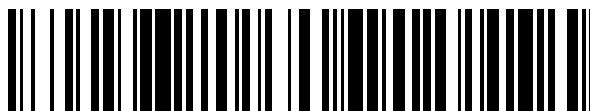


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 570 591**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2012 E 14179255 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2801626**

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

30 Prioridad:

24.05.2011 US 201161489614 P

08.09.2011 US 201161532454 P

22.03.2012 US 201261614381 P

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

19.05.2016

73 Titular/es:

ELITECHGROUP B.V. (100.0%)

Van Rensselaerweg 4

6956 AV Spankeren, NL

72 Inventor/es:

AFONINA, IRINA A.;

BELOUSOV, YEVGENIY S. y

MAHONEY, WALT

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 570 591 T3

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

DESCRIPCIÓN

Detección de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

5 ANTECEDENTES

La presente solicitud reivindica la prioridad sobre las Solicitudes Provisionales de Patente de Estados Unidos con n.º de Serie 61/489.614, presentada el 24 de mayo de 2011, 61/532.454, presentada el 8 de septiembre de 2011, y 61/614.381, presentada el 22 de marzo de 2012, todas ellas tituladas "Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*,".

La presente divulgación se refiere a diagnósticos bacterianos, y más particularmente a la detección de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

15 La difundida emergencia de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina ("MRSA", del inglés *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) es un problema clínico grave en todo el mundo. El *S. aureus* y especialmente el MRSA se ven hoy en día como una de las causas principales de infecciones asociadas con el cuidado de la salud y de infecciones asociadas a colectividades. El *S. aureus* es una bacteria comensalista que coloniza los conductos nasales, la vagina, la faringe, las axilas y/o superficies dañadas de la piel. Las infecciones pueden suceder con una rotura de la piel o mucosa, permitiendo el acceso a los tejidos anexos y al torrente sanguíneo. El riesgo aumenta por la presencia de catéteres. El *S. aureus* es único por su capacidad para invadir tejidos normales y provocar enfermedades en tejidos previamente normales en virtualmente todos los sitios (Boucher et al., CID, 51 (Suplemento 2): S183-S197, 2010). El MRSA causa diversas infecciones, por ejemplo, infecciones cutáneas y de tejidos blandos, infecciones sanguíneas y neumonía (Gemmel et al., J. Antimicrob. Chemother., 57:589-608, 2006). La aparición de cepas de *S. aureus* que son resistentes a los antibióticos supone un reto para un tratamiento exitoso. Se ha observado que los pacientes hospitalizados con bacteriemia por *S. aureus* tienen una tasa de mortalidad inaceptablemente alta. La bibliografía disponible hasta la fecha ha indicado que la selección a tiempo del tratamiento antibacteriano más eficaz puede reducir la mortalidad. Una herramienta que puede ayudar con la selección es la rápida discriminación entre MRSA y *S. aureus* sensible a la meticilina ("MSSA") (Brown et al., Pharmacoeconomics, 28: 567-575, 2010).

30 Aunque existen algunas herramientas y ensayos para la identificación de MRSA, distan de ser ideales. Se han comunicado hasta un 12,9% de falsos positivos para un ensayo comercialmente disponible de un solo locus (Blanc et al., J. Clin. Microbiol., 49: 722-724, 2011). Una evaluación de dos ensayos PCR de un solo locus y uno de doble locus para MRSA advierte de la alta prevalencia de "falsos negativos" y de "falsos positivos" (Kolman et al., BMC Res. Notes, 3: 110, 2010). Existe claramente la necesidad de ensayos mejorados para MRSA.
SUMARIO

40 La presente divulgación proporciona métodos, sondas, y cebadores para la detección de *Staphylococcus aureus* ("SA") y *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina ("MRSA") en muestras, incluyendo muestras biológicas (por ejemplo, sangre, frotis nasofaríngeos o de garganta, heces, frotis de heridas, u otro tejido).

45 La producción de L-lactato permite al *S. aureus* mantener la homeostasia redox durante el estrés nitrosante y es esencial para la virulencia. La actividad de lactato deshidrogenasa inducible por óxido nítrico (NO*) y la resistencia al NO* distinguen al *S. aureus* de las especies comensalistas estrechamente relacionadas *S. epidermidis* y *S. saprophyticus* (Richardson et al., Science, 319: 1672, 2008).

50 La resistencia a antibióticos de β -lactama está provocada por una proteína de unión a penicilina alterada (PBP2a) codificada por el gen *mecA* (Hartman y Tomasz, J. Bacteriol., 158: 513-516, 1984). Este determinante de resistencia reside en un elemento genético móvil denominado el casete *mec* del cromosoma estafilocócico (SCCmec) que se integra cadena abajo de la fase de lectura abierta (*orfX*) específica de *S. aureus* (Hiramatsu et al., Int. J. Me. Microbiol., 292:67-74, 2002). La detección de MRSA dirigiéndose mediante la PCR a la unión *SCCmed/orfX* fue propuesta por Huletsky et al (J. Clin. Microbiol., 42: 1875-1884, 2004). Ya que *mecA* reside en SCCmec, la detección de la unión SCCmec/orX se ha visto como un subrogado para la detección de MRSA. Existen en el mercado una serie de ensayos comerciales de MRSA basados en la integración de sitio específico de SCCmec en *orfX*, denominado GENEXPERT, Cepheid, Sunnyvale, CA (Rossney et al., J. Clin. Microbiol., 46:3285-3290, 2008), el ensayo IDI-MRSA (Warren et al., J. Clin Microbiol., 42: 5578-5581, 2004) y el ensayo GENOQUICK MRSA de Hain, Hain Lifescience GmbH, Nehren, Dinamarca (Sherlock et al., Clin. Microbiol. Infect. 16:955-959, 2010). Poco después de la introducción de estos ensayos se publicaron informