros, sino también entre especies.

El Ejemplo 6 demuestra el uso del ensayo del Ejemplo 5 con muestras de partida que contienen mezclas de dos variantes de la secuencia variable. La Fig. 15 presenta las curvas de hibridación para mezclas de dos variantes, *Staphylococcus aureus* (COL) y *Staphylococcus epidermis* (SE), junto con las curvas de hibridación de las variantes individuales. Las mezclas de partida de cada variante con tan poco como un diez por ciento de las otras variantes fueron distinguibles entre sí y de las variantes individuales mediante el uso de una biblioteca de curvas o una biblioteca de información digitalizada derivada de las curvas.

El Ejemplo 7 extiende el ensayo de detección bacteriana de la septicemia del Ejemplo 5 de una región de 203 bases del gen del ARNr 16S utilizando un único color para una región de más de 475 bases del gen del ARNr 16S utilizando dos colores.

El Ejemplo 8 extiende el análisis del experimento descrito en el Ejemplo 4 utilizando las temperaturas de fusión de las dos sondas ON Cal red y sus sondas OFF asociadas, y las señales de fluorescencia dependientes de temperatura procedentes de dichas sondas en ausencia de diana en comparación con las señales de fluorescencia dependientes de temperatura procedentes de dichas sondas en presencia de una diana de *Caenorhabditis elegans* amplificada, presentadas en la Fig. 18. A la luz de las temperaturas de fusión eficaces para las sondas 3-6 presentadas en el Ejemplo 8, los datos de la Fig. 18 y su curva derivada, la Fig. 10B, pueden explicarse de la siguiente forma. A 65 °C ninguna de las sondas se une a la secuencia diana, y la señal fluorescente en presencia y ausencia de la secuencia diana es la misma. A temperaturas por debajo de 65 °C las sondas se hibridan con la diana en el orden de sus temperaturas de fusión eficaces: ON Sonda 4, OFF Sonda 3, OFF Sonda 5, ON Sonda 6. Como la sonda 4 es una sonda de señalización, esta genera una señal por encima de la señal no diana de fondo cuando se une a la diana a aproximadamente 55 °C. A medida que la temperatura disminuye por debajo de aproximadamente 52 °C, la señal de la sonda 4 se extingue a medida que la sonda 3 inactivadora se une a la secuencia diana adyacente. Cuando la temperatura disminuye adicionalmente, la Sonda 5 OFF se hibrida a la diana,

pero este caso no se detecta, porque la sonda 5 es una sonda inactivadora. Cuando la temperatura disminuye adicionalmente, la sonda 6 ON se une a la diana adyacente a la sonda 5. Este caso se detecta, porque la fluorescencia que proviene de la sonda 6 de señalización no unida se pierde por la unión de la sonda 6 adyacente a la sonda 5 inactivadora, que ya está unida a la diana. No se observa señal por encima del fondo procedente de la sonda 6 de señalización que está adyacente a la sonda 6 inactivadora.

La señalización dependiente de temperatura generada por la hibridación del conjunto de la sonda 4/sonda 3 con la diana es independiente de la señalización dependiente de temperatura generada por la hibridación del conjunto de la sonda 6/sonda 5 con la diana. Se apreciará que la sonda 4 la sonda 6 podrían usar restos químicos que fluorescen en diferentes colores. Resulta que la señal fluorescente dependiente de la temperatura global observada en este sistema de tubo cerrado está comprendida por la señal integrada que procede de todos los componentes independientes del sistema.

Se realizó la siguiente observación a partir de los Ejemplos 4 y 8: Se pueden diseñar uno o más conjuntos (o parejas) de sondas interactuantes donde la temperatura de fusión de cada sonda inactivadora es mayor que la temperatura de fusión de cada sonda de señalización. En este caso, la señal que se observa procedente de las sondas de señalización no unidas se extinguirá a medida que cada sonda de señalización se une a la diana adyacente a su sonda inactivadora ya unida. Cuando todas las sondas de señalización estén unidas adyacentes a sus sondas inactivadoras a baja temperatura, el sistema en su conjunto presentará una señal fluorescente global muy baja. Dicho sistema será muy sensible a la unión o liberación de cantidades muy pequeñas de la sonda de señalización unida. Puede aumentarse la sensibilidad de dicho sistema utilizando un resto dabcilo en la sonda inactivadora, en lugar de un inactivador black hole, o sin incluir resto inactivador en la sonda de señalización. Pequeñas cantidades de dichas sondas se hibridarán a pequeñas cantidades de dichas dianas que tienen una sonda inactivadora ya unida. El tiempo que estas moléculas necesiten para alcanzar el equilibrio entre el estado unido y el no unido puede disminuir al bajar el volumen de la reacción. Las reacciones construidas de esta manera son fáciles de utilizar con las reacciones de amplificación que acumulan pequeñas cantidades de moléculas diana monocatenarias rápidamente y en volúmenes pequeños.

El Ejemplo 9 ilustra el uso de un único conjunto de sondas para la genotipación del polimorfismo de nucleótido único (SNP). El segmento de ADN genómico que contiene el sitio SNP que se va a genotipar se amplificó utilizando la PCR-LATE en presencia del conjunto de cebadores. La sonda ON consistía en una sonda lineal inactivada marcada en el extremo 5' con un fluoróforo y en el extremo 3' con un inactivador. Era complementaria a ambos alelos. Esta sonda se diseñó para tener una temperatura de fusión aproximadamente 10°C mayor que la de sonda OFF y para hibridarse de manera adyacente al sitio de unión de la sonda OFF de tal manera que tras la unión a la hebra del cebador en exceso de la PCR-LATE, el resto fluoróforo de la sonda ON residía próximo al inactivador de la sonda OFF. La sonda OFF era una sonda lineal marcada en el extremo 3' con un inactivador. Esta sonda se diseñó para emparejarse completamente con uno de los alelos SNP y emparejarse incorrectamente con el otro alelo de tal manera que temperatura de fusión de la sonda OFF hibridada con la diana de alelos SNP emparejados era aproximadamente 10 °C mayor que su temperatura de fusión con la diana de alelos SNP emparejados. La relación de las temperaturas de fusión (T_f) en el ensayo fue como sigue: Cebador limitante (71,2°C) > Cebador en Exceso (66,2°C) > Hibridación del Cebador (64°C) > Sonda ON (62°C) > Sonda OFF (52°C frente a diana emparejada, 41 °C frente a diana con emparejamiento incorrecto). Tal como se muestra en la Fig. 20, el modelo fluorescente generado a partir de esta pareja de sondas para un intervalo de temperaturas de detección identifica la configuración de los alelos del sitio SNP en la muestra amplificada: esto es, si la muestra es homocigótica para el alelo que se empareja a la sonda OFF, si la muestra es homocigótica para el alelo emparejado de manera incorrecta, o si la muestra es heterocigótica e incluye ambos alelos.

La tipación de *Staphylococcus aureus* se ha convertido en una importante herramienta en el estudio del origen de la cepa parentesco clonal, y la epidemiología de los brotes. La tipación juega también un importante papel en las investigaciones hospitalarias, ya que *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) es endémico o epidémico en muchos centros sanitarios. Aunque están disponibles algunas técnicas fenotípicas y, más recientemente, técnicas moleculares para la diferenciación de *S. aureus*, no existe un método claramente superior en todas las condiciones. Actualmente, el análisis de macrorrestricción mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) es el estándar de los United States of America Centers for Disease Control and Prevention (CDC) para la tipación de la cepa de *S. aureus* y se ha usado satisfactoriamente para estudiar la diseminación de la cepa, especialmente en la identificación de brotes hospitalarios. Sin embargo, aunque PFGE tiene un excelente poder discriminador, requiere mucha mano de obra y es difícil de estandarizar entre diferentes laboratorios. Como con otros sistemas de tipación basados en gel, la interpretación de los resultados de PFGE es a menudo subjetiva. Estos problemas convierten el intercambio de información de tipación de cepas en algo difícil y complican la creación de una base de datos de tipado de *S. aureus* y MRSA.

La secuenciación del ADN es una solución poderosa para el tipado de cepas con ventajas en la velocidad, interpretación de datos sin ambigüedad, y simplicidad de creación de bases de datos a gran escala. Recientemente, La secuenciación del ADN de la región polimórfica X, o de repetición de secuencia corta (SSR), del gen de la proteína A (*spa*) se ha propuesto como una técnica alternativa para la tipación de *S. aureus*. La región polimórfica X consiste en un número variable de repeticiones de 24 pb, y está situada inmediatamente en la dirección 5' de la

- región que codifica la secuencia del extremo C de unión a la pared celular. La existencia de regiones bien conservadas que flanquean la secuencia codificante de la región X en *spa* permite el uso de cebadores para la amplificación por PCR y el tipado directo de la secuencia. La secuenciación de la región SSR de *spa* combina muchas de las ventajas de un sistema basado en la secuenciación tal como MLST pero puede ser más rápido y conveniente para la investigación del brote en el escenario hospitalario, ya que la tipación de *spa* implica un locus único. En la medida que la proteína A de la región X tiene un elevado grado de polimorfismo, puede tener una velocidad de variación (o velocidad de cronómetro) que proporciona una discriminación adecuada para la investigación del brote". (Shopsin et al., J. Clinical Microbiology, Noviembre de 1999, páginas 3556-3563).
- Una solución para la tipación de *spa* diferente a la secuenciación de PGFE o del ADN (Shopsin et al) es el uso de un ensayo PCR-LATE que utiliza sondas ON/OFF para distinguir cepas de *S. aureus* basándose en la región de repetición X, y para crear una biblioteca de firmas donde se puedan identificar diferentes especies. Para la tipación de *spa* existen repeticiones de 24 bases donde cada repetición puede tener una secuencia ligeramente diferente y el número de repeticiones varía con el tipo de SPA. El Ejemplo 10 describe un ensayo PCR-LATE para la tipación de *spa* que utiliza un conjunto único de sonda de señalización (ON) y una sonda inactivadora (OFF). El conjunto de sondas ON/OFF se ensayó para doce tipos de *spa* secuenciados de muestras MRSA, algunos de los cuales tenían los mismos tipos de *spa*, otros donde los tipos de *spa* eran similares, y otros más donde el tipo de *spa* era muy diferente. Las curvas de la primera derivada de la fluorescencia de las curvas de hibridación frente a la temperatura para las doce muestras se muestran en la FIG. 22. Todos los resultados mostraron la diferenciación esperada y la definición de cada tipo de *spa*. Cuando se espera que los tipos de *spa* sean iguales, aparece la misma firma.

PARTE EXPERIMENTAL

Ejemplo 1

25

Detección de resistencia a fármacos en el gen *rpoB* para las cepas de *M. tuberculosis*

Se llevó a cabo una amplificación LATE-PCR usando un único par de cebadores para amplificar una región de 150 pares de bases del gen *rpoB* para cada una de las diferentes cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. La amplificación proporcionó una región de 101 pares de bases del gen, conocido por contener mutaciones responsables de la resistencia a fármacos para rifampicina, como secuencia diana de ácido nucleico monocatenario (la cepa del cebador en exceso de cada amplificación LATE-PCR). Tras la amplificación, cada secuencia diana de ácido nucleico monocatenario se sondeó usando seis sondas independientes que estaban incluidas en la mezcla de reacción de amplificación original.

35

Las sondas de la combinación abarcaban los 101 pares de bases de la secuencia diana de ácido nucleico monocatenario. Tres de las sondas eran sondas de señalización. Las sondas de señalización eran sondas de baliza molecular inactivadas con tallos de dos nucleótidos de longitud. Cada una incluía marcas unidas covalentemente: el fluoróforo Quasar 670 en un extremo y un inactivador Black Hole 2, BHQ2, (Biosearch Technologies, Novato CA), en el otro extremo. Las otras tres sondas eran sondas inactivadoras marcadas en el extremo solamente con BHQ2, sin fluoróforo. En este ejemplo, las Tf de las sondas de señalización con respecto a la cepa sensible a fármaco diferían entre sí, y las Tf de las sondas de inactivación con respecto a la cepa sensible a fármaco diferían entre sí. Los tres conjuntos de sondas tenían una detección diferenciada.

Al final de la amplificación, se analizaron las hibridaciones sonda-diana en función de la temperatura. En este ejemplo, las hibridaciones se caracterizaron por el uso del análisis del perfil de fusión. Los componentes y condiciones de reacción fueron los siguientes:

- Cebador limitante: 5' CTCCAGCCAGGCACGCTCACGTGACAGACCG (SEC ID N° 1)
 Cebador en exceso: 5'CCGGTGGTCGCCGCGATCAAGGAG (SEC ID N° 2)

Diana: Cepa 13545

```
5'CCGGTGGTCGCCGCGATCAAGGAGTTCTTCGGCACCCAGCCAGCTGAGCC
AATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACCCACAAGCGCCGA
CTGTCGGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTACGTGAGCGTGCCGGGCTGGA
G (SEC ID N° 3)
```

55 Diana: Cepa 18460

5'CCGGTGGTCGCCGCGATCAAGGAGTTCTTCGGCACCCAGCCAGCTGAGCC
 AATTCATGGTCCCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACCCACAAGCGCCGA
 CTGTCGGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTACGTGAGCGTGCCGGGCTGGA
 G (SEC ID N° 4)

Diana: Cepa 9249

5'CCGGTGGTCGCCGCGATCAAGGAGTTCTTCGGCACCCAGCCAGCTGAGCC
 AATTCATGGACCCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACCCACAAGCGCCGA
 CTGTGGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTACGTGAGCGTGCCGGGCTGGA
 G (SEC ID N° 5)

El subrayado de la secuencia de cada una de las cepas 18460 y 9249 denota la situación del cambio de nucleótido en la cepa 13545 sensible a fármaco.

10

Sonda 1:

5'- BHQ2-CTGGTTGGTGCAGAAG-C3 (SEC ID N° 6)

15

Sonda 2:

5'- BHQ2-TCAGGTCCATGAATTGGCTCAGA-Quasar 670 (SEC ID N° 7)

20

Sonda 3:

5'- BHQ2-CAGCGGGTTGTT-C3 (SEC ID N° 8)

Sonda 4:

25

5'-BHQ2-ATGCGCTTGTGGATCAACCCCGAT-Quasar 670 (SEC ID N° 9)

Sonda 5:

30

5'-Quasar 670-AAGCCCCAGCGCCGACAGTCGTT BHQ2 (SEC ID N° 10)

Sonda 6:

5'-ACAGACCGCCGG BHQ2 (SEC ID N° 11)

35

Un enlazador de carbono de tres átomos de carbono se denota como C3, mientras que un inactivador Black Hole 2 se denota como BHQ2 (Biosearch Technologies, Novato CA).

40

Las amplificaciones mediante LATE PCR se llevaron a cabo en un volumen de 25 µl que consistía en 1X tampón PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA), MgCl₂ 2 mM, dNTPs 200 nM, Cebador limitante 50 nM, Cebador en exceso 1000 nM, 1,25 unidades de ADN polimerasa Platinum Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA), 500 nm de sondas 1, 3 y 6, y 200 nm de sondas 2, 4 y 5. Para cada cepa analizada se utilizaron aproximadamente 1000 genomas equivalentes. Las reacciones de amplificación de cada cepa se realizaron por triplicado. El perfil térmico de la reacción de amplificación fue el siguiente: 98°C/3 min durante 1 ciclo, seguido por 98°C/10 s-75°C/40 s durante 50 ciclos, seguido por adquisición de fluorescencia en cada grado desde la hibridación a 75°C con decrementos de 1°C en intervalos de 30 s hasta 34°C seguido por 10 min a 34°C. Esto fue seguido de un inicio de la fusión a 34°C con incrementos de 1°C en intervalos de 30 s hasta 81°C.

45

50

Las temperaturas de fusión de las sondas se realizaron usando el programa informático Visual OMP 7.0 con las concentraciones de diana, sondas de señalización, y sondas de inactivación a 100 nM, 200 nM y 500 nM, respectivamente. Las T_f fueron las siguientes: Sonda 1, 50 °C; Sonda 2, 63°C; Sonda 3, 56°C; Sonda 4, 67°C; Sonda 5, 75°C; y Sonda 6, 63°C. El análisis de las hibridaciones sonda-diana después de la amplificación se realizó por análisis de la curva de fusión usando la primera derivada para la fluorescencia de Quasar 670 en un intervalo de temperatura comprendido entre 35°C y 78°C. A partir de este conjunto de datos, el valor de fluorescencia más alto se utilizó para normalizar los datos a la unidad. Si el valor usado fuera negativo, se multiplicó por (-15); si fuera un

número positivo, se multiplicó por quince.

La Fig. 2 ilustra la unión de los tres conjuntos de sondas (Sondas 1/Sonda 2, Sonda 3/Sonda 4, y Sonda 5/Sonda 6) a la secuencia diana de ácido nucleico monocatenario, utilizando la cepa 13545 sensible a fármaco como diana. En la Fig. 2, la cepa 21 es la cepa diana, la cepa 23 es el Cebador en exceso, y la cepa 22 es el Cebador limitante. Para los fines de ilustración, las sondas 1-6 se muestran hibridadas a la hebra 21 en una orientación 3' a 5' con sus extremos incorrectamente emparejados encima. Los emparejamientos incorrectos entre las sondas y la cepa 21, y entre el Cebador limitante y la cepa 21 se muestran en negrita. Las etiquetas del fluoróforo y el inactivador se han omitido en la Fig. 2 pero se han indicado anteriormente en las descripciones de la secuencia. Algunos de los nucleótidos de las secuencias sonda se emparejaron incorrectamente de forma deliberada con la cepa 13545 sensible tal como la Sonda 1, que incluye emparejamientos incorrectos en las posiciones 31 (A a G) y 38 (T a G) con respecto al extremo 5' de la cepa 21. Otros emparejamientos incorrectos aparecen en la Sonda 2, posición 62 (A a A), Sonda 4, posición 86 (A a C). Dentro del Cebador limitante, en la posición 142 (A a G) existe un emparejamiento incorrecto que se incluyó para reducir una horquilla que aparece en la cepa diana original. Además de estos emparejamientos incorrectos en la cepa sensible 13545, la cepa 18460 tiene un emparejamiento incorrecto de nucleótido en la posición 59 (T a T) mientras que la cepa 9249 tiene un emparejamiento incorrecto en la posición 104 (G to T).

Se apreciará que la amplificación mediante LATE-PCR proporciona una muestra que contiene la hebra del Cebador en exceso, que comprende la secuencia diana de ácido nucleico monocatenario que se está sondeando en este momento. Las hebras del Cebador en exceso incluye la secuencia del Cebador en exceso en un extremo y el complemento de la secuencia del Cebador limitante en el otro extremo. En este caso, debido al emparejamiento incorrecto entre el Cebador limitante y la hebra 21, la cepa del Cebador en exceso diferirá de la hebra 21 en la posición 142, que será una T en lugar de una G. Puesto que la región de la hebra 21 es complementaria de las sondas 1-6, la hebra del Cebador en exceso es idéntica a la hebra 21.

La Fig. 3A presenta los resultados del análisis de dos cepas diferentes de *M. tuberculosis*, la cepa 13545 y la cepa 18460. Los datos del análisis por triplicado de muestras de amplificaciones diferentes de las dos cepas están superpuestos a fines de ilustración. El círculo 311 representa la cepa resistente a fármacos 18460 (D516V, un ácido aspártico situado en la posición de aminoácido 516 se cambió por valina), pero al mismo tiempo, el círculo 312 muestra las réplicas de la cepa sensible a fármacos 13545 (V146F, una valina situada en la posición de aminoácido 146 se cambió por fenilalanina). La Fig. 3B presenta los resultados de la cepa resistente a fármacos 9249 y la cepa sensible a fármacos 13545, mientras que el círculo 313 muestra las réplicas de la cepa resistente a fármacos 9249 (S531L, una serina situada en la posición de aminoácido 513 se cambió por leucina) y el círculo 314 muestra tres réplicas de la cepa sensible a fármacos 13545 (V146F).

Ejemplo 2

La detección de una cepa resistente a fármacos de *M. tuberculosis* en una mezcla mixta

Se llevaron a cabo amplificaciones mediante LATE PCR para proporcionar secuencias diana de ácido nucleico monocatenario usando la cepa 18640 de *M. tuberculosis* resistente (D516V, un ácido aspártico situado en el aminoácido 516 cambió a valina) y la cepa sensible 13545 en diferentes relaciones para determinar el nivel de sensibilidad en una muestra mixta. Los componentes y las condiciones de la reacción son las descritas en el Ejemplo 1, salvo que las secuencias diana iniciales estaban incluidas en las mezclas de reacción. Los amplicones generados a partir de la cepa 18640 y la cepa 13545 usando los cebadores del Ejemplo 1 comprenden una única variación de nucleótidos dentro de la secuencia de hibridación de la sonda 2. En esta realización, sonda 2 es una sonda de señalización. Como alternativa, en algunas realizaciones, se puede emplear una sonda inactivadora que se hibrida con la región del amplicón que contiene el nucleótido variable, y una correspondiente sonda de señalización está diseñada para hibridarse adyacente. Una mezcla de reacción incluía solamente la cepa 18460, y otra mezcla de reacción incluía solamente la cepa 13545. Cada uno de estos controles 100% contenía aproximadamente 100.000 copias del ADN genómico de la correspondiente cepa. Las mezclas de reacción de una primera muestra mixta contenían un 20% (aproximadamente 20.000 genomas) de la cepa resistente 18460 con 80% (aproximadamente 80.000 genomas) de la cepa sensible 13545. La mezcla de reacción de una segunda muestra mixta contenía un 10% de la cepa 18460 (10.000 genomas) con un 90% de la cepa 13545 (90.000 genomas). La mezcla de reacción de una tercera muestra mixta contenía un 5% de la cepa 18460 (5.000 genomas) con un 95% de la cepa 13545 (95.000 genomas). La mezcla de reacción de una cuarta muestra mixta contenía un 1% de la cepa 18460 (1.000 genomas) con un 99% de la cepa 13545 (99.000 genomas). Las reacciones de amplificación se realizaron por triplicado.

El perfil térmico de la reacción de amplificación fue el siguiente: 98°C/3 min durante 1 ciclo, seguido por 98°C/10 s/75°C/40 s durante 50 ciclos, seguido por adquisición de fluorescencia en cada grado desde la hibridación a 75°C con decrementos de 1°C en intervalos de 30 s hasta 34°C seguido por mantenimiento a 34°C durante 10 min. Esto fue seguido de un inicio de la fusión a 34°C con incrementos de 1°C en intervalos de 30 s hasta 81°C seguido por hibridación a partir de 75°C con decrementos de 1°C en intervalos de 1°C hasta 34°C. Este perfil de fusión/hibridación se repitió tres veces más.

Los datos utilizados en el análisis gráfico de la hibridación de las seis sondas fue el promedio de cada réplica de los últimos tres perfiles de fusión. De estos valores promedio se restó la fluorescente a 35°C, y los valores resultantes se normalizaron por división de todos los valores por la fluorescencia a 78°C. La primera derivada de los datos resultantes se generó a continuación y se normalizaron dividiendo todos los valores usando el valor positivo mayor.

5 Para eliminar la contribución del ADN de la cepa sensible de las mezclas que contienen los ADN de las cepas tanto sensibles como resistentes, se utilizaron réplicas de las muestras con ADN puro de las cepas sensibles (controles 100%) para generar valores derivados del promedio para cada temperatura, tal como se describe anteriormente. Estos valores se restaron después de los valores derivados del promedio de cada mezcla para llegar a la
10 contribución de la cepa resistente. Además, la distribución entre las muestras independientes de ADN sensible puro se estableció restando los valores derivados del promedio del ADN sensible puro de cada una de las muestras individuales de ADN sensible puro.

15 Las Figs. 4A-4D muestran los análisis resultantes. Muestran la señal de varios porcentajes de la cepa resistente 18460 en un fondo creciente de la cepa sensible 13545. La Fig. 4A muestra esta señal con una mezcla mixta de un 20% de la cepa resistente 18460 en un fondo del 80% de la cepa sensible 13545, mientras que el círculo 410 identifica la contribución de la cepa resistente en las réplicas de la mezcla, y el círculo 411 identifica la distribución entre las réplicas de la cepa sensible pura. La Fig. 4B muestra la señal con la mezcla del 10%, donde el círculo 412 representa la contribución de la cepa resistente en las réplicas de la mezcla, y el círculo 413 representa la
20 distribución entre las réplicas de la cepa sensible pura. La Fig. 4C muestra la señal de la mezcla con un 5% de réplicas de cepa resistente (círculo 414 que identifica la contribución de la cepa resistente en réplicas de la mezcla, y el círculo 415 identifica la distribución entre las réplicas de la cepa sensible pura). La Fig. 4D muestra la señal de la mezcla de la cepa resistente al 1%. El círculo 416 identifica la contribución de la cepa resistente en las réplicas de la mezcla, y el círculo 417 identifica la distribución entre las réplicas de la cepa sensible pura.

25 Ejemplo 3

Detección de resistencia a multifármaco en cepas de *M. tuberculosis*

30 Se llevó a cabo un ensayo LATE-PCR multiplexado para proporcionar varias secuencias diana de ácido nucleico monocatenario para detectar la resistencia a fármacos en tres genes, *gyrA* (fluoroquinolonas), *katG* (isoniazida), y *rpoB* (rifampicina), de cada una de las tres cepas, 13545, 202626 y 15552. Para el gen *gyrA*, las cepas 13545 y 202626 eran sensibles a fármacos, mientras que la cepa 15552 (A90V, un ácido aspártico situado en la posición de aminoácido 90 se cambió por valina) era resistente a fármacos. Para el gen *katG*, la cepa 202626 era sensible a fármacos, mientras que la cepa 13545 (S315T, una serina situada en la posición de aminoácido 315 se cambió por
35 tirosina) y la cepa 15552 (S315N, una serina situada en la posición de aminoácido 315 se cambió por asparagina) eran resistentes. Para el gen *rpoB*, la cepa 13545 era una cepa sensible mientras que la cepa 15552 (S531L, una serina situada en la posición de aminoácido 513 se cambió por leucina) y la cepa 202626 (H526D, una histidina situada en la posición de aminoácido 513 se cambió por ácido aspártico) eran resistentes.

40 Los componentes y condiciones de reacción fueron los siguientes:

Para el gen *gyrA*

45 Cebador limitante: 5' ACCAGGGCTGGGCCATGCGCACCA (SEC ID No. 12)
Cebador en exceso: 5' GGACCGCAGCCACGCCAAGTC (SEC ID N° 13)

Diana: Cepa 13545

5'GGACCGCAGCCACGCCAAGTCGGCCCGGTTCGGTTGCCGAGACCATGGG
CAACTACCACCCGCACGGCGACGCGTCGATCTACGACAGCCTGGTGCGCA
50 TGGCCCAGCCCTGGT (SEC ID N° 14)

Diana: Cepa 202626

Idéntica a la cepa 13545

55 Diana: Cepa 15552

5'GGACCGCAGCCACGCCAAGTCGGCCCGGTCGGTTGCCGAGACCATGGG
CAACTACCACCCGCACGGCGACGTGTCGATCTACGACAGCCTGGTGC
TGGCCAGCCCTGGT (SEC ID N° 15)

Sonda 1:

5 5' CGACCGGGCC-BHQ2 (SEC ID No. 16)

Sonda 2:

10 5' Cal Red 610-AACCCATGGTCTCGGCAACTT-BHQ2 (SEC ID No. 17)

Sonda 3:

15 5' Cal Red 610-AATCGCCGTGCGGGTGGTAGTT- BHQ2 (SEC ID No. 18)

Sonda 4:

5'GCTGTCGTAGATCGACGCG-BHQ2 (SEC ID No. 19)

Para el gen katG

20

Cebador limitante: 5' AGCGCCCACTCGTAGCCGTACAGGATCTCGAGGAAAC (SEC ID N° 20)

Cebador en exceso: 5' TCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCAC (SEC ID N° 21)

Diana: Cepa 202626

25

GCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCGGAACCGGTAAGGACGCGATC
ACCAGCGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACGAAATGGGACA
ACAGTTTCCTCGAGATCCTGTACGGCTACGAGTGGGAGCT (SEC ID N° 22)

Diana: Cepa 13545

30

GCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCGGAACCGGTAAGGACGCGATC
ACCACCGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACGAAATGGGACA
ACAGTTTCCTCGAGATCCTGTACGGCTACGAGTGGGAGCT (SEC ID N° 23)

Diana: Cepa 15552

35

GCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCGGAACCGGTAAGGACGCGATC
ACCAACGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACGAAATGGGACA
ACAGTTTCCTCGAGATCCTGTACGGCTACGAGTGGGAGCT (SEC ID N° 24)

Sonda 1:

5' Cal Orange 560-AAGTGATCGCGTCCTTACCTT-BHQ2 (SEC ID No. 25)

40

Sonda 2:

5' GACCTCGATGCAGCTG-BHQ2 (SEC ID No. 26)

Para el gen rpoB

45

Cebador limitante: el mismo que en el Ejemplo 1

Cebador en exceso: el mismo que en el Ejemplo 1

Diana: Cepa 202626

5'CCGGTGGTCGCCGCGATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGAGCC
 AATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACCGACAAGCGCCGA
 CTGTCGGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTACGTGAGCGTGCCGGGCTGGA
 G (SEC ID N° 27)

Diana: Cepa 15552

Mismo que la cepa 9249 definida en el Ejemplo 1

Diana: Cepa 13545

Definida en el Ejemplo 1

Sondas usadas para el gen rpoB:

Sondas 1-6 definidas en el Ejemplo 1.

El subrayado de una secuencia diana denota la situación del cambio de nucleótido en la cepa sensible a fármaco.

Las amplificaciones mediante LATE PCR se llevaron a cabo por triplicado en un volumen de 25 ul que consistía en 1X tampón PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA), MgCl₂ 2 mM, dNTPs 200 nM, Cebador limitante 50 nM y Cebador en exceso 1000 nM para cada conjunto de cebadores, 1,25 unidades de ADN polimerasa Platinum Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA), para las sondas de gyrA. 500 nM de las sondas 1 y 3 con 200 nM de las sondas 2 y 4, para las sondas de katG, 200 nM de sonda 1 y 500 nM de sonda 2, y para las sondas de rpoB, se usaron las concentraciones definidas en el Ejemplo 1. Para todas las cepas analizadas se utilizaron aproximadamente 1000 genomas equivalentes de diana preamplificada, y las reacciones de amplificación de cada cepa se realizaron por triplicado.

El perfil térmico de la reacción de amplificación fue el siguiente: 98°C/3 min durante 1 ciclo, seguido por 98°C/10 s 75°C/40 s durante 50 ciclos, seguido de un inicio de la hibridación a 75°C con decrementos de 1°C en intervalos de 30 s hasta 34°C, seguido por 10 min a 34°C. Esto fue seguido de un inicio de la fusión a 34°C con incrementos de 1°C en intervalos de 30 s hasta 81°C.

Las hibridaciones sonda-diana se analizaron por análisis de la curva de fusión usando la primera derivada para cada fluorescencia independientemente en un intervalo de temperatura comprendido entre 35°C y 78°C. A partir de cada conjunto de datos, el valor de fluorescencia más alto se utilizó para normalizar los datos a la unidad. Si el valor usado es negativo, entonces se multiplica por -15 (menos quince), si el valor usado es positivo, entonces se multiplica por +15 (más quince). Cada una de las cepas sometida a ensayo se diferenciaba en lo que respecta a la resistencia fármacos. Véase la Tabla 1 siguiente. Por ejemplo, la cepa 13545 es resistente a los fármacos de isoniazida pero eran sensibles a fluoroquinolonas y rifampicina mientras que la cepa 15552 es resistente a los tres fármacos.

Tabla 1

Fármaco	Gen	Cepa 13545	Cepa 202626	Cepa 15552
Fluorquinolonas	gyrA	Sensible	Sensible	Resistente
Isoniazida	katG	Resistente	Sensible	Resistente
Rifampicina	rpoB	Sensible	Resistente	Resistente

La Fig. 5 ilustra la unión de la sonda a cebadores y sondas de la cepa 51, la gyrA diana de la cepa 13545, que, puesto que los cebadores eran específicamente complementarios de la hebra diana original, es idéntica a la hebra del Cebador en exceso. En la Fig. 5 la porción subrayada 53 de la secuencia 51 son los nucleótidos del Cebador en exceso y la secuencia 52 es el Cebador limitante. Las sondas 1-4 se muestran hibridadas a la hebra 51 en una orientación 3' a 5' con sus extremos incorrectamente emparejados encima. Las sondas se marcaron con sus respectivos inactivadores o fluoróforos (no mostrados) como se ha descrito anteriormente. La cepa 15552 difiere con respecto al extremo 5' en la posición 72, un nucleótido T de ambas cepas 13545 y 202626 que tiene un nucleótido C

en dicha posición.

La Fig. 6 ilustra la unión de la sonda a cebadores y sondas de la cepa 61, la katG diana de la cepa 202626, que, puesto que los cebadores eran específicamente complementarios de la hebra diana original, es idéntica a la hebra del Cebador en exceso; esto es, uno de los tres productos monocatenarios de la reacción de amplificación por LATE-PCR. En la Fig. 6, la secuencia 63 subrayada corresponde a los nucleótidos del Cebador en exceso, y la secuencia 62 subrayada es el Cebador limitante. Las sondas 1, 2 se muestran hibridadas a la hebra 61 en una orientación 3' a 5' con sus extremos incorrectamente emparejados encima. Con respecto al extremo 5' de la hebra 61, las tres cepas se diferencian en la posición 56 (G, en negrita) a la Sonda 2. En la posición 54 hay una "G" como se muestra para la cepa 202626, pero es una "C" en la cepa 13545 y una "A" en la cepa 15552. El Cebador en exceso incluye un emparejamiento incorrecto deliberado en el extremo 5' (una "T" en lugar de la "G" en cada una de las dianas) para reducir el cebado incorrecto potencial durante la fase lineal de la amplificación mediante LATE-PCR.

El perfil térmico de la reacción de amplificación fue el siguiente: 98°C/3 min durante 1 ciclo, seguido por 98°C/10 s/75°C/40 s durante 50 ciclos, seguido de un inicio de la hibridación a 75°C con decrementos de 1°C en intervalos de 30 s hasta 34°C seguido por 10 min a 34°C. Esto fue seguido de un inicio de la fusión a 34°C con incrementos de 1°C en intervalos de 30 s hasta 81°C.

La Fig. 7A presenta las lecturas de fluorescencia normalizadas correspondientes a las seis sondas del gen rpoB en tres cepas diferentes de *M. tuberculosis* en función de la temperatura. El círculo 711 representa las réplicas de la cepa 202626, mientras que el círculo 712 muestra las réplicas para la cepa 15552 y el círculo 713 son las réplicas de la cepa 13545. La Fig. 7B muestra los resultados de las sondas de gyrA, que distinguen las cepas sensibles 202626 y 13545 (círculo 714) de la cepa resistente a fármacos 15552 (círculo 715). Los resultados de las sondas del gen katG se muestran en la Fig. 7C, donde los tres derivados de fusión son diferentes, el círculo 716 son réplicas de la cepa sensible 202626, mientras que las cepas resistentes 13545 y 15552 están representadas por el círculo 717 y el círculo 718, respectivamente.

Ejemplo 4

30 Uso de sondas de múltiples colores para identificación de la especie

Para demostrar la capacidad de las realizaciones de los métodos proporcionados en el presente documento para analizar secuencias largas, el método se utilizó para distinguir entre especies de nematodos. Los ensayos mediante LATE-PCR se llevaron a cabo usando un conjunto de 3 Cebadores limitantes y un Cebador en exceso para el gen mitocondrial citocromo oxidasa I. Los componentes y condiciones de reacción fueron los siguientes. En las secuencias de cebador y sonda, los nucleótidos incorrectamente emparejados con la secuencia de *C. elegans* se han identificado con un asterisco (*). En las secuencias sonda, se han subrayado los nucleótidos añadidos para formar un tallo de dos pares de bases.

Cebador limitante uno

40 5'-GGTT*ATACCTAG*TATAATT*GGTGGTTTTGGTAAT*TG (SEC ID No.28)

Cebador limitante dos

5'-GGTT*ATACCTAG*TATAATT*GGTGGTTTTGGTAACTG SEC ID No. 29)

Cebador limitante tres

5'-GGTT*ATACCTAG*TATAATT*GGTGGTTTTGGC*AAT*TG (SEC ID No. 30)

45 Cebador en exceso 5'-A*CTA*GGATCAAAAAA*GAAGTATTA*AAATTACGATC (SEC ID N° 31)

Diana; *Caenorhabditis elegans*

5'-

TCTTGGATCAAAAAATGAAGTATTTAAATTACGATCAGTTAACAACATAG
TAATAGCCCCTGCTAAAACCGGTAGAGATAAAACCAGTAAAAACACTGTT
ACAAATACAGTTCAAACAAATAAAGTTATATGTTCTAATGAAATAGA
ACTTCTACGTAAATTTTTAGTAGTACACATAAAATTAATACCACCTAAGATAGA
TCTTAACCCTGCTGCATGTAAACTAAAAATAGCTAAATCTACTCTACTTCC
AGGGTGCCCCATTGTTCTTAAAGGTGGGTAGACTGTTACCTAGTCCCACA
ACCTATATCTACAAAACAAGCATCTAAAATTAATAATATAGATGTAGGTA
ATAACCAAATCTTAAATTATTTAAACGTGGAAATCTTATATCAGGTGCTC
CTAACATAAGTGGTAATAATCAGTTACCAAACCACCGATTATAGTAGGT
ATTACC (SEC ID N° 32)

Diana; *Steinernema feltiae*

5'-

TCTAGGATCAAAAAAAGAAGTATTTAAATTACGGTCTGTAAGAAGTATAG
TAATTGCCCCAGCTAAAACCGGTAAAGAAAGAACAAGAAGGAAA
ACTGTAAACAAAACAGTTCAAACAAAAGACTCATATGCTCTAAAGAAATAGAG
CTTCTACGAAGATTCTTAGTAGTACATATAAAATTAATAGCCCCCAA
AATAGAGCTTACACCAGCACAATGAAGACTAAAAATAGCTAAATCA
ACCCTGTTTCCAGGATGGCCTAAAGTACTTAAAGGAGGATAAACAG
TTCAACTAGTACACACCCCTGTATCTACAAAACAAGCATCTAAAAT
TAATAATATAGCAGTGGTAATAACCAA
AAACTTAAATTATTTAAACGAGGAAATCTTATATCCGG
AGCACCAAGAAGGAACTAATCAATTTCCAAATCCTCCNNNNNNNN
NN (SEC ID N° 33)

5

Secuencias sonda;

Sonda uno (sonda inactivadora de la sonda de señalización Cal Orange)

10 5'-AA*TATTACCT*T*TG*ATGTTAGGG*GCT*CCTGATATAAGT*TTT-BHQ1 (SEC ID NO. 34)

Sonda dos (sonda de señalización de Cal Orange)

ATCCT*CGTTTAAATAATTTAAGT*TTTTGA*TTATTACCTACT*TCAT-BHQ1
(SEC ID N° 35)

15 Sonda tres (sonda inactivadora de la primera sonda de señalización Cal Orange)

5'-

TT*TG*TTT*TG*T*T*G*TTG*G*GATT*CTTGTTTTGTT*GATATAGGTG*GT
GGAA-BHQ2 (SEC ID N° 36)

Sonda cuatro (sonda de señalización de Cal Red)

5'-CalRed- A*ACTG*GT*TGAACT*GTT*TACCCT*CCTTTAAGAACT*T-BHQ2 (SEC ID No. 37)

5 Sonda cinco (sonda inactivadora de la segunda sonda de señalización Cal Orange)

5'-

AAG*TA*GGT*CAT*CCTGGT*AGTAC*T*GTAGATTTT*GT*TATTTTAC*
TT-BHQ2 ((SEC ID N° 38)

10 Sonda seis (sonda de señalización de Cal Red)

5'-CalRed-

ATG*CATGG*T*GCT*GGT*TTT*AGT*TCTATT*TTG*GGTGC*TTAT-BHQ2
(SEC ID N° 39)

Sonda siete (sonda inactivadora de la primera sonda de señalización Quasar)

15 5'-

ATTAATTTTATGG*GTACTACTG*T*T*AAG*A*A*T*CT*G*C*GT*AGTTTAT-
BHQ2 (SEC ID N° 40)

Sonda ocho (primera sonda de señalización con Quásar)

20 Sonda nueve (sonda inactivadora de la segunda sonda de señalización Quasar)

5'-TT*TTTGTG*ACT*GTT*TTTTG*T*TGGTTC*TG*TCTCT*AA-BHQ2 (SEC ID No. 42)

Sonda diez (segunda sonda de señalización con Quásar)

25

5'-Quasar-TTCCT*GTTTTAGG*T*GGGGCTATTACTATA*TTGTAACTAA-
BHQ2 (SEC ID N° 43)

30 La Fig. 8 muestra la hebra 81, que es la parte de la hebra del Cebador en exceso que se encuentra entre los cebadores (no mostrados) de la amplificación de la secuencia diana de *C. elegans*. En la Fig. 8, los restos inactivadores se muestran mediante (●), Los fluoróforos Quasar se muestran mediante (*), Los fluoróforos Cal Red se muestran mediante (★), y el fluoróforo Cal Orange se muestra mediante (♣). Los oligonucleótidos 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90 y 91 son de la Sonda 10 a la Sonda uno, respectivamente.

35 El ADN de un solo nematodo se extrajo introduciendo el gusano individual en un volumen de 25 ul de un tampón de lisis que contenía 100 ug/ml de proteinasa K, Tris-Cl 10 mM pH 8,3, y SDS (dodecil sulfato de sodio) 5 uM; calentamiento a 50°C durante 30 min seguido por 95°C durante 10 min; y después adición de 25 ul de tampón Tris-Cl 10 mM pH 8,3 antes de su almacenamiento a -20°C.

40 Las amplificaciones mediante LATE PCR se llevaron a cabo en un volumen de 25 ul que consistía en 1X tampón PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA), 100 nM de cada sonda, MgCl₂ 2 mM, dNTPs 250 nM, 100 nM de cada cebador limitante, 1000 nM de cebador en exceso, 1,25 unidades de ADN polimerasa Platinum Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 1 ul de ADN de nematodo anteriormente extraído con aproximadamente 10.000 genomas mitocondriales. Las reacciones de amplificación se realizaron en conjuntos por triplicado.

45 Las condiciones del perfil térmico para estas reacciones fueron las siguientes: 95°C durante 3 min seguido por 95°C/5 s-55°C/10 s-72°C/45 s durante 5 ciclos seguido por 95°C/5 s- 64°C/10 s- 72°C/45 s durante 45 ciclos seguido por inicio de la fusión a 25°C con incrementos de 1°C en intervalos de 30 hasta 95°C seguido por hibridación a partir de 95°C con decrementos de 1°C en intervalos de 30 hasta 25°C. El instrumento utilizado para el análisis mediante amplificación e hibridación fue un instrumento Bio-Rad IQ5 (Bio-Rad, Hercules, California).

Las hibridaciones sonda-diana se analizaron mediante el análisis de la curva de hibridación usando la primera derivada para cada fluoróforo por separado (Cal Orange 560, Cal Red 610 y Quasar 670 de Biosearch Technologies, Novato CA) para un intervalo de temperaturas entre 65°C y 25°C. El valor de la fluorescencia a 65°C se restó de todos los valores de la fluorescencia y, por tanto, es cero a 65°C. A partir de este conjunto de datos, el valor de fluorescencia más alto se utilizó para normalizar los datos a la unidad. Si el valor usado fuera negativo, se multiplicó por (-15); si fuera un número positivo, se multiplicó por quince (+15). Esto generó valores numéricos que posteriormente se utilizaron usando un formato de código de barras de 5 bit.

Las Figs. 9A-9C presentan las lecturas de fluorescencia normalizada para las sondas Cal Orange 560, Cal Red 610, y Quasar 670, respectivamente, de la diana *Steinernema feltiae* en función de la temperatura. La Fig. 9A muestra las lecturas de las sondas Cal Orange 560 donde el círculo 911 representa las tres réplicas de las reacciones de amplificación. La Fig. 9B muestra las lecturas de las sondas Cal Red 610 donde el círculo 912 representa las tres réplicas de las reacciones de amplificación. La Fig. 9C muestra las lecturas de las sondas Quasar 670 donde el círculo 913 representa las tres réplicas de las reacciones de amplificación.

Las Figs. 10A-10C presentan las lecturas de fluorescencia normalizada para las sondas Cal Orange 560, Cal Red 610, y Quasar 670, respectivamente, de la diana *Caenorhabditis elegans*. La Fig. 10A muestra las lecturas de las sondas Cal Orange 560 donde el círculo 1011 representa las tres réplicas de las reacciones de amplificación. La Fig. 10B muestra las lecturas de las sondas Cal Red 610 donde el círculo 1012 representa las tres réplicas de las reacciones de amplificación. La Fig. 10C muestra las lecturas de las sondas Quasar 670 donde el círculo 1013 representa las tres réplicas de las reacciones de amplificación.

Las Figs. 11A-11C muestran el formato de código de barras de 5 bit que se traduce directamente de cada valor de fluorescencia normalizado (Cal Orange 560, Cal Red 610, y Quasar 670 respectivamente) obtenidos del análisis de hibridación de la diana *Steinernema feltiae*. La codificación es un formato de 5 bit que representa los valores de la fluorescencia obtenidos para cada decremento de un grado en un intervalo de temperatura entre 65°C y 25°C en forma entera. Para cada decremento, el primer bit es una determinación de si el valor es mayor o igual a cero, que se marca como 'más' (color negro) mientras que los valores por debajo de cero se marcan como 'menos' (sin color). Los siguientes 4 bits representan los enteros 1, 2, 4, y 8 para los valores de la fluorescencia obtenidos mediante el análisis. Por ejemplo, si a una temperatura de 45°C el valor entero de la fluorescencia de Cal Orange 560 es 12, entonces, el bit 1 no tiene color, los bits 2 y 3 (que representan los enteros 1 y 2) no tienen color, y los bits 4 y 5 (que representan los enteros 4 y 8) son de color negro. La Fig. 11A son los valores de fluorescencia obtenidos con las sondas Cal Orange 560 convertidas en un código de barras de 5 bits a partir de una sola reacción, y muestra cómo se dispone el código de barras a cada temperatura con los bits dispuestos verticalmente. La Fig. 11B son los valores de fluorescencia obtenidos con las sondas Cal Orange 560 convertidas en un código de barras de 5 bits a partir de una sola reacción. La Fig. 11C son los valores de fluorescencia obtenidos con las sondas Quasar 670 convertidas en un código de barras de a partir de una sola reacción.

Ejemplo 5

Ensayo de septicemia.

La septicemia puede ser el resultado de la infección por cualquiera de numerosas especies bacterianas. El ensayo presentado en este ejemplo demuestra la capacidad para distinguir entre especies usando los métodos analíticos proporcionados en el presente documento con una amplificación en un solo tubo mediante LATE-PCR y el método de detección. Una región del gen ribosómico bacteriano de 16S se seleccionó para el análisis, ya que se sabe que la región tiene secuencias relativamente conservadas que flanquean una región hipervariable. Se usaron un único Cebador limitante y un único Cebador en exceso complementario de las secuencias conservadas que flanquean la región hipervariable V3 del gen de 16S.

Para un panel de ensayo, se utilizaron once especies bacterianas identificadas en la Tabla 2 (las abreviaturas utilizadas en el resto del ejemplo se proporcionan en la Tabla 2).

Tabla 2
Panel de especies bacterianas

Especies bacterianas	Abreviatura
<i>Acinetobacter baumannii</i>	AB
<i>Acinetobacter</i> sp.	ASP
<i>Enterobacter aerogenes</i>	EA
<i>Enterobacter cloacae</i>	EC
<i>Enterococcus faecalis</i>	ENFS
<i>Enterococcus faecium</i>	ENFM
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KP
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA
<i>Staphylococcus aureus</i>	COL
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	SE

Staphylococcus haemolyticus SH

La secuencia de genes a utilizar se seleccionó examinando las secuencias de las especies del panel para determinar una secuencia que encaja con los criterios anteriormente descritos y cuya región variable incluye suficientes diferencias entre las especies diana y especies no diana estrechamente relacionadas mediante una búsqueda BLAST, un programa informático que compara secuencias con una biblioteca de secuencias conocidas, comparación con el NCBI Genbank, una base de datos estadounidense de bibliotecas de secuencias conocidas. Con este método, que es conocido en la técnica, se seleccionó una región de 203 pares de bases, a saber, los nucleótidos 325-527, de *Klebsiella pneumoniae*, número de referencia NCBI Genbank NC_011283 del ARN de 16S. La secuencia génica de la región anterior de *Klebsiella pneumoniae* se descargó a un programa informático para diseño del cebador y de la sonda. Visual OMP (DNASoftware, Inc., Ann Arbor, Michigan, EE.UU.) que se utilizó como programa informático para el diseño del ensayo. Con el programa informático de diseño se diseñó un conjunto de cebadores y un conjunto de sondas que comprendían cuatro sondas de señalización (que por comodidad se denominan como sondas "ON") y cuatro sondas inactivadoras (que por comodidad se denominan como sondas "OFF"). Para conseguir un diseño final de cebadores y sondas, el diseño inicial se trató como prospectivo. Varias de las secuencias seleccionadas como secuencias de diseño se analizaron en otra búsqueda BLAST para confirmar la correcta homología con las secuencias diana, y para confirmar que los cebadores se diferenciaban lo suficiente de los organismos no diana para evitar su amplificación/detección. A continuación, una de las especies diana de la Tabla 2, *Staphylococcus aureus*, se sometió a ensayo en una amplificación independiente utilizando ADN genómico bacteriano con los cebadores y el colorante SYBR Green para detección usando PCR en tiempo real y análisis de la curva de fusión para comprobar si la eficacia de amplificación era aceptable, determinado por la linealidad del ciclo umbral (CT) en función de la concentración de la diana y la producción de un producto de amplificación específico ("amplicón") medido con el análisis de la curva de fusión.

Usando el método anterior, se diseñaron los siguientes cebadores y sondas. Se resaltarán que cada una de las sondas de señalización, u "ON", es una sonda de baliza molecular que tiene un tallo de dos nucleótidos, con adición de nucleótidos que no son complementarios de las secuencias diana según necesidad (dichos nucleótidos adicionales se indican en negrita para su identificación). Se resaltarán también que todas las sondas de señalización tienen un fluoróforo Quasar 670 (Biosearch Technologies, Novato, California, EE.UU.) en un extremo, y un inactivador Black Hole 2 ("BHQ2") (Biosearch Technologies) en el otro extremo, mientras que todas las sondas inactivadoras tienen un inactivador Black Hole 2 pero no tienen fluoróforo. Las T_f del cebador y la sonda indicados son las temperaturas de fusión calculadas ajustadas según la concentración de LATE-PCR.

Par de cebadores

- 35 Cebador limitante: CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT, $T_f=74,7$ (SEC ID N° 44)
 Cebador en exceso: GTATTACCGCGGCTGCTGGCA, $T_f=72,1$ (SEC ID N° 45)
- 40 Sonda "Quasar con 1 off": AAGGGGAATATTGCACAATGGTT-BHQ2 (SEC ID No. 46)
 Sonda "Quasar con 1 on": Quasar 670- AAGCGAAAGCCTGATGCAGCCATT-BHQ2 (SEC ID No. 47)
 Sonda "Quasar con 2 on": BHQ2-TAGCCGCGTGTGTGAAGAATA-Quasar 670 (SEC ID No.48)
- 45 Sonda "Quasar con 2 off": BHQ2-TTGGCCTTCGGATTGTAAAGCACTTAA-C3 Enlazador de carbono (SEC ID No. 49)
 Sonda "Quasar con 1 off": TATTAGTAGGGAGGAAGTA-BHQ2 (SEC ID No. 50)
- 50 Sonda "Quasar 1 on": Quasar 670-TTATATGTGTAAGTAAGTACTGTGCACATCAA-BHQ2 (SEC ID No. 51)
 Sonda "Quasar 2 off": TTGACGTTACCCGCAA-BHQ2 (SEC ID No. 52)
- 55 Sonda "Quasar 2 on": Quasar 670-TTGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGAA-BHQ2 (SEC ID No. 53)

El alineamiento de los cebadores y sondas sobre las secuencias diana seleccionadas como secuencias de diseño se muestra en la Fig. 12, que presenta solamente una hebra de cada secuencia diana. Las posiciones de nucleótidos se muestran en la columna de la derecha de la Fig. 12. Las secuencias de la columna marcada como 121 corresponden al Cebador limitante, y las secuencias 130 corresponden al Cebador en exceso. La ubicación de la sonda inactivadora "Quasar con 1 off" es la columna de secuencias 122. La ubicación de la sonda de señalización "Quasar con 1 on" es la columna de secuencias 123. La ubicación de la sonda de señalización "Quasar con 2 on" es la columna de secuencias 124. La ubicación de la sonda inactivadora "Quasar con 2 off" es la columna de secuencias 125. La ubicación de la sonda inactivadora "Quasar 1 off" es la columna de secuencias 126. La ubicación de la sonda de señalización "Quasar 1 on" es la columna de secuencias 127. La ubicación de la sonda inactivadora "Quasar 2 off" es la columna de secuencias 128. La ubicación de la sonda de señalización "Quasar 2 on" es la

columna de secuencias 129.

5 Las temperaturas de fusión (T_f) de las sondas inactivadoras (300 nM) y las porciones de bucle de las sondas de señalización (100 nM) del conjunto de sondas contra las diferentes secuencias diana de diseño (Fig. 12) que son representativas de las especies clínicas bacterias encontradas en la septicemia, según se predice mediante el programa de diseño Visual Omp, se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Temperaturas de fusión calculadas de la sonda, °C

SONDA Secuencia	<u>Quasar Con1 Off</u>	<u>Quasar Con1 On</u>	<u>Quasar Con 2 On</u>	<u>Quasar Con 2 Off</u>
KP	60,3	67,1	62,8	63,4
EA	60,3	67,1	56,1	54,2
AB	50,5	51,7	62,8	44,1
PA	50,5	62,8	59,9	
COL	13,1	50,2	49,6	26,8
SE	2,2	50,2	49,6	26,8
ENFS	6,4	23,8	54,0	15,2
SONDA Secuencia	<u>Quasar 1 Off</u>	<u>Quasar 1 On</u>	<u>Quasar 2 Off</u>	<u>Quasar 2 On</u>
KP	35,5	13,0	54,4	65,5
EA	20,2	13,0	40,0	65,5
AB	20,2	19,5	38,1	60,5
PA	36,2	-7,4	39,7	57,9
COL	20,2	62,4	8,4	34,8
SE	20,2	53,4	8,4	34,8
ENFS	20,2	21,7	-2,4	34,8

10 Veinticinco µl de mezclas de reacción LATE-PCR incluyendo una única diana de ADN genómico bacteriano se incluyeron en 10x tampón PCR 1x (concentración final), dNTPs 10 mM 250 µM (concentración final), Mg⁺⁺ 50 mM 3 nM (concentración final), 10 µM Cebador limitante 50 nM (concentración final), 100 µM Cebador en exceso 1000 nM (concentración final), 10 µM cada sonda de señalización 100 nM (concentración final), 10 µM cada sonda inactivadora 300 nM (concentración final), 1 Unidad de ADN polimerasa Platinum Taq y 106 copias de partida de ADN genómico bacteriano. También se amplificaron dos controles: un control solo de sondas (NTCP) que contenía todos los reactivos anteriores excepto la polimerasa Taq y el ADN genómica, y un control solo para la polimerasa Taq (NTCT) que contenía la polimerasa Taq y todos los reactivos anteriores excepto el ADN genómico.

20 La amplificación y la detección de las tres muestras replicadas de cada diana y cada control se realizaron con un termociclador IQ5 de BioRad (Hercules, California, EE.UU.) usando el siguiente protocolo: desnaturalización a 95 °C durante tres minutos, seguido de 35 ciclos de 95 °C durante 10 segundos, 69°C durante 15 segundo y 72 °C durante 45 segundos. Tras la amplificación, se generó una curva de fusión a partir de 25 °C y progresando hasta 80 °C en etapas de un grado y treinta segundos en cada uno, y después se generó una curva de hibridación a partir de 80 °C y progresando a 25 °C en etapas de un grado y treinta segundos en cada uno, con adquisición de datos de fluorescencia Quasar 670 en cada etapa. Las diferentes curvas de hibridación se muestran en la Fig. 13, un gráfico de las intensidades normalizadas de fluorescentes Quasar 670 frente a la temperatura. Las intensidades de fluorescencia se normalizaron a 75 °C y se restó la fluorescencia de fondo del control NTCT a 75 grados, y después el valor de la fluorescencia más alta se normalizó a 1,0. En la Fig. 13, el círculo 131 representa las curvas de fusión del control NTCP, el círculo 132 representa las curvas de fusión del control NTCT, el círculo 133 representa las curvas de fusión de la diana AB, el círculo 134 representa las curvas de fusión de la diana ASP, el círculo 135 representa las curvas de fusión de la diana EA, el círculo 136 representa las curvas de fusión de la diana EC, circle137 representa las curvas de hibridación de la diana ENFS y la diana ENFM, que deberían ser iguales, el círculo 138 representa las curvas de hibridación de la diana KP, el círculo 139 representa las curvas de hibridación de la diana PA, el círculo 140 representa las curvas de hibridación de la diana COL, el círculo 141 representa las curvas de hibridación de la diana SE, y el círculo 142 representa las curvas de hibridación de la diana SH.

40 La Fig. 14 presenta la derivada de la hibridación -dF/dT de las curvas de hibridación. Los círculos numerados de la Fig. 14 identifican las curvas derivadas de la siguiente forma: el círculo 151 es las tres réplicas del control NTCP; el círculo 152, para el control NTCT; el círculo 153, para la diana AB; el círculo 154, para la diana ASP; el círculo 155, para la diana EA; el círculo 156, para la diana EC; el círculo 157, para la diana ENFS y la diana ENFM que proporcionan la misma señal; el círculo 158, para la diana KP; el círculo 159, para la diana PA; el círculo 160, para la

diana COL; el círculo 161, para la diana SE; y el círculo 162, para la diana SH.

Las curvas de intensidad de fluorescencia (Fig. 13) o las curvas derivadas (Fig. 14) se pueden utilizar como biblioteca. Una curva procedente de una muestra desconocida se puede comparar con la curva o curvas almacenadas para identificar la especie bacteriana que está presente. Alternativamente o además, se puede usar como biblioteca información digitalizada de cualquiera o ambas familias de curvas. Por ejemplo, para cada réplica de cada diana de la Fig. 13, se puede crear una tabla de relaciones. Una de dichas tablas construidas durante el desarrollo de las realizaciones de la presente invención es la relación entre la intensidad de fluorescencia a 25 °C y la intensidad a 30 °C, la relación de intensidad a 30 °C y la intensidad a 35 °C y así sucesivamente hasta que la temperatura sube cinco grados de una vez. La relación procedente de una muestra desconocida se puede comparar con la biblioteca de relaciones para identificar la especie que está presente. Como alternativa, de la Fig. 14 se puede preparar una tabla de temperaturas a las que aparecen los máximos y los mínimos. La Tabla 4 presenta dichas temperaturas para las curvas de la Fig. 14, donde un indicador positivo (+) representa la temperatura de un máximo y un indicador negativo (-) representa la temperatura de un mínimo. Los máximos y mínimos de una muestra desconocida se pueden comparar con la Tabla 4 para identificar la especie presente.

Tabla 4
Valores máximos y mínimos de los derivados de hibridación

Bacteria	Temperaturas (°C) del Máximo (+) y Mínimo (-)
AB	(+) 61, (-) 55, (+) 52, (-) 46
ASP	(+) 60, (-) 53
EA	(+) 66, (-) 63, (+) 60, (-) 54, (+) 52, (-) 49
EC	(+) 68, (-) 62, (+) 59, (-) 56
ENFS	(+) 55, (-) 36
ENFM	(+) 55, (-) 36
KP	(+) 68, (-) 63
PA	(+) 65, (-) 61, (+) 58, (-) 52, (+) 47, (-) 41
COL	(+) 61, (-) 55, (+) 50, (-) 43, (+) 37
SE	(+) 50, (-) 43, (+) 37
SH	(+) 49, (-) 43, (+) 37

La Tabla 4 muestra que las Tf de la mayoría de las muestras son muy diferentes porque su región de ARNr de 16S es muy variable, incluso para aquellas especies del mismo género como EA y EC, y AB y ASP tienen valores muy diferentes en la Tabla 4. Sin embargo, para ENFS y ENFM que tienen la misma secuencia de ADN de 16S, los valores son iguales, como estaba previsto. Incluso aquellas dianas con tan pocas diferencias como dos secuencias de ADN, SE y SH, muestran un conjunto diferente de valores en la Tabla 4, y tienen diferencias significativas en comparación con COL.

Ejemplo 6

Ensayo de septicemia con más de una única especie bacteriana presente.

En situaciones clínicas puede estar presente más de una única especie bacteriana y el ensayo de la septicemia debe poder diferenciar entre un modelo de señal fluorescente generado a partir de una única especie de bacteria del de una mezcla de dos o más especies.

Utilizando los mismos cebadores y sondas, y los reactivos de la PCR del Ejemplo 5, excepto que se incluyeron dos dianas de ADN genómico bacteriano, La Fig. 15 muestra las curvas de hibridación tras la normalización de los datos brutos a 75 °C, se restó el fondo NTCT sustrajo a 75 °C, y el valor de fluorescencia más alto se normalizó a 1,0 para las diferentes mezclas de dos especies bacterianas, donde la concentración de partida de una especie se mantiene constante mientras que la concentración de partida de la segunda especie se hace variar. El círculo 170 representa las NTCT; el círculo 171 representa las 10⁵ copias de partida de solo SE; el círculo 172 representa las 10⁶ copias de partida de solo COL; el círculo 173 representa una mezcla de las 10⁶ copias de partida de COL y las 10⁵ copias de partida de SE; el círculo 174 representa una mezcla de las 10⁵ copias de partida de COL y las 10⁵ copias de partida

de SE, el círculo 175 representa una mezcla de las 10^4 copias de partida de COL y las 10^5 copias de partida de SE.

La Fig. 15 muestra la resolución de las firmas fluorescentes de las mezclas. Se proporciona una firma fluorescente específica de las muestras puras y de cada una de las mezclas. En la Figura 15 se muestran las mezclas de las firmas fluorescentes de COL:SE de 1,0:0,0, 1,0:0,9, 1,0:1,0, 0,9:1,0 y 0,0:1,0. Las curvas de intensidad de fluorescencia (Fig. 15) se pueden utilizar como biblioteca. Se puede comparar una muestra desconocida con la curva o curvas almacenadas para identificar la especie bacteriana que está presente. Alternativamente o además, se puede usar como biblioteca información digitalizada de ambas familias de curvas. Por ejemplo, para cada réplica de cada diana de la Fig. 15, se puede crear una tabla de relaciones. Una de dichas tablas es la relación entre la intensidad de fluorescencia a 25 °C y la intensidad a 30 °C, la relación de intensidad a 30 °C y la intensidad a 35 °C y así sucesivamente hasta que la temperatura sube cinco grados de una vez. Las relaciones procedentes de una muestra desconocida se pueden comparar con la biblioteca de relaciones para identificar la especie o combinación de especies que está presente. A partir de estos datos resulta evidente que las mezclas donde el componente menor es menor del 10% del componente mayor no se van a resolver. La biblioteca de firmas fluorescentes puede desarrollarse para todas las mezclas entre concentraciones relativas de 1,0 a 0,1 de cada componente tomado en etapas de 0,1.

Ejemplo 7

20 Ensayo de septicemia

La secuencia de genes a utilizar se seleccionó examinando las secuencias de las especies del panel mostradas en la Tabla 2 del Ejemplo 5 para determinar una secuencia que encaja con los criterios anteriormente descritos y cuya región variable incluye suficientes diferencias entre las especies diana y especies no diana estrechamente relacionadas mediante una búsqueda BLAST, un programa informático que compara secuencias con una biblioteca de secuencias conocidas, comparación con el NCBI Genbank, una base de datos estadounidense de bibliotecas de secuencias conocidas. Con este método, se seleccionó una región de 475 pares de bases, a saber, los nucleótidos 321-795, de *Acinetobacter baumannii* (AB), número de referencia NCBI Genbank NC_010400 del ARN de 16S. La secuencia génica (véase la Figura 16) de la región anterior de AB se descargó a un programa informático para el diseño del cebador y la sonda. Visual OMP (DNASoftware, Inc., Ann Arbor, Michigan, EE.UU.) que se utilizó como programa informático para el diseño del ensayo. Con el programa informático de diseño se diseñó un conjunto de cebadores y un conjunto de sondas que comprendían ocho sondas de señalización ("ON") y ocho sondas inactivadoras ("OFF"). Para conseguir un diseño final de cebadores y sondas, el diseño inicial se trató como prospectivo. Varias de las secuencias se seleccionaron como secuencias de diseño, que se analizaron a través de otra investigación BLAST para confirmar la homología adecuada con las secuencias diana y para confirmar que los cebadores se diferenciaban lo suficiente de los organismos no diana para evitar su amplificación/detección. A continuación, una de las especies diana, AB, se sometió a ensayo en una amplificación independiente utilizando ADN genómico bacteriano con los cebadores y el colorante SYBR Green para detección usando PCR en tiempo real y análisis de la curva de fusión para comprobar si la eficacia de amplificación era aceptable, determinado por la linealidad del ciclo umbral (CT) en función de la concentración de la diana y la producción de un producto de amplificación específico ("amplicón") medido con el análisis de la curva de fusión.

Usando el método anterior, se diseñaron los siguientes cebadores y sondas. Cada una de las sondas de señalización, u "ON", es una sonda de baliza molecular que tiene un tallo de dos nucleótidos, con adición de nucleótidos que no son complementarios de las secuencias diana según necesidad (dichos nucleótidos adicionales se indican en negrita en las secuencias para su identificación). Cuatro de las sondas de señalización tienen un fluoróforo Cal Red 610 (Biosearch Technologies, Novato, California, EE.UU.) en un extremo, y un inactivador Black Hole 2 ("BHQ2") (Biosearch Technologies) en el otro extremo, y cuatro de las sondas de señalización tienen un fluoróforo Quasar 670 (Biosearch Technologies, Novato, California, EE.UU.) en un extremo, y un inactivador BHQ2 en el otro extremo. Las ocho sondas inactivadoras tienen un inactivador BHQ2 pero no un fluoróforo. Las Tf del cebador y la sonda indicados son las temperaturas de fusión calculadas ajustadas según la concentración de LATE-PCR.

55 Par de cebadores

Cebador limitante: CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT, Tf=74,7 (SEC ID N° 54)

Cebador en exceso: TGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTG, Tf=69,2 (SEC ID N° 55)

60 Sonda "Cal Red 5 off": ATAGGGTGCAGCGTTAATCT-BHQ2 (SEC ID No. 56)

Sonda "Cal Red 5 on": Cal Red 610- AAGGATTTACTGGGCGTAAAGCGTT-BHQ2 (SEC ID No. 57)

Sonda "Cal Red 6 off": TTGCGTAGGCGGCTTATTAAGTAA-BHQ2 (SEC ID No. 58)

65 Sonda "Cal Red 6on": Cal Red 610-AACGGATGTGAAATCCCCGAGCTT-BHQ2 (SEC ID No. 59)

ES 2 549 777 T3

Sonda "Cal Red 7off": TAACTTGGGAATTGCATTCGTA-BHQ2 (SEC ID N° 60)

Sonda "Cal Red 7on": Cal Red 610-ATACTGGTGAGCTAGAGTATGAT-BHQ2 (SEC ID No. 61)

5 Sonda "Cal Red 8off": GAAGAGGATGGTAGAATTCC-BHQ2 (SEC ID No. 62)

Sonda "Cal Red 8on": Cal Red 610-TAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTA-BHQ2 (SEC ID No. 63)

10 Sonda "Quasar con 1 off": AAGGGGAATATTGCACAATGGTT-BHQ2 (SEC ID No. 64)

Sonda "Quasar con 1 on":

Quasar 670- AAGCGAAAGCCTGATGCAGCCATT-BHQ2 (SEC ID No. 65)

15 Sonda "Quasar con 2 on":

BHQ2-TAGCCGCGTGTGTGAAGAATA-Quasar 670 (SEC ID No.66)

Sonda "Quasar con 2 off":

20 BHQ2-TTGGCCTTCGGATTGTAAAGCACTTAA-C3 Enlazador de carbono (SEC ID No. 67)

Sonda "Quasar con 1 off": TATTAGTAGGGAGGAAGTA-BHQ2 (SEC ID No. 68)

25 Sonda "Quasar 1 on":

Quasar 670-TTATATGTGTAAGTAACTGTGCACATCAA-BHQ2 (SEC ID No. 69)

Sonda "Quasar con 2 off": TTGACGTTACCCGCAA-BHQ2 (SEC ID No. 70)

30 Sonda "Quasar 2 on":

Quasar 670-TTGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGAA-BHQ2 (SEC ID No. 71)

35 El alineamiento de los cebadores y sondas sobre las secuencias diana seleccionadas como secuencias de diseño se muestra en la Fig. 16, que presenta solamente una hebra de la secuencia diana AB. Las posiciones de nucleótidos se muestran en la columna de la izquierda de la Fig. 16. La secuencia 176 corresponde al Cebador limitante, y la secuencia 193 corresponde a la inversa del complemento del cebador en exceso. La ubicación de la sonda inactivadora "Quasar con 1 off" es la secuencia 177. La ubicación de la sonda de señalización "Quasar con 1 on" es la secuencias 178. La ubicación de la sonda de señalización "Quasar con 2 on" es la secuencias 179. La ubicación de la sonda inactivadora "Quasar con 2 off" es la secuencia 180. La ubicación de la sonda inactivadora "Quasar 1 off" es la secuencia 181. La ubicación de la sonda de señalización "Quasar 1 on" es la secuencia 182. La ubicación de la sonda inactivadora "Quasar 2 off" es la secuencia 183. La ubicación de la sonda de señalización "Quasar 2 on" es la secuencia 184. La ubicación de la sonda inactivadora "Quasar con 5 off" es la secuencia 185. La ubicación de la sonda de señalización "Quasar con 5 on" es la secuencia 186. La ubicación de la sonda inactivadora "Quasar 6 off" es la secuencia 187. La ubicación de la sonda de señalización "Quasar con 6 on" es la secuencia 188. La ubicación de la sonda inactivadora "Quasar con 7 off" es la secuencia 189. La ubicación de la sonda de señalización "Quasar con 7 on" es la secuencia 190. La ubicación de la sonda inactivadora "Quasar con 8 off" es la secuencia 191. La ubicación de la sonda de señalización "Quasar con 8 on" es la secuencia 192.

50 Las temperaturas de fusión (Tf) de las sondas inactivadoras (300 nM) y las porciones de bucle de las sondas de señalización (100 nM) del conjunto de sondas contra las diferentes secuencias diana de diseño (Fig. 16) que son representativas de las especies clínicas bacterias encontradas en la septicemia, según se predice mediante el programa de diseño Visual Omp, se muestran en la Tabla 5.

55

Tabla 5

SONDA	Temperaturas de fusión calculadas de la sonda, °C			
	<u>Quasar Con1 Off</u>	<u>Quasar Con1 On</u>	<u>Quasar Con 2 On</u>	<u>Quasar Con 2 Off</u>
KP	60,3	67,1	62,8	63,4
EA	60,3	67,1	56,1	54,2
AB	50,5	51,7	62,8	44,1
PA	50,5	65,6	62,8	59,9
COL	13,1	50,2	49,6	26,8
SE	2,2	50,2	49,6	26,8
ENFS	6,4	23,8	54,0	15,2

ES 2 549 777 T3

SONDA	Quasar 1 Off	Quasar 1 On	Quasar 2 Off	Quasar 2 On
Secuencia				
KP	35,5	13,0	54,4	65,5
EA	20,2	13,0	40,0	65,5
AB	20,2	19,5	38,1	60,5
PA	36,2	-7,4	39,7	57,9
COL	20,2	62,4	8,4	34,8
SE	20,2	53,4	8,4	34,8
ENFS	20,2	21,7	-2,4	34,8
SONDA	<u>Cal Red 5 Off</u>	<u>Cal Red 5 On</u>	<u>Cal Red 6 Off</u>	<u>Cal Red 6 On</u>
Secuencia				
KP	56,6	60,5	46	64,2
EA	56,6	60,5	46	64,2
AB	62,6	64,4	65,2	69,5
PA	56,4	60,5	32,7	60,4
COL	26,8	55,6	52,5	8,7
SE	29,4	55,6	52,5	8,7
ENFS	37,2	55,4	49,4	41,7
SONDA	<u>Cal Red 7 Off</u>	<u>Cal Red 7 On</u>	<u>Cal Red 8 Off</u>	<u>Cal Red 8 On</u>
Secuencia				
KP	48,2	24,7	37,2	67,1
EA	48,2	24,7	37,2	67,1
AB	59,1	59,4	55,9	67,1
PA	36,1	37,2	15,7	64
COL	-5,2	12,8	23,1	63,6
SE	-5,2	12,8	23,1	63,6
ENFS	-3,1	12,8	15,5	64

- 5 Veinticinco μ l de mezclas de reacción LATE-PCR incluyendo una única diana de ADN genómico bacteriano se incluyeron en 10x tampón PCR 1x (concentración final), dNTPs 10 mM 250 μ M (concentración final), Mg⁺⁺ 50 mM 3 nM (concentración final), 10 μ M Cebador limitante 50 nM (concentración final), 100 μ M Cebador en exceso 1000 nM (concentración final), 10 μ M cada sonda de señalización 100 nM (concentración final), 10 μ M cada sonda inactivadora 300 nM (concentración final), 1 unidad de ADN polimerasa GE puRe Taq, 0,5 perla, y 10⁶ copias de partida de ADN genómico. También se amplificó un control solo para la polimerasa Taq (NTCT) que contenía la polimerasa Taq y todos los reactivos anteriores excepto el ADN genómico.
- 10 La amplificación y la detección de las tres muestras replicadas de cada diana y cada control se realizaron con un Bio Rad (Hercules, California, EE.UU.) usando el siguiente protocolo: desnaturalización a 95 °C durante tres minutos, seguido de 50 ciclos de 95 °C durante 10 segundos, 65 °C durante 15 segundos y 72 °C durante 45 segundos. Tras la amplificación, se generó una curva de fusión a partir de 25 °C y progresando hasta 80 °C en etapas de un grado y treinta segundos en cada uno, y después se generó una curva de hibridación a partir de 80 °C y progresando a 25
- 15 °C en etapas de un grado y treinta segundos en cada uno, con adquisición de datos de fluorescencia de Cal Red 610 y Quasar 670 en cada etapa. Las diferentes curvas de hibridación se muestran en la Fig. 17A, un gráfico de las intensidades normalizadas de la fluorescencia de Cal Red 610 frente a la temperatura, y la Fig. 17B, un gráfico de las intensidades normalizadas de la fluorescencia de Quasar 670 frente a la temperatura. Las intensidades de fluorescencia se normalizaron a 75 °C y se restó la fluorescencia de fondo del control NTCT a 75 grados, y después
- 20 el valor de la fluorescencia más alta se normalizó a 1,0. En la Fig. 17A, el círculo 194 representa las curvas de fusión de la diana AB, el círculo 195 representa las curvas de fusión de la diana ASP, el círculo 196 representa las curvas de hibridación de la diana EA y la diana KP, que deberían ser iguales, el círculo 197 representa las curvas de hibridación de la diana ENFS y la diana ENFM, que deberían ser iguales, el círculo 198 representa las curvas de hibridación de la diana PA, el círculo 199 representa las curvas de hibridación de la diana COL, para la diana SE, y
- 25 para la diana SH que deberían ser iguales. En la Fig. 17B, el círculo 200 representa las curvas de fusión de la diana AB, el círculo 201 representa las curvas de fusión de la diana ASP, el círculo 202 representa las curvas de fusión de la diana EA, el círculo 203 representa las curvas de hibridación de la diana ENFS y la diana ENFM, que deberían ser iguales, el círculo 204 representa las curvas de hibridación de la diana KP, el círculo 205 representa las curvas de hibridación de la diana PA, el círculo 206 representa las curvas de hibridación de la diana COL, el círculo 207
- 30 representa las curvas de hibridación de la diana SE, y el círculo 208 representa las curvas de hibridación de la diana SH.

Se pueden analizar los datos de la Fig. 17A y 17B preparando las curvas derivadas y comparando los valores de temperatura máximos y mínimos, como se describe en el ejemplo 5 y se muestra en la Tabla 4.

35

Ejemplo 8

Análisis adicional del experimento del Ejemplo 4.

Utilizando la información de las secuencias presentada en el Ejemplo 4 y un programa informático conocido como VISUAL OMP versión 7.2.0.0 se determinó la temperatura de fusión eficaz para las dos sondas de señalización CalRed y sus sondas inactivadoras asociadas a sus secuencias diana de *C. Elegans*. Los resultados fueron los siguientes:

5 Sonda 3 (OFF): 51,7 °C,
 Sonda 4 (ON): 53,3 °C,
 Sonda 5 (OFF): 41,2 °C,
 Sonda 6 (ON): 26,3 °C.

10 La sonda 3 y la sonda 4 juntas comprenden un conjunto (o pareja) de sondas interactuantes, y la sonda 5 y la sonda 6 juntas comprenden un conjunto separado (o pareja) de sondas interactuantes. La diferencia en las temperaturas de fusión de la sonda 3 y la sonda 4 es = (+)1,6 °C, mientras que la diferencia en las temperaturas de fusión de la sonda 5 y la sonda 6 es = (-)15,9 °C. En el conjunto de la sonda 3/sonda 4, la sonda de señalización tiene la mayor temperatura de fusión calculada, mientras que en el conjunto de sonda 5/sonda 6, la sonda inactivadora tiene la mayor temperatura de fusión calculada.

15 La Fig. 10B presenta la curva derivada normalizada de las lecturas de fluorescencia para las sondas Cal Red 610 de la diana *Caenorhabditis elegans*, donde el círculo 1012 representa las tres reacciones de amplificación replicadas. Las condiciones, la diana y los detalles experimentales de los datos de la Fig. 10B se describen en el Ejemplo 4. La Fig. 18, el círculo 218, identifica las señales fluorescentes compuestas dependientes de la temperatura de las curvas de hibridación en esta reacción. Se usaron estos datos para generar las curvas de primera derivada dependientes de la temperatura que se muestran en la Fig. 10B. La Fig. 18, el círculo 219, identifica las señales fluorescentes compuestas dependientes de la temperatura de las sondas 3-6 en ausencia de un molde para la amplificación. La comparación de las señales fluorescentes en la Fig. 18 revela que la señal en la presencia de una diana amplificada (círculo 218) tiene un valor mayor que la señal en ausencia de la diana (señal 219) en el intervalo de 53 °C, tiene un valor menor a temperaturas aproximadamente entre 52 y 25 °C.

20 Cuando la temperatura de fusión de una sonda inactivadora es mayor que la temperatura de fusión de la sonda de señalización, a medida que la temperatura disminuye, la unión de la sonda de señalización a la diana se detecta como una disminución en la fluorescencia. Para maximizar la disminución en la fluorescencia debida a la unión de una sonda de señalización, la concentración de las moléculas de la sonda inactivadora debe ser al menos igual, y preferentemente mayor, la concentración de las moléculas de la sonda de señalización, y la temperatura de fusión de la sonda inactivadora para la diana (cualquier diana de secuencia conocida) debe ser preferentemente al menos 5 °C mayor, y lo más preferible al menos 10 °C mayor, que la temperatura de fusión de la sonda de señalización. En estas condiciones, la magnitud de la disminución de la fluorescencia dependiente de la temperatura dependerá de la concentración de moléculas diana presentes en la reacción, como se ilustra en la Fig. 19.

25 Cuando no están presentes moléculas diana en la reacción, la Fig. 19, línea 220, la extensión de la disminución de la fluorescencia dependiente de la temperatura en el sistema dependerá de la composición química del oligonucleótido de la sonda de señalización, incluyendo: 1) su longitud; 2) la naturaleza del resto fluorescente unido covalentemente; 3) la presencia o ausencia de un resto inactivador en el oligonucleótido; 4) la naturaleza de un resto fluorescente unido covalentemente. La disminución de la fluorescencia dependiente de la temperatura alcanzará un máximo cuando la concentración de moléculas diana presentes en la reacción excede la concentración de las moléculas de señalización presentes en la reacción, ilustrada en la Fig. 19 en la línea 222, con la condición de que la concentración de moléculas diana no exceda la concentración de moléculas inactivadoras. Esto que se observará a concentraciones intermedias de las moléculas diana como se ilustra en la Fig. 19 en la línea 221: la magnitud de la disminución de la fluorescencia intermediará el máximo de fluorescencia posible, Fig. 19, línea 222, y la mínima fluorescencia posible, Fig. 19 línea 220. Si se conoce la concentración de las sondas de señalización presentes en una reacción, una persona experta en la materia podría usar esta solución para establecer la concentración de las moléculas diana presentes en una reacción en cualquier momento, incluyendo: a) en presencia o ausencia de la amplificación de la diana; b) durante la amplificación de la diana; y/o c) tras la amplificación de la diana.

55 Ejemplo 9

Genotipado de SNP

Este ejemplo ilustra el uso de sondas para genotipar el polimorfismo de nucleótido único (SNP) rs373129 localizado en el gen CDKN2A supresor de tumores humanos.

60 El segmento de ADN genómico que contiene el sitio SNP que se va a genotipar se amplificó utilizando la PCR-LATE. Las sondas se diseñaron para hibridarse a temperaturas 10 °C por debajo de la temperatura de fusión del cebador limitante utilizado para la amplificación PCR-LATE. Se realizaron los cálculos de la T_f utilizando el software Visual OMP a partir del software de ADN (Ann Arbor, MI). La sonda OFF consiste en una sonda lineal marcada en el extremo 3' con un inactivador Black Hole 2 (BHQ2), Biosearch Technologies, Inc., Novato CA. Esta sonda se diseñó para emparejarse completamente con uno de los alelos SNP y emparejarse incorrectamente con el otro alelo de tal

manera que la temperatura de fusión de la sonda OFF hibridada con la diana de alelos T SNP emparejados era aproximadamente 52°C a 500 nM, suponiendo una concentración diana 150 nM; y la temperatura de fusión de la sonda OFF hibridada con la diana del alelo C SNP es de aproximadamente 41°C a 500 nM, suponiendo la misma concentración diana. La sonda ON consistía en una sonda lineal marcada en el extremo 5' con un fluoróforo Quasar 670 y en el extremo 3' con un inactivador BHQ2. Esta sonda se diseñó para tener una temperatura de fusión de 62°C y para hibridarse de manera adyacente al sitio de unión de la sonda OFF de tal manera que tras la unión al producto de la PCR, el resto fluoróforo de la sonda ON reside cerca del inactivador BHQ2 de la sonda OFF. Los componentes y condiciones de reacción fueron los siguientes:

10 Cebador limitante: 5' GTGAAGGGATTACAAGGCGTGAGGCAC 3', Tf=71,2 (SEC ID N° 72)

Cebador en exceso: 5' GGACTACTTAGCCTCCAATTCAC Tf=66,2 (SEC ID N° 73)

15 Sonda ON: QUASAR 670 - 5' CGATATTTATTCCAACATACACCGTG 3' BHQ 2, Tf=62,5 (SEC ID N° 74)

Sonda OFF: 5' CCGATCAAATTTATATT 3' BHQ 2, Tf=51,6 (SEC ID N° 75) (el nucleótido subrayado corresponde a la posición SNP)

20 PrimeSafe 060: 5'-DABCYL-CGCGGGCGTCAGGCATATAGGATACCGGGAC AGACGCCG CG-DABCYL-3' (SEC ID N° 76)

PrimeSafe 002: 5'-DABCYL- CGTAATTATAAT-C3separador-ATTATAATTACG DABCYL- 3' (SEC ID N° 77)

25 Primesafe (Rice et al. Nat Protoc. 2007; 2(10):2429-38), es un aditivo de la PCR que mantiene la fidelidad de la amplificación en un amplio intervalo de concentraciones diana suprimiendo el cebado incorrecto a lo largo de la reacción.

30 **Métodos:** Se obtuvieron los ADN genómicos de genotipos conocidos para el sitio rs3731239 SNP (alelos C/T) del Coriell Cell Repository (Camden, Nueva Jersey; Muestra de ADN NA10860 - alelos TT homocigóticos; Muestra de ADN NA10854 - alelos CT heterocigóticos; Muestra de ADNNA07348 - alelos CC homocigóticos). Se llevó a cabo la amplificación de la PCR-LATE, por triplicado, del segmento de ADN genómico que contiene el sitio SNP procedente de cada una de las anteriores muestras de ADN en 25 µl de reacción consistentes en 1X tampón de PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA), MgCl₃ 2 mM, dNTP 250 nM, 1 µM de cebador en exceso, Cebador limitante 50 nM, 500 nM de sonda OFF, 200 nM de sonda ON, 1,25 unidades de ADN polimerasa Platinum Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 1000 genomas equivalentes de ADN genómico (6 ng). Para este experimento, se optimizaron las reacciones de amplificación incluyendo en la mezcla de reacción una combinación de reactivos previstos para evitar el cebado incorrecto y para reducir la dispersión entre las muestras replicadas. En este experimento, se incluyeron reactivos para reducir el cebado incorrecto y mejorar la reproducibilidad, de acuerdo con la patente de los EE.UU. 7.517.977 concedida y la solicitud de patente internacional correspondiente WO 2006/044995. La mezcla de reacción incluía 25 nM de PrimeSafe 060 y 300 nM de PrimeSafe 002. Una reacción control consistía en controles sin molde (muestras NTC).

45 Se llevó a cabo la amplificación de la PCR-LATE en un sistema de detección de la PCR en Tiempo real Biorad IQ5. Las condiciones de la amplificación fueron de 95 °C durante 3 minutos, seguido de 70 ciclos de 95°C durante 10 segundos, 64°C durante 10 segundos, 72°C durante 20 segundos. La temperatura de reacción se llevó a continuación a 30 °C a una velocidad de 1 °C/min. Se recogieron señales fluorescentes cada 1°C a medida que cada muestra se calentaba a una velocidad de 1°C por 30 segundos desde 30°C a 80°C.

50 Las señales fluorescentes brutas recogidas de cada reacción de amplificación a cada temperatura se exportaron a Microsoft Excel. Las señales fluorescentes para curva de fusión dada se normalizaron a continuación de la siguiente forma: (a) las señales fluorescentes a cada temperatura se normalizaron en primer lugar para la fluorescencia de fondo dividiendo el valor de la señal fluorescente a cada temperatura por el valor de la señal fluorescente a 66 °C (una temperatura a la cual la sonda ON no se une a su diana), (b) el valor de la señal fluorescente resultante a cada temperatura se restó del valor de la señal fluorescente promedio de las muestras de NTC a dicha temperatura; y (c) los valores de la señal fluorescente resultante se normalizaron a continuación para el valor de la señal fluorescente a la temperatura a la cual se une la sonda ON a la totalidad de los productos de la PCR (58 °C) y a continuación se normalizaron al valor de la señal fluorescente a la temperatura a la cual se une la sonda OFF a la totalidad de los productos de la PCR y las señales procedentes de la sonda ON se apagaron (38°C). Esto último se llevó a cabo dividiendo secuencialmente cada valor de la señal fluorescente por los valores de la señal fluorescente a aquellas dos temperaturas. La Figura 20 muestra el modelo fluorescente normalizado resultante (fluorescencia frente a temperatura) para los tres genotipos. El círculo 223 identifica las muestras que eran homocigóticas para el alelo emparejado; el círculo 224 identifica las muestras que eran heterocigóticas; y el círculo 225 identifica las muestras que eran homocigóticas para el alelo emparejado incorrectamente. Cada genotipo generó una firma fluorescente característica. En la Fig. 20 la temperatura de 49°C es la temperatura a la cual las señales de fluorescencia normalizadas de los tres genotipos presentaron la mayor diferencia. Los valores a dicha temperatura única se consideraron estadísticamente adecuados para distinguir muestras de ADN homocigótico y heterocigótico para el

sitio de SNP rs3731239.

La Fig. 21 presenta la primera derivada de los modelos fluorescentes de la FIG. 20. El círculo 226 identifica las muestras que eran homocigóticas para los alelos emparejados; el círculo 227 identifica las muestras que eran heterocigóticas, y el círculo 228 identifica las muestras que eran homocigóticas para el alelo emparejado incorrectamente. Los valores positivos de la primera derivada ilustran la unión de la sonda ON, que es la misma para todos los genotipos. Los valores negativos de la primera derivada ilustra la unión específica de alelo de la sonda OFF. De esta manera, las curvas 226 de las muestras homocigóticas que contienen el alelo emparejado muestran un único máximo negativo de la Tf elevada; las curvas de las muestras homocigóticas que contienen los alelos emparejados incorrectamente muestran un único máximo negativo de la Tf menor; y las curvas 227 de las muestras heterocigóticas que contienen ambos alelos muestran dos máximos negativos que corresponden a los máximos negativos de los alelos SNP emparejados y emparejados de manera incorrecta.

Ejemplo 10

Tipado SPA de muestras de MRSA

Recientemente, se ha propuesto la secuenciación de ADN de la región polimórfica X, o repetición de secuencia corta (SSR), del gen de la proteína A (*spa*) para el tipado de *S. aureus*. La región polimórfica X consiste en un número variable de repeticiones de 24 pb, y está situada inmediatamente en la dirección 5' de la región que codifica la secuencia del extremo C de unión a la pared celular. La existencia de regiones bien conservadas que flanquean la secuencia codificante de la región X en *spa* permite el uso de cebadores para la amplificación por PCR y el tipado directo de la secuencia. Este ejemplo describe el uso de un ensayo LATE-PCR usando sondas ON/OFF para distinguir cepas de *S. aureus* basándose en la región de repetición X, y para crear una biblioteca de firmas donde se puedan identificar diferentes especies. El ensayo de este ejemplo fue diseñado y sometido a ensayo usando un panel de doce muestras de MRSA secuenciadas. El análisis de secuencia de las muestras se proporciona en la Tabla 6.

Tabla 6

Secuencias de las muestras MRSA	
Tipo de especie	secuencia repetición spa
COL I	YHGFMBQBLO (SEC ID No. 78)
N315 II	TJMBMDMGMK (SEC ID No. 79)
85/2082 III	WGKAOMQ (SEC ID No. 80)
CA05 IVA	A2AKEMBKB (SEC ID No. 81)
8/6-3P IVB	YHGFMBQBLO (SEC ID No. 82)
Q2314 IVC	TJMBMDMGGMK (SEC ID No. 83)
JCSC4469 IVD	TJMBMDMGMK (SEC ID N. 84)
AR43/3330.1 IVE	YMBQBLO (SEC ID No. 85)
HAR22 IVH	TJEJNF2MNF2MOMOKR (SEC ID No. 86)
WIS V	A2AKBEKBKB (SEC ID No. 87)
HDE288 VI	TJMBDMGMK (SEC ID No. 88)
BK20781 VIII	YHGFC2BQBLO (SEC ID No. 89)

* Para acortar la notación de la tabla, las letras de código que terminan en "1" en la nomenclatura convencional se han simplificado omitiendo este numeral

El ADN diana a utilizar para diseñar el ensayo se seleccionó examinando las secuencias de las especies del panel mostrado en la Tabla 6 y en el NCBI GenBank para determinar una secuencia que encaja con los criterios anteriormente descritos y cuya región variable incluye suficientes diferencias entre las especies diana. Con este método, se seleccionó una región de 507 pares de bases, a saber, los nucleótidos 262-768, del gen *spa* de *S. aureus*, MRSA252, número de referencia NCBI Genbank NC_002952. La secuencia génica de la región anterior de MRSA252 se descargó a un programa informático para diseño del cebador y de la sonda. Visual OMP (DNASoftware, Inc., Ann Arbor, Michigan, EE.UU.) que se utilizó como programa informático para el diseño del ensayo. Con el programa informático de diseño se diseñó un conjunto de cebadores y un conjunto de sondas que comprendían una sonda de señalización ("ON") y una inactivadora ("OFF"). Las moléculas de ácido nucleico de los códigos de repetición se obtuvieron de Shopsin et al., J. Clinical Microbiology, Noviembre de 1999, páginas 3556-3563. Para alinear las secuencias sonda potenciales con las diferentes secuencias de repetición, se utilizaron los complementos inversos de las secuencias repetidas obtenidas en dicho papel.

Para conseguir un diseño final de cebadores y sondas, el diseño inicial se trató como prospectivo. Varias de las secuencias se seleccionaron como secuencias de diseño, que se analizaron en otra alineación para confirmar la correcta homología con la secuencia diana.

Usando el método anterior, se diseñó una pareja de cebadores, que rodearon la secuencia diana, y una pareja de sondas. Las secuencias de los cebadores y las sondas, junto con la secuencia diana MRSA252, se proporcionan a continuación. El cebador en exceso en su cebador consenso. En este ejemplo se utilizaron dos sondas: una sonda

ON que tiene una secuencia consenso que se empareja con el mayor número de bases (19 de 24) en los posibles segmentos de repetición mostrados en Shopsin et al. y una sonda OFF con una secuencia consenso que se empareja con el siguiente mayor número de bases (15 de 24) en las posibles secuencias de repetición mostradas en Shopsin et al. Las sondas competirán por la hibridación una con otra de forma adyacente, y dan como resultado una firma en una curva de hibridación realizada tras la amplificación. La firma de hibridación se puede comparar a continuación con una librería de firmas y su correspondiente cepa de *S. aureus*.

Cada una de las sondas de señalización, u "ON", es una sonda de baliza molecular que tiene un tallo de dos nucleótidos, con adición de nucleótidos que no son complementarios de las secuencias diana según necesidad (dichos nucleótidos adicionales se indican en negrita en las secuencias para su identificación). La sonda de señalización tiene un fluoróforo Quasar 670 (Biosearch Technologies, Novato, California, EE.UU.) en un extremo, y un inactivador BHQ2 en el otro extremo. La sonda inactivadora tiene un inactivador BHQ2 pero no tiene fluoróforo. Las Tf del cebador y la sonda indicados son las temperaturas de fusión calculadas ajustadas según la concentración de LATE-PCR. Las Tf de la sonda son Tf contra secuencias perfectamente complementarias.

Cebador limitante: 5'-CTGTATCACCAGGTTTAACGACATGTA**CTCCGT**, Tf=71,0 (SEC ID N° 90)

Cebador en exceso: 5'-GCTAAATGATGCTCAAGCACCAA, Tf=67,2 (SEC ID N° 91)

Diana 507, 262-768 (MRSA 252):

5'-

CTGTATCACCAGGTTTAACGACATGTA**CTCCGT**TGCCGTCTTCTTTACCAG
G

CTTGTTGCCATCTTCTTTACCAGGCTTGT**TGCCATCTTCTTTACCAGGCTT**
TT

GCCATCTTCTTTACCAGGCTTGT**TGCCGTCTTCTTTACCAGGTTTGT**TGCCA
TC

TTCTTTGCCAGGTTTTTGT**TGTCTTCTTTACCAGGTTTGT**TGCCGTCTTCTT
TGCCAGGTTTTTGT**TGTCTTCTTTACCAGGTTTGT**TGCCGTCTTCTTTACC
AGGCTTGT**TGTCTTCTTTGCCAGGCTTGT**TGT**TGTCTTCTTCTTTTGGT**
GCTTGA

GCATCGTTTAGCTTTTTAGCTTCTGCTAAAATTTCTTTGCTCACTGAAGGAT
C

GTCTTTAAGGCTTTGGATGAAGCCGTTACGTTGTTCTT**CAGTTAAGTTAGG**
TAAATGTAAAATTT**CATAGAAAGCATTTTGT**TGTTCTTTGTTGAATTTGTTG
TCAGCTTTTGGTGCTTGTGCATCATT**TAGC** (SEC ID N° 92)

C

GTCTTTAAGGCTTTGGATGAAGCCGTTACGTTGTTCTT**CAGTTAAGTTAGG**
TAAATGTAAAATTT**CATAGAAAGCATTTTGT**TGTTCTTTGTTGAATTTGTTG
TCAGCTTTTGGTGCTTGTGCATCATT**TAGC** (SEC ID N° 92)

spa Sonda ON: 5'-Quasar 670-AACCAGGCTTGT**TGTCTTCTTT**-BHQ2, Tf=66,6 (SEC ID N° 93)

spa Sonda Off: 5'-AAGCCAGGTTTTT**TGCCATCTTCTTT**-BHQ2, Tf=59,8 (SEC ID N° 94)

Veinticinco µl de mezclas de reacción LATE-PCR incluyendo una única diana de ADN genómico bacteriano se incluyeron en 10x tampón PCR 1x (concentración final), dNTPs 10 mM 250 µM (concentración final), Mg⁺⁺ 50 mM 3 nM (concentración final), 10 µM Cebador limitante 50 nM (concentración final), 100 µM Cebador en exceso 1000 nM (concentración final), 10 µM sonda de señalización 100 nM (concentración final), 10 µM sonda inactivadora 100 nM (concentración final), 1,25 unidades de ADN polimerasa Platinum Taq, y 10⁶ copias de partida de ADN genómico. También se amplificó un control solo para la polimerasa Taq (NTCT) que contenía la polimerasa Taq y todos los reactivos anteriores excepto el ADN genómico.

La amplificación y la detección de las tres muestras replicadas de cada diana y cada control se realizaron con un Bio Rad (Hercules, California, EE.UU.) usando el siguiente protocolo: desnaturalización a 95 °C durante tres minutos, seguido de 50 ciclos de 95 °C durante 10 segundos, 65 °C durante 15 segundos y 72 °C durante 45 segundos. Tras la amplificación, se generó una curva de fusión a partir de 25 °C y progresando hasta 80 °C en etapas de un grado y

treinta segundos en cada uno, y después se generó una curva de hibridación a partir de 80 °C y progresando a 25 °C en etapas de un grado y treinta segundos en cada uno, con adquisición de datos de fluorescencia Quasar 670 en cada etapa. Las curvas de primera derivada de las diferentes curvas de hibridación se muestran en la Fig. 22. Las intensidades de fluorescencia se normalizaron a 75 °C y se restó la fluorescencia de fondo del control NTCT a 75 °C, y después el valor de la fluorescencia más alta se normalizó a 1,0. La Fig. 22 presenta las curvas de primera derivada de las curvas de hibridación de las muestras ensayadas. En la Fig. 22, el círculo 229 es la NTC, el círculo 230 es HAR22IVH, el círculo 231 es AR43/3330.1IVE, el círculo 232 es CA05IVA, el círculo 233 es WISV, el círculo 234 es Q2314IVC, el círculo 235 es HDE288VI, el círculo 236 es N315II y JCSC4469IVD, el círculo 237 es 85/2082III, el círculo 238 es COLI y 8/6-3PIVB, y el círculo 239 es BK20781VIII.

La Tabla 6 anterior lista los tipos de *spa* de las doce muestras de MRSA analizadas. Algunas de las muestras tenían el mismo tipo de *spa*, otros tienen tipos similares de *spa*, y otros más tienen tipos de *spa* muy diferentes. Los resultados de la Fig. 22 mostraron la diferenciación esperada y la definición de cada tipo de *spa*. Cuando se espera que los tipos de *spa* sean iguales, aparece la misma firma, véase COL1 y 8/6-3P IVB; y N315 y JCSC4469 IVD.

REIVINDICACIONES

1. Un método de ensayo homogéneo para analizar al menos una única secuencia diana de ácido nucleico monocatenario en una muestra, que comprende
- 5 a) proporcionar una muestra que contiene dicha al menos una secuencia diana de ácido nucleico y múltiples conjuntos de sondas distinguibles de manera detectable, donde las sondas de los conjuntos de sondas se hibridan de manera adyacente de forma que cada nucleótido de la secuencia diana está cubierto, y donde cada conjunto de sondas comprende
- 10 (i) una sonda marcada con un inactivador no fluorescente, y
(ii) una sonda marcada con un resto fluorescente;
- 15 donde tras la hibridación de dicha sonda marcada con un resto fluorescente con dicha al menos una secuencia diana en dicha muestra en ausencia de dicha sonda marcada con un inactivador no fluorescente, dicho resto fluorescente emite una señal sobre el fondo, donde, si ambas sondas de un conjunto de sondas se hibridan con dicha al menos secuencia diana, el inactivador no fluorescente inactiva la señal procedente del resto fluorescente; y
- 20 b) analizar la hibridación de dichos conjuntos de sondas con dicha al menos una secuencia diana en función de la temperatura.
2. El método de la reivindicación 1 donde dicho análisis comprende el análisis de un efecto sobre la señal de cada sonda marcada con un resto fluorescente debido a su sonda asociada marcada con un inactivador no fluorescente.
- 25 3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-2 donde cada una de dichas sondas marcadas con un resto fluorescente tiene una sonda asociada separada marcada con un inactivador no fluorescente.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 donde cada sonda marcada con un resto fluorescente está también marcada con un inactivador no fluorescente.
- 30 5. El método de la reivindicación 3 donde dos conjuntos de sondas comprenden: una primera sonda que tiene un resto fluorescente en un extremo y un inactivador no fluorescente en el otro extremo, donde dicho resto fluorescente de la primera sonda interactúa con una segunda sonda marcada con un inactivador no fluorescente y un inactivador no fluorescente de la primera sonda interactúa con una tercera sonda marcada con un resto fluorescente.
- 35 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 donde la temperatura de fusión de la sonda marcada con un resto fluorescente en un conjunto es mayor que la temperatura de fusión de su sonda asociada marcada con un inactivador no fluorescente.
- 40 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 donde la concentración de dicha al menos una diana es menor que la concentración de al menos una sonda en al menos un conjunto para esta secuencia diana.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, 6 y 7 donde la concentración de la sonda marcada con un resto fluorescente de al menos un conjunto de sondas es menor que la concentración de su sonda asociada marcada con un inactivador no fluorescente.
- 45 9. El método de la reivindicación 1 donde dichos restos fluorescentes y dichos restos inactivadores no fluorescentes interactúan mediante FRET.
- 50 10. El método de la reivindicación 3 donde dos conjuntos de sondas comprenden: una sonda marcada en cada extremo con restos inactivadores no fluorescentes y dos sondas marcadas con restos fluorescentes, donde la sonda marcada en cada extremo con restos inactivadores no fluorescentes interactúa con cada una de las sondas marcadas con restos fluorescentes tras la hibridación a dicha secuencia diana.
- 55 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 donde la técnica de hibridación incluye generar al menos una curva de fusión o al menos una curva de hibridación y comparar dicha al menos una curva de fusión o al menos una curva de hibridación con una curva de fusión o una curva de hibridación previamente establecida.
- 60 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 donde proporcionar la muestra que contiene dicha al menos una secuencia diana en forma monocatenaria comprende amplificar dicha al menos una secuencia diana de ácido nucleico.
13. El método de la reivindicación 12 donde dicha amplificación es mediante una amplificación PCR-LATE.
- 65 14. El método de la reivindicación 13 donde las sondas de al menos un conjunto de sondas tienen temperaturas de fusión por debajo de la temperatura de hibridación de al menos un cebador de la reacción de amplificación.

- 5 15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-14 donde dicha al menos una secuencia diana es una variante de una secuencia variable que está flanqueada por secuencias que están al menos relativamente conservadas, donde la etapa de proporcionar dicha al menos una secuencia diana incluye una reacción de amplificación que genera amplicones monocatenarios utilizando no más de unas pocas parejas de cebadores que se hibridan a dichas secuencias flanqueantes, donde dicho al menos un conjunto de sondas incluye al menos dos conjuntos de sondas, y donde para dicha variante la temperatura de fusión de al menos una sonda de señalización es mayor que la temperatura de fusión de su sonda inactivadora asociada.

Figura 1

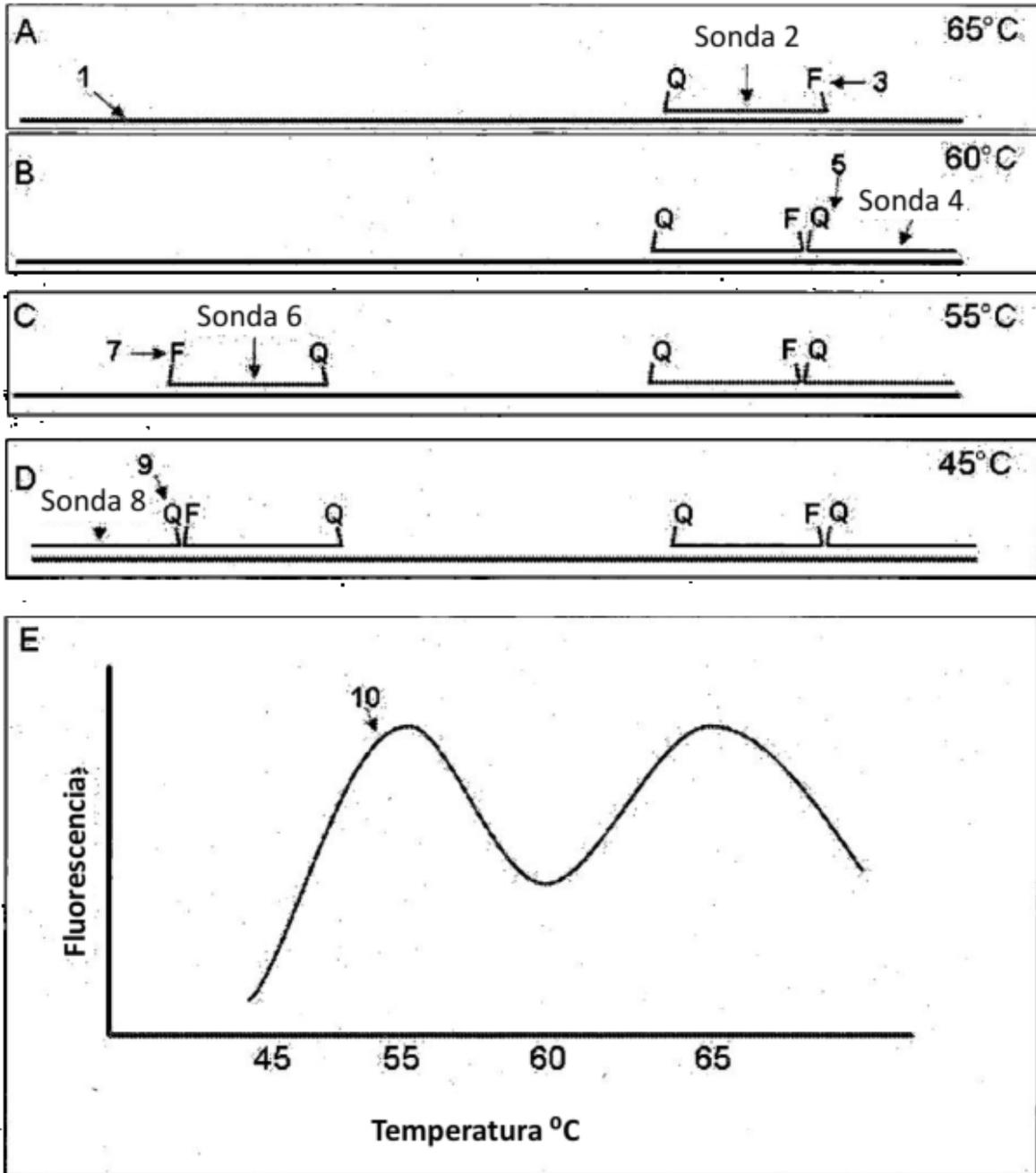


FIG. 2

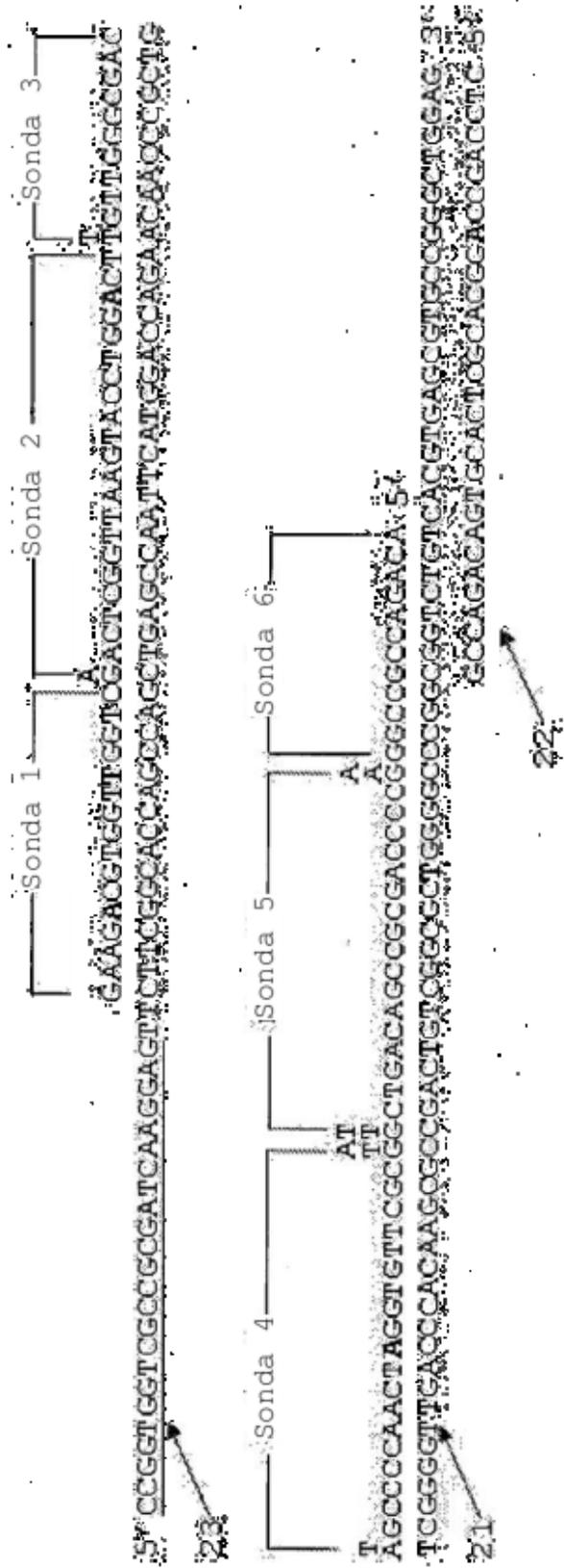


Figura 3A

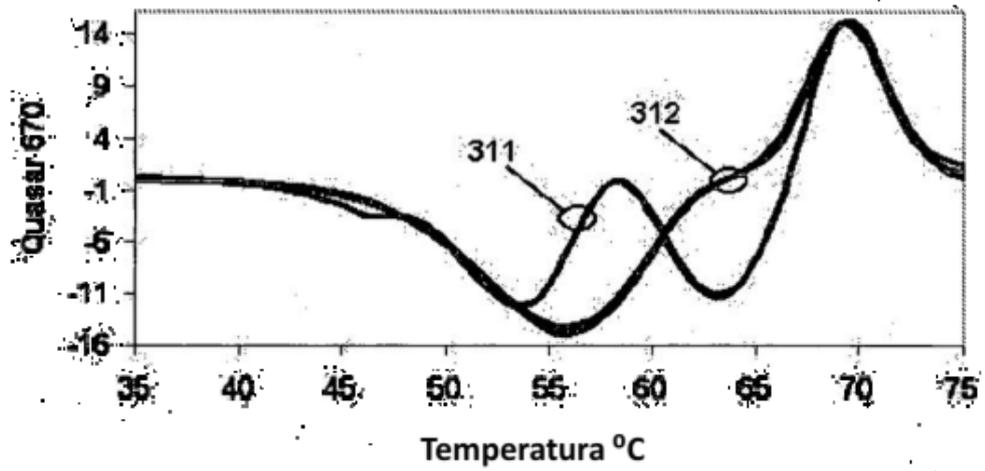


Figura 3B

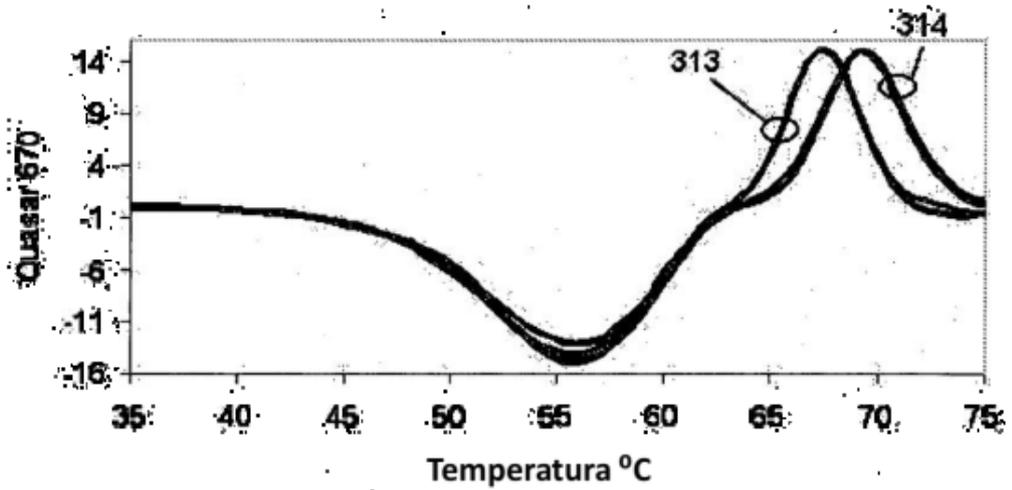


Figura 4A

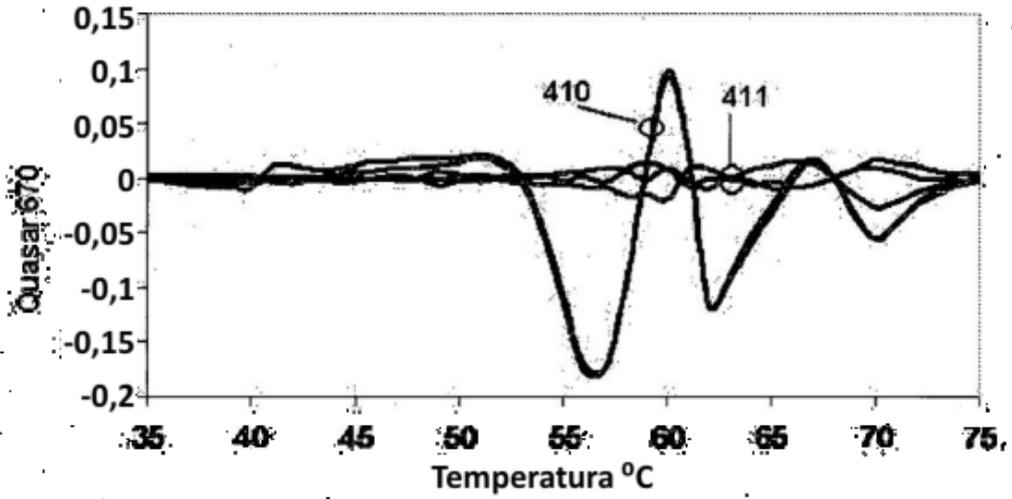


Figura 4B

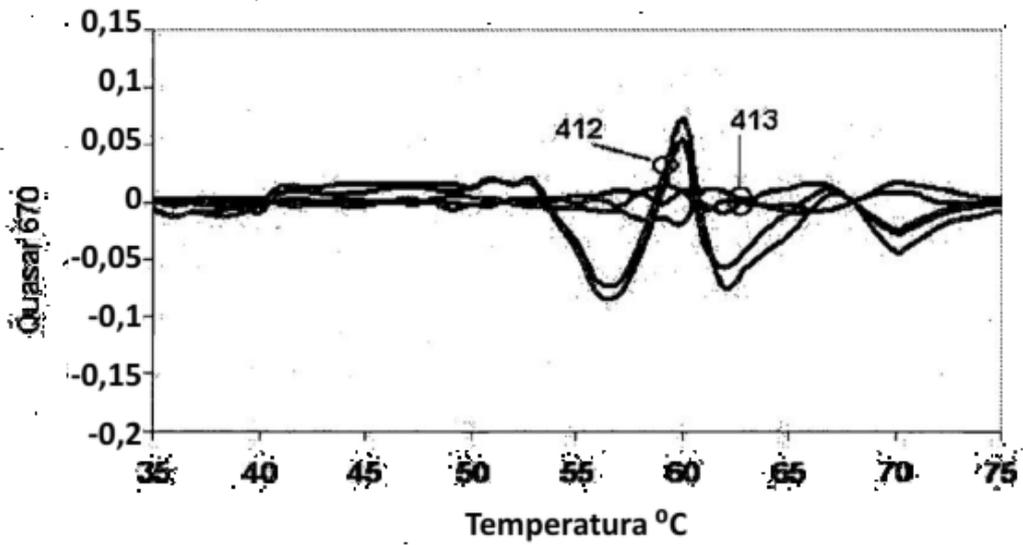


Figura 4C

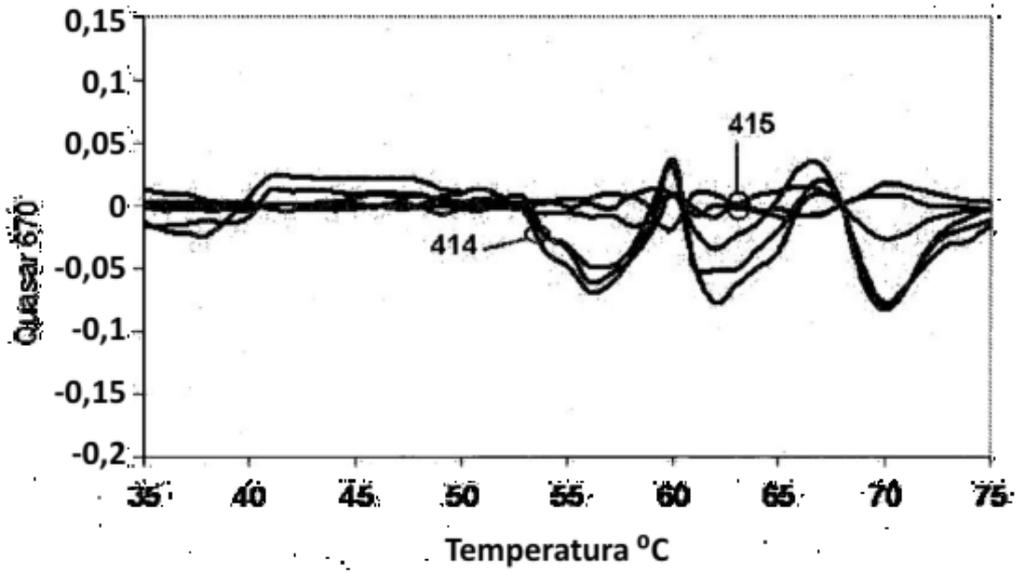


Figura 4D

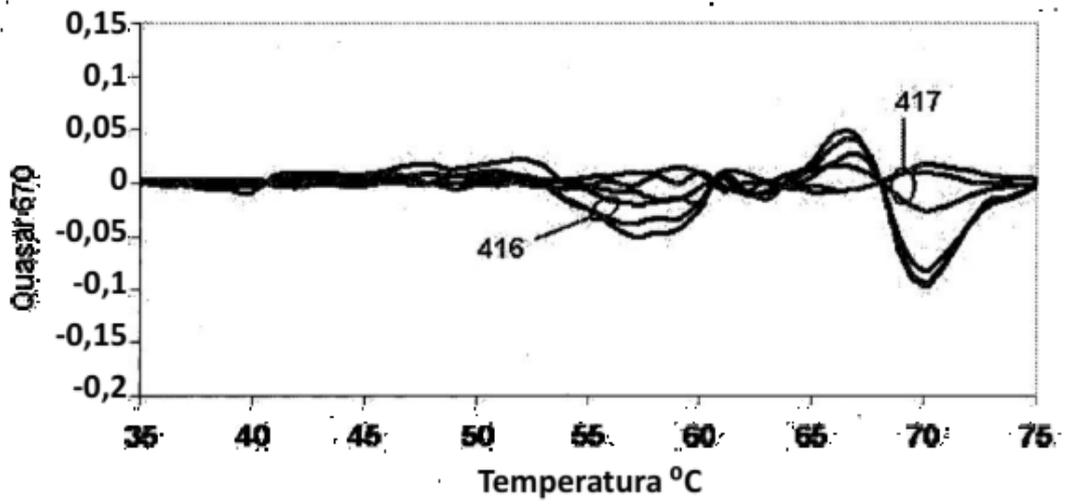


FIG. 5

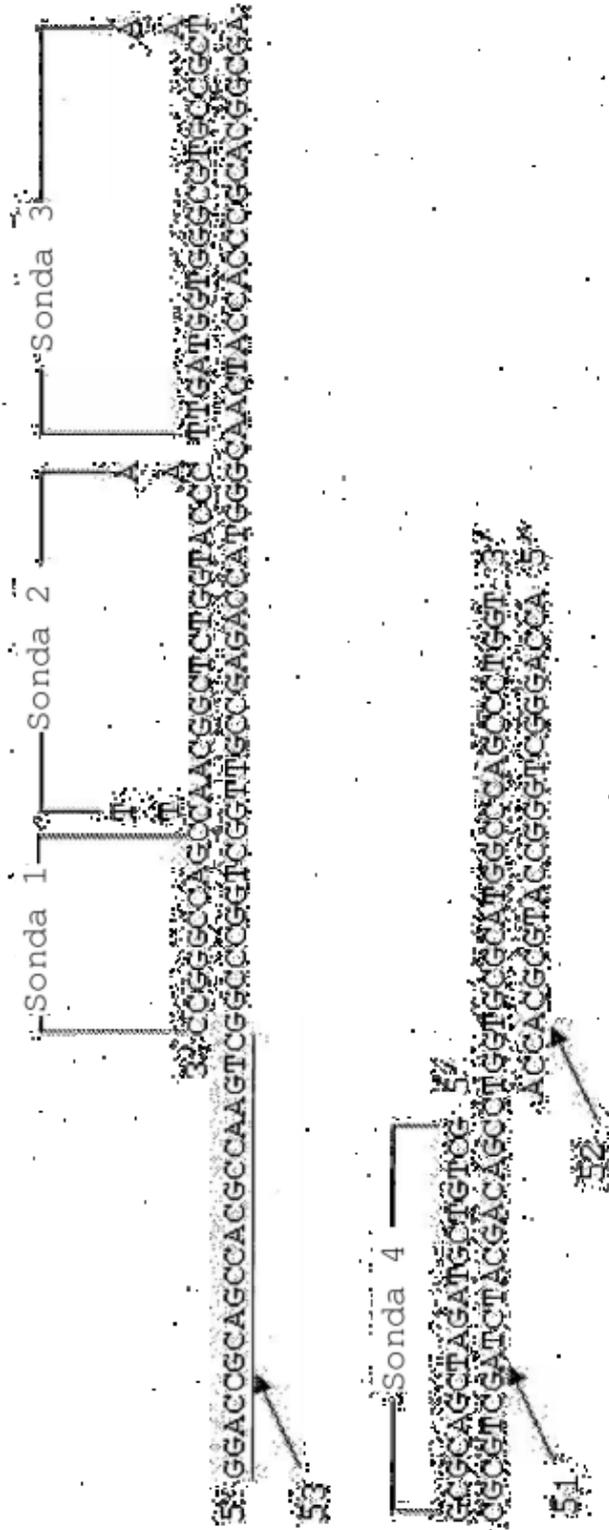


FIG. 6

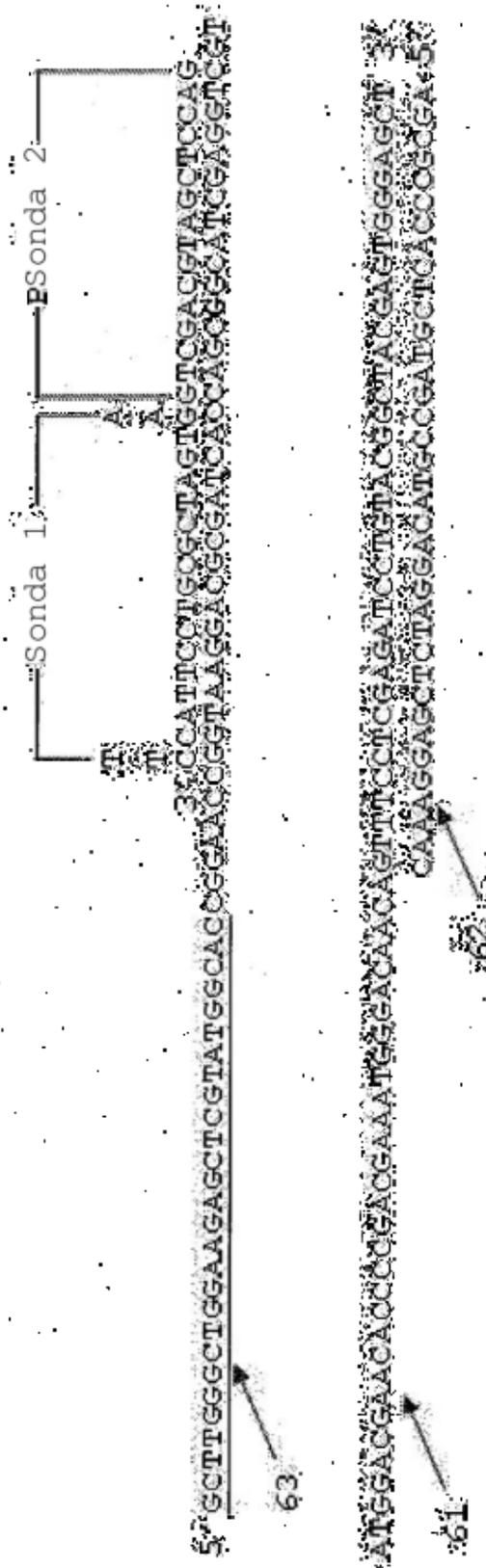


Figura 7A

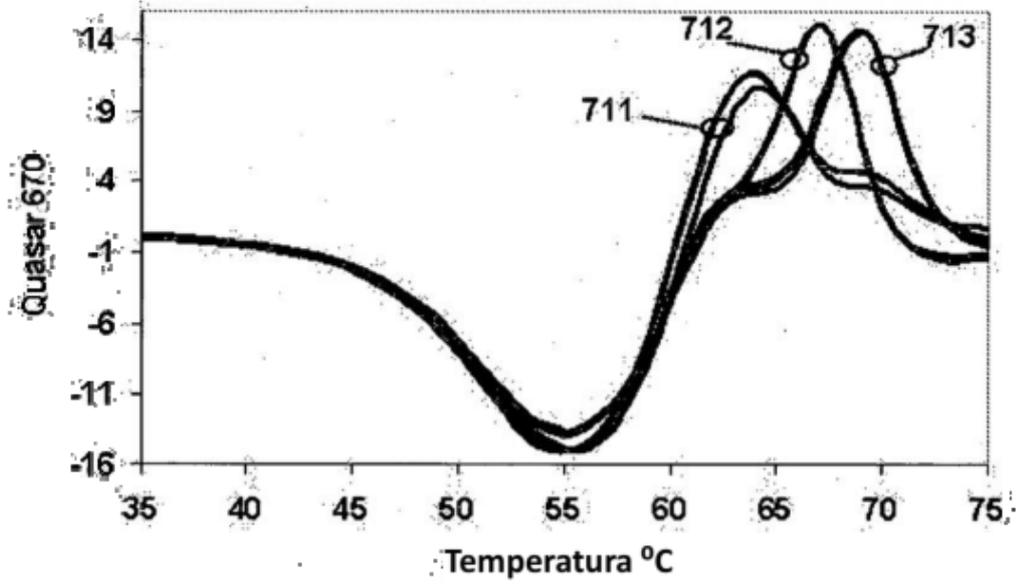


Figura 7B

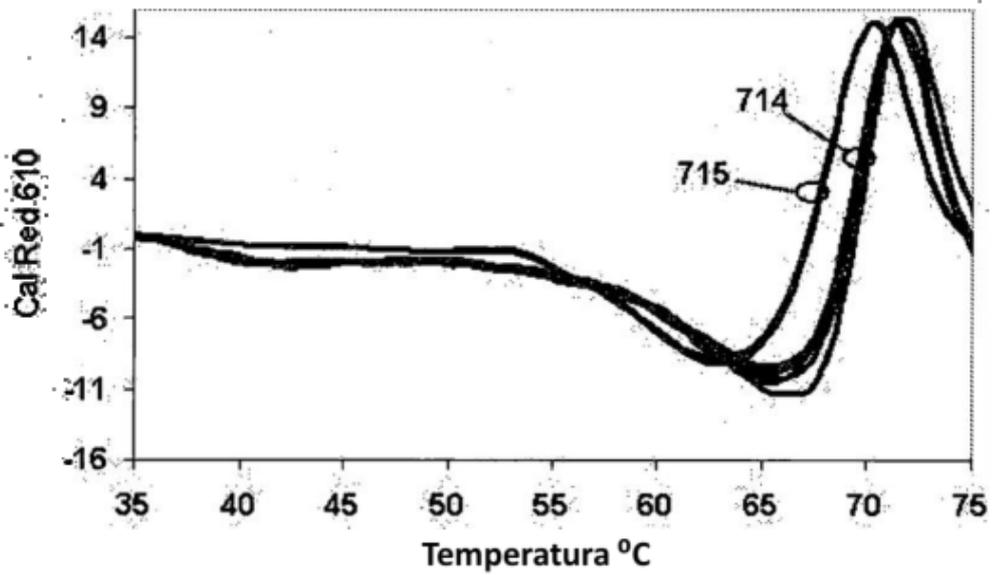


Figura 7C

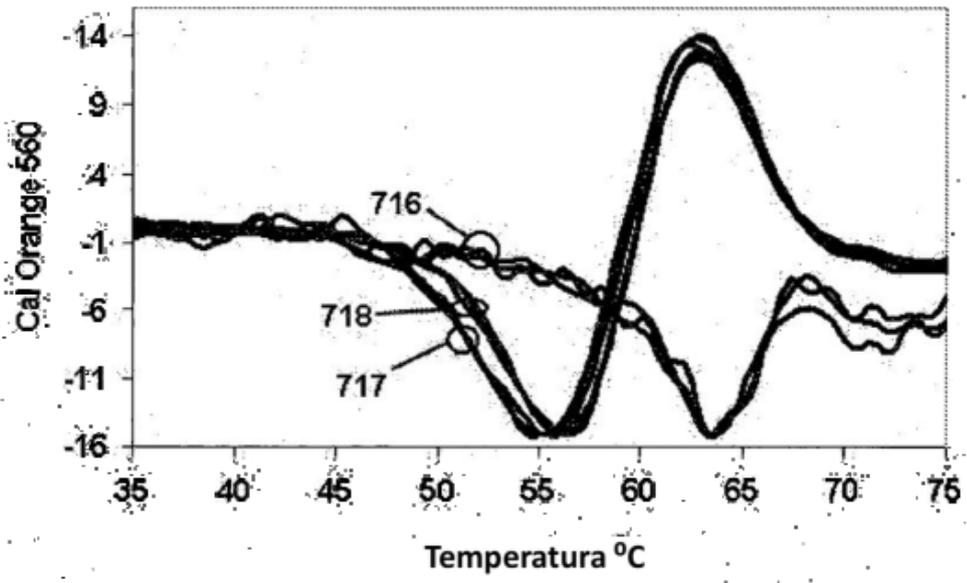


Figura 9A

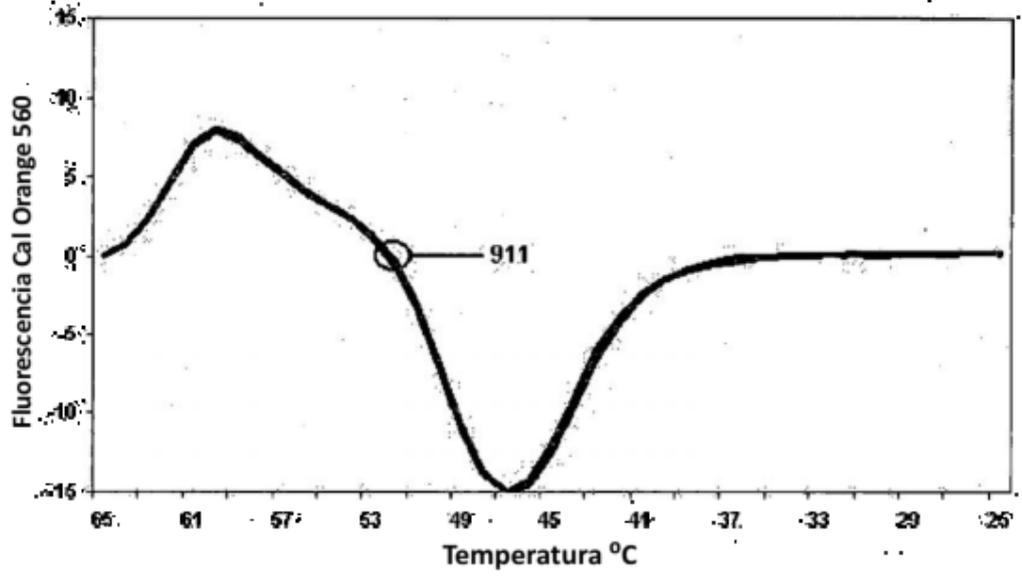


Figura 9B

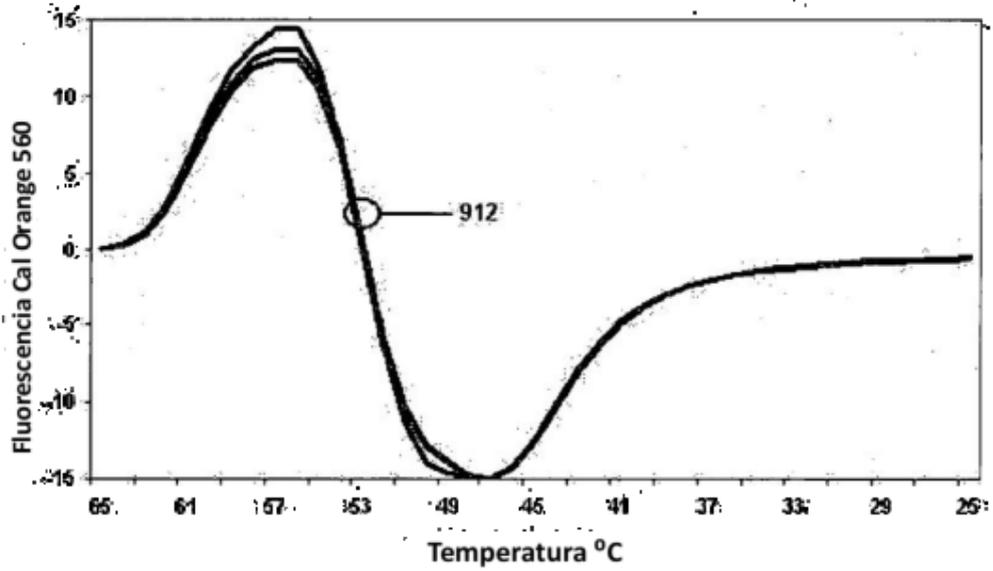


Figura 9C

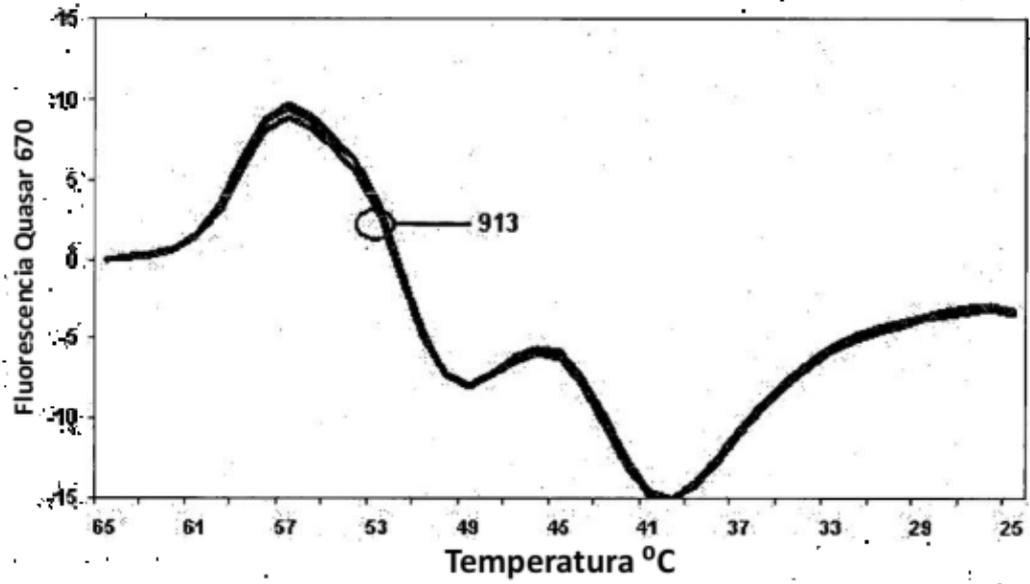


Figura 10A

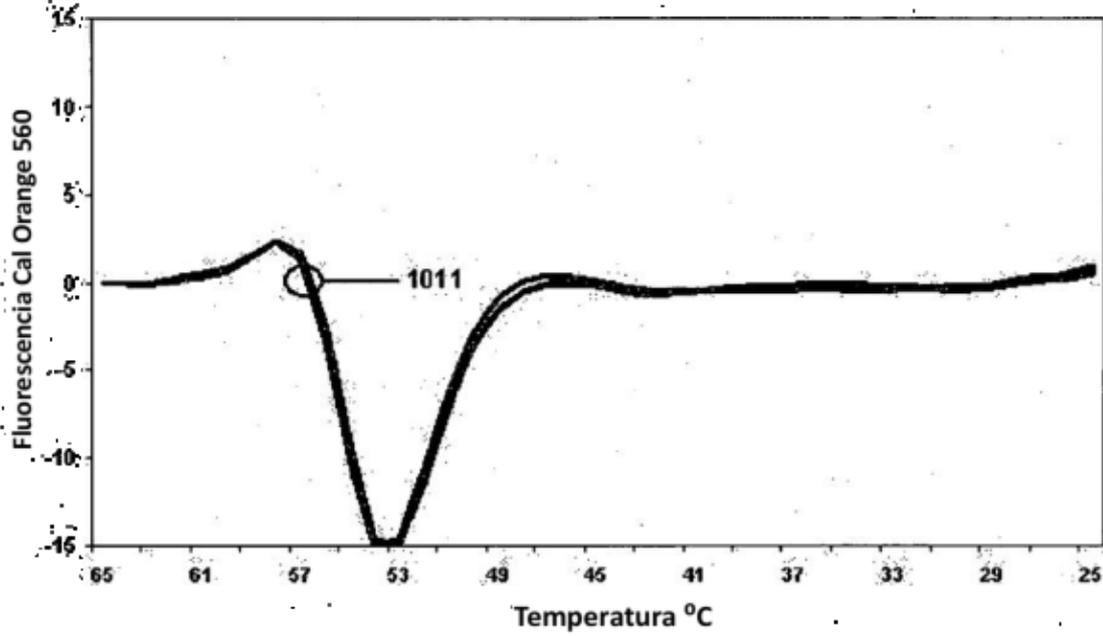


Figura 10B

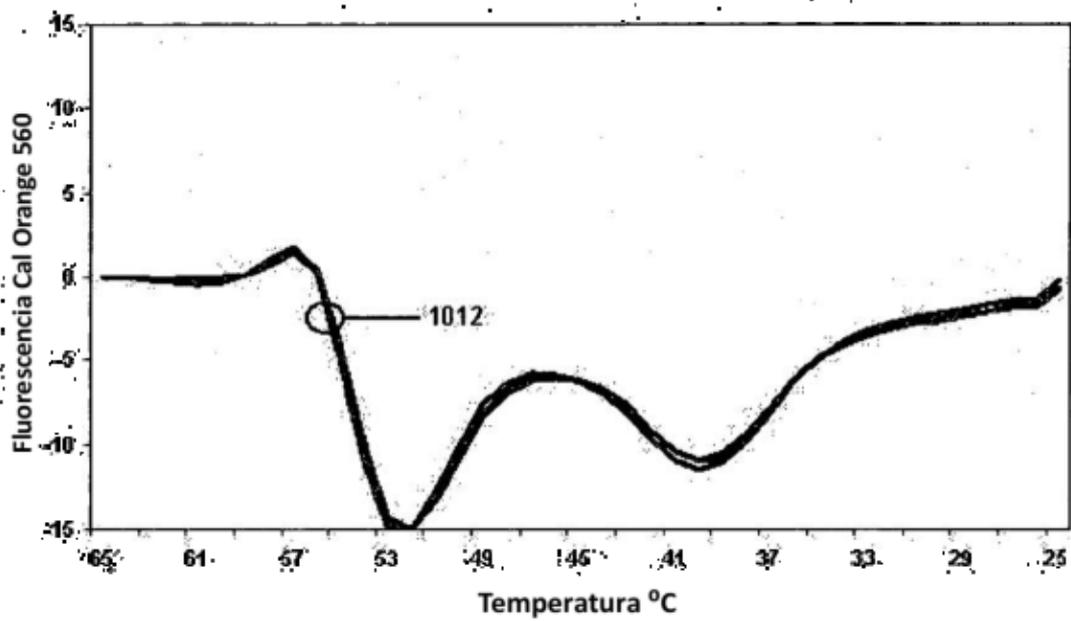


Figura 10C

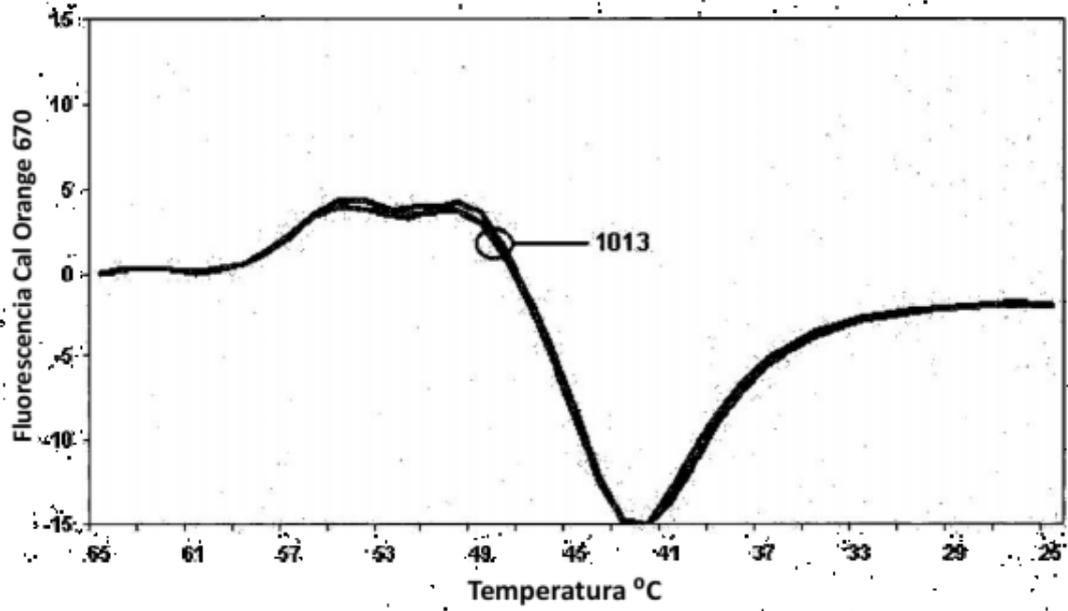


Figura 11A

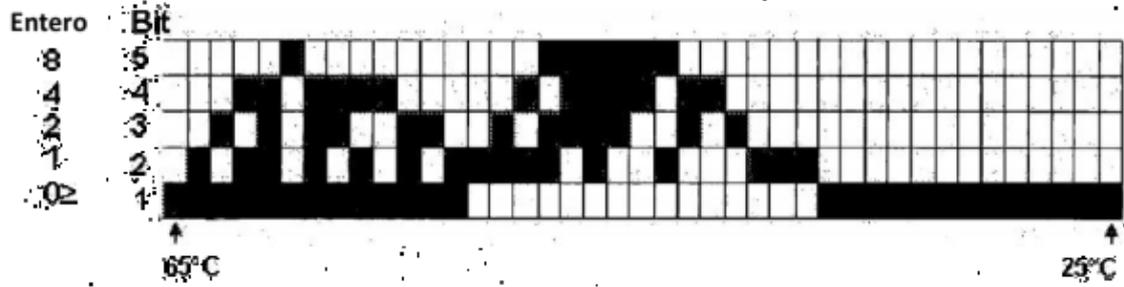


Figura 11B



Figura 11C



Figura 12

	←	121	→←	122	→←	
KP		GTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGC				372
EA		GTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGC				380
AB		GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGG				348
PA		GTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGA				366
COL		GTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAATCTTCCGCAATGGGCGA				389
SE		GTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAATCTTCCGCAATGGGCGA				389
ENFS		GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAATCTTCCGCAATGGGACGA				392
		123	→←	124	→←	125
KP		AAGCCTGATGCAGOCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCOCTTCGGGTTGTAA				422
EA		AAGCCTGATGCAGOCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCOCTTCGGGTTGTAA				430
AB		AACCCTGATCCAGOCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCOCTTATGGTTGTAA				398
PA		AAGCCTGATCCAGOCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCCTTCGGATTGTAA				416
COL		AAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAA				439
SE		AAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAA				439
ENFS		AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAA				442
		→←	126	→←	127	→←
KP		AGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCCGGTGAGGTTAATAACCTCATOGATTG				472
EA		AGTACTTTCAGCGAGGAGGAAGGCATTTGTGGTTAATAACCGCAGTGATTG				480
AB		AGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCCTACTTTAGTTAATAACCTAGAGATAGTG				448
PA		AGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATAACCTTGCTGTTTTG				466
COL		AACTCTGTTATTAGGGAAGAACAATATGTGTAAGTAACTGTGCACATCTTG				487
SE		AACTCTGTTATTAGGGAAGAACAATATGTGTAAGTAACTATGCACGTCTTG				487
ENFS		AACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCOCTG				490
		128	→←	129	→←	130
KP		--ACGTTACCOGCAGAAGAAGCAOCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCG				520
EA		--ACGTTACTOGCAGAAGAAGCAOCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCG				528
AB		G-ACGTTACTOGCAGAATAAGCACOCCGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCG				497
PA		--ACGTTACCAACAGAATAAGCACOCCGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCG				514
COL		---ACGGTACCTAATCAGAAAAGCCAOCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG				537
SE		---ACGGTACCTAATCAGAAAAGCCAOCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG				537
ENFS		---ACGGTATCTAACCAGAAAAGCCAOCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG				540
		→				
KP		GTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTA	(SEC ID N ⁰ 54)			554
EA		GTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTA	(SEC ID N ⁰ 55)			562
AB		GTAATACAGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGATTTA	(SEC ID N ⁰ 56)			531
PA		GTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTA	(SEC ID N ⁰ 57)			548
COL		GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTA	(SEC ID N ⁰ 58)			571
SE		GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTA	(SEC ID N ⁰ 59)			571
ENFS		GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTA	(SEC ID N ⁰ 60)			574

Figura 13

Ensayo de septicemia 16S por hibridación con Quasar On/Off normalizado a 1,0

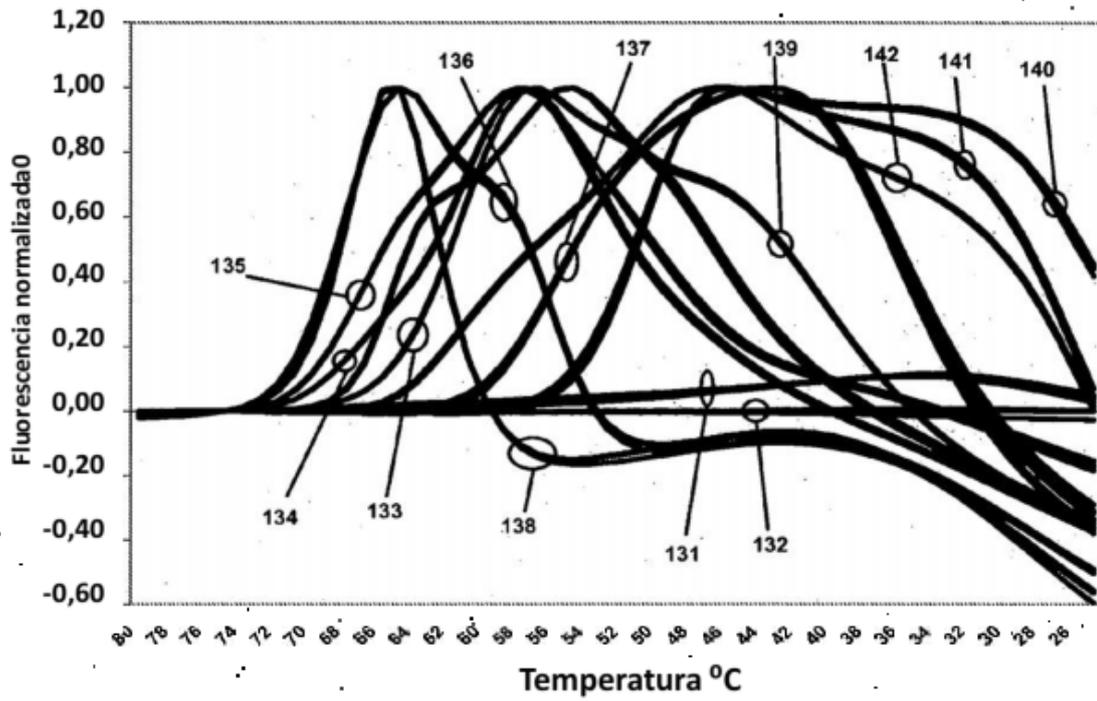


Figura 14

Ensayo de septicemia 16S por hibridación On/Off, derivada 12-05-09

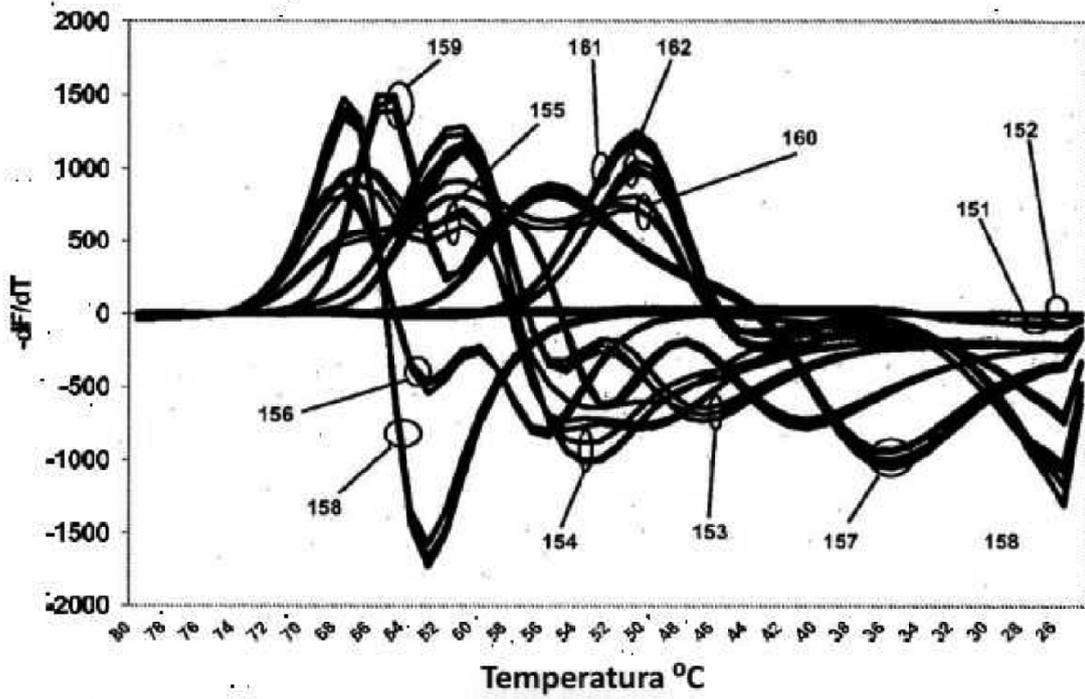


Figura 15

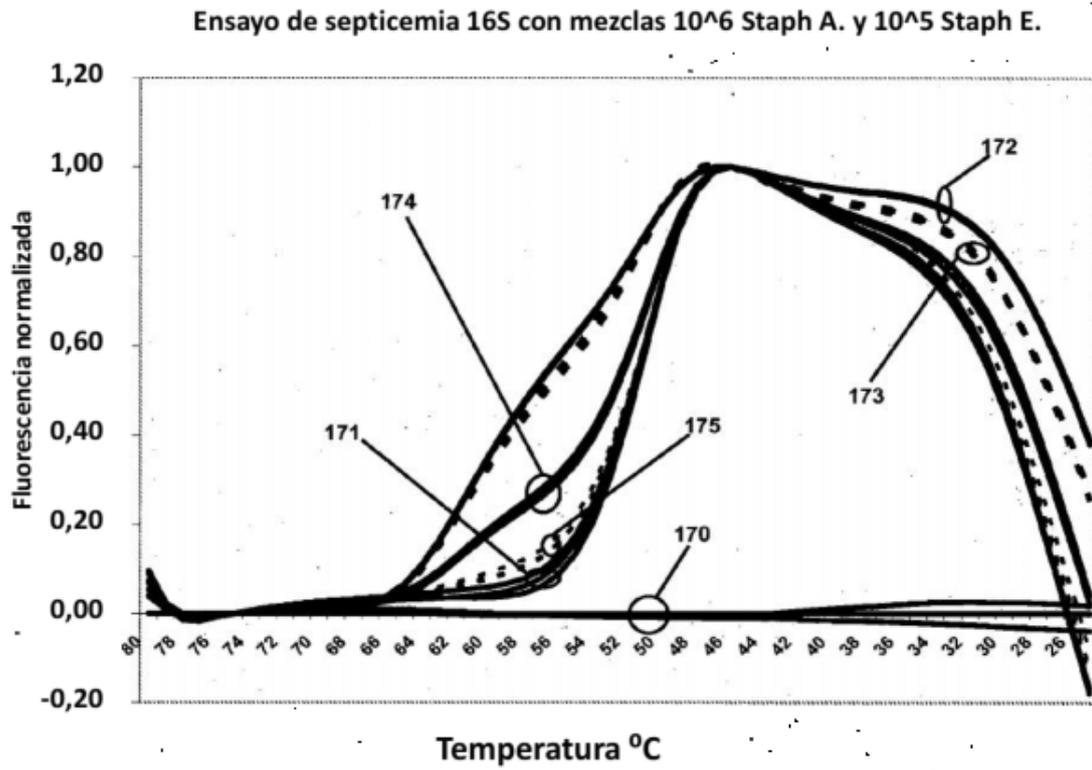


Figura 16

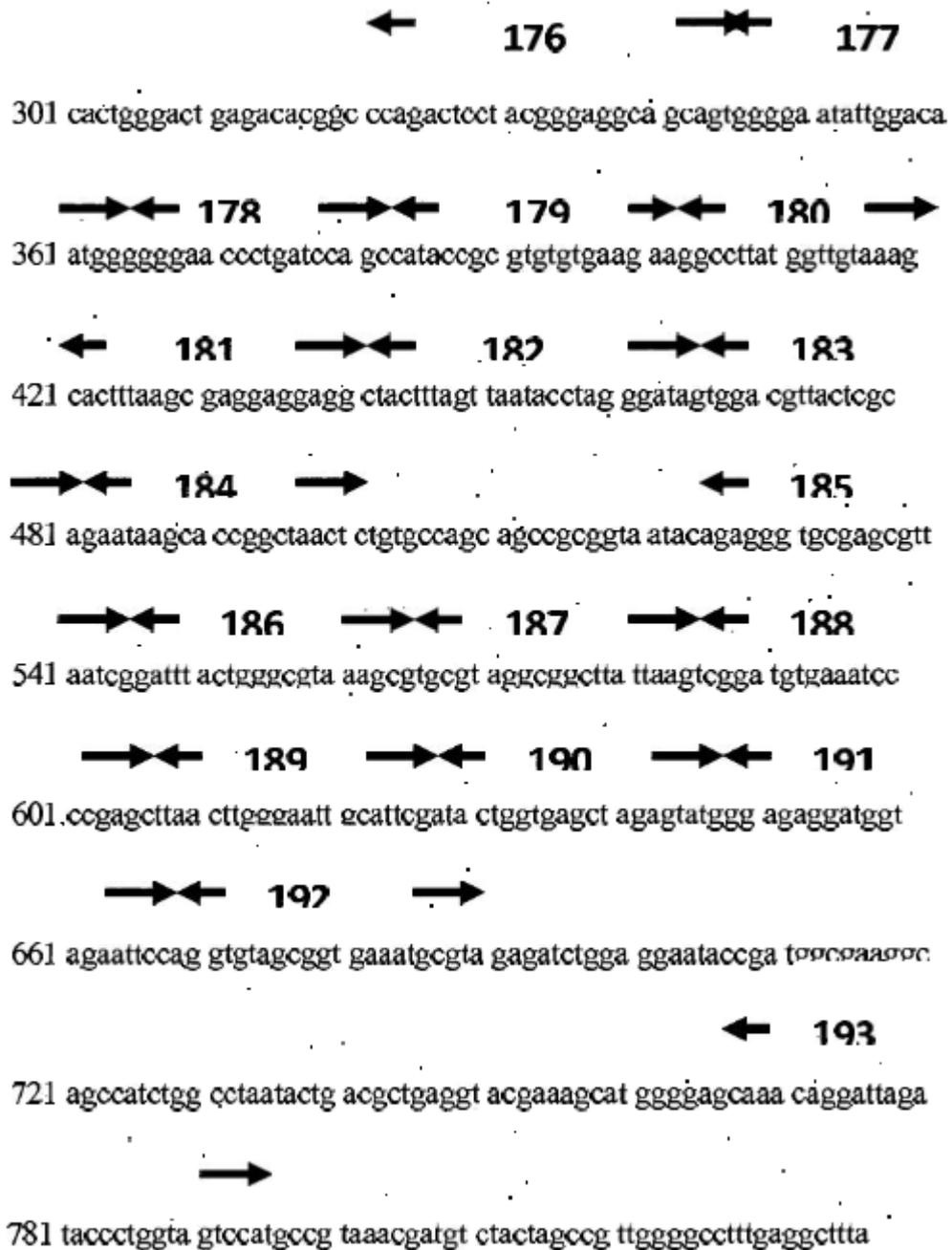


Figura 17A

Curva de hibridación multiplexada completa de la región extendida normalizado a 1,0
(Cal Red)

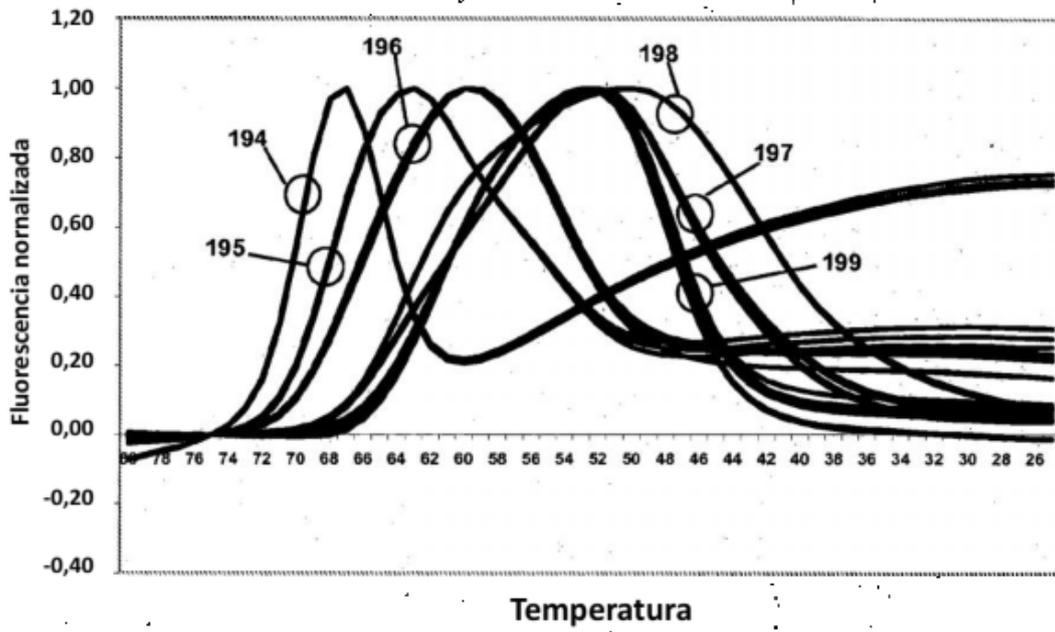


Figura 17B

Curva de hibridación multiplexada completa de la región extendida normalizado a 1,0
(Quasar)

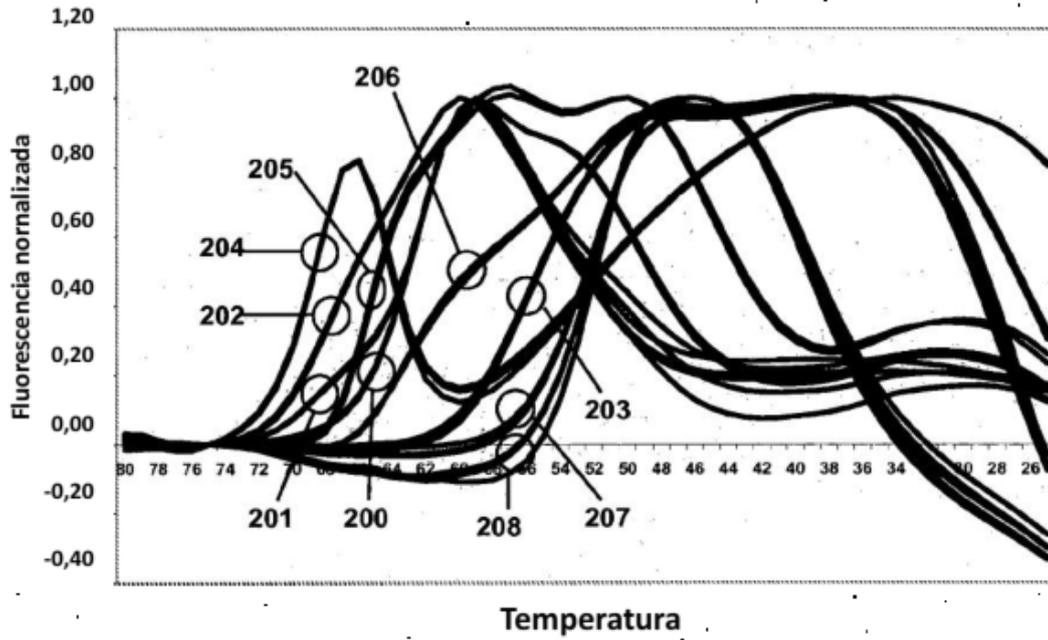


Figura 18

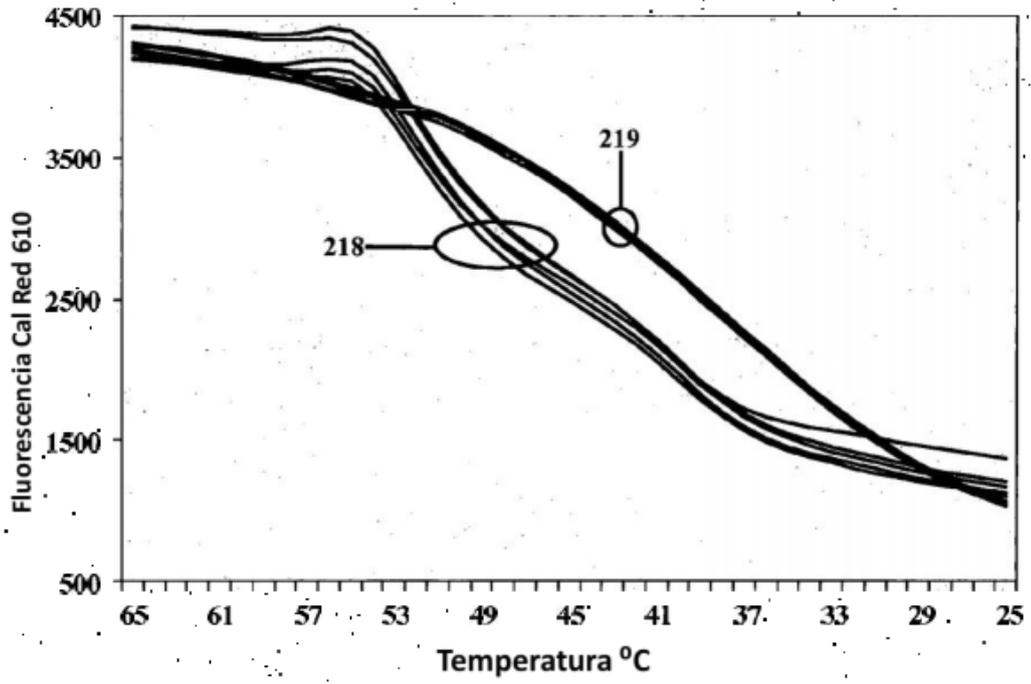


Figura 19

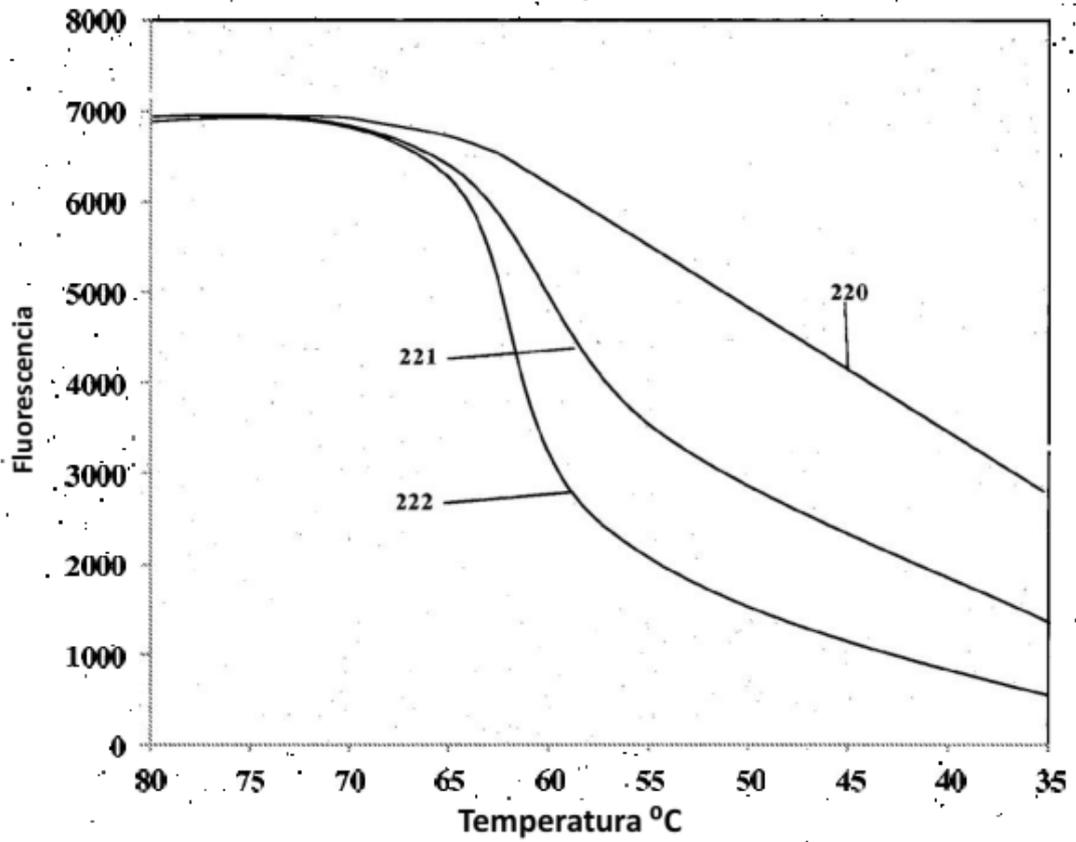


Figura 20

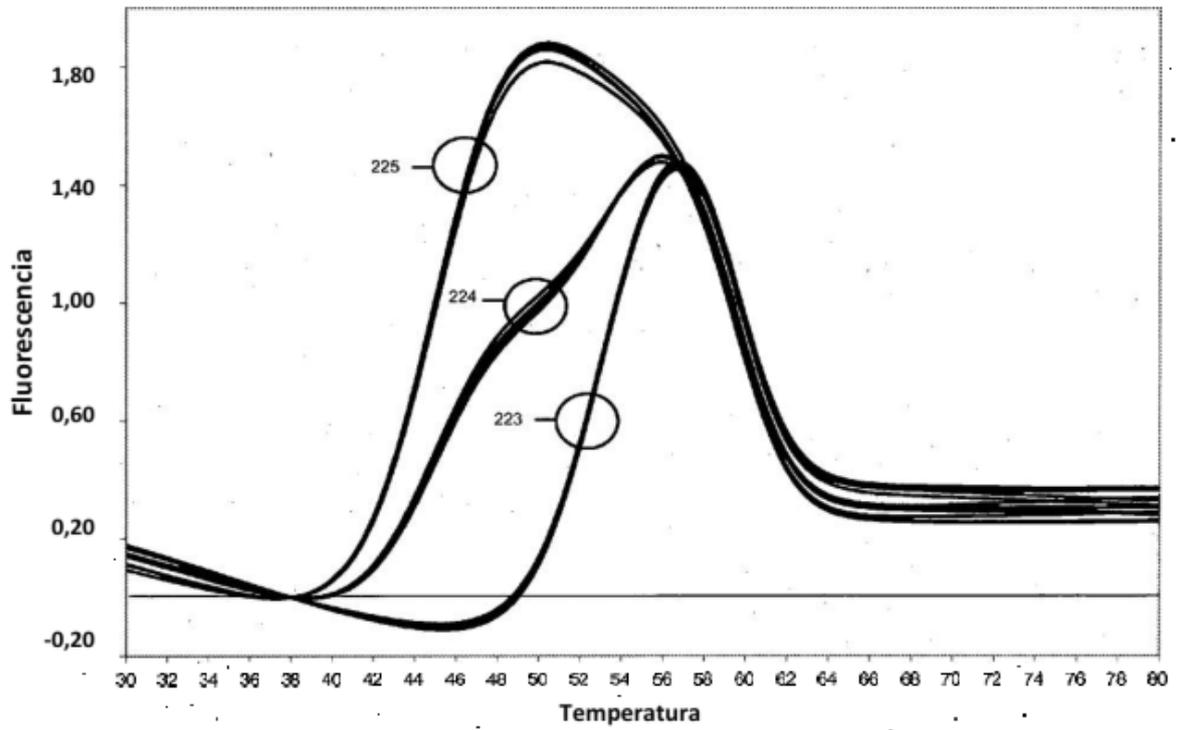


Figura 21

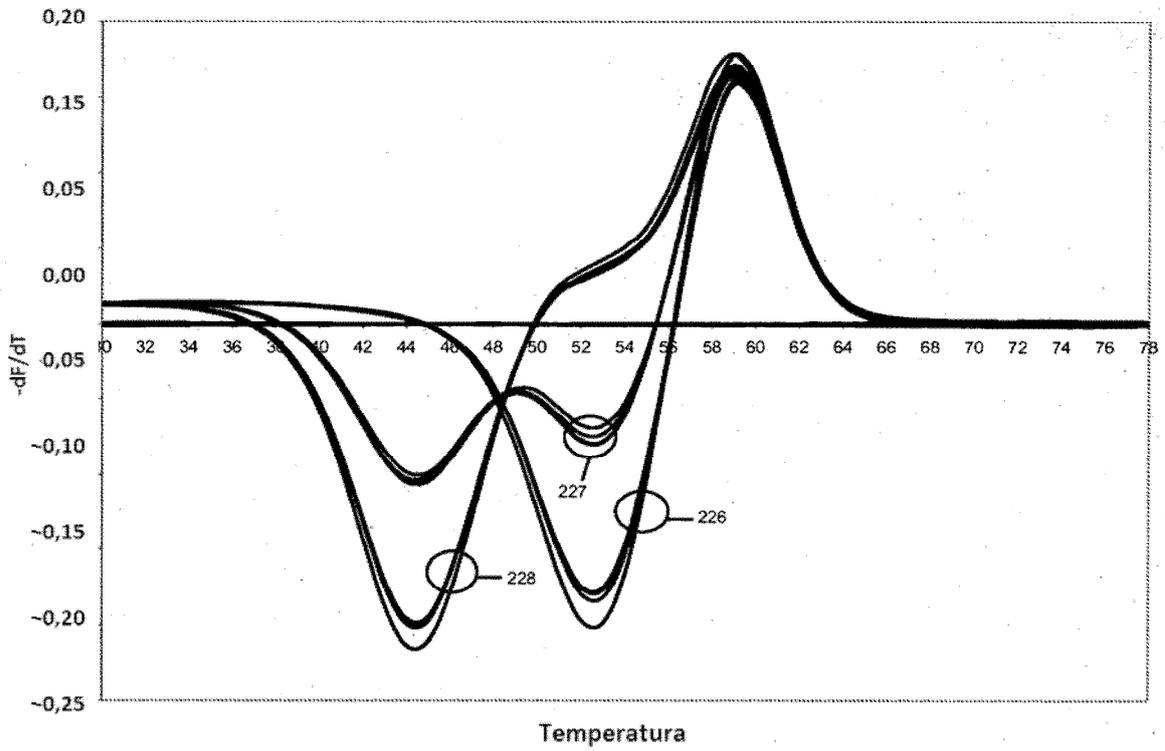


Figura 22

Tipado Spa de muestras clínicas de MRSA por hibridación On/OFF con Quasar, derivada normalizada a 1,0

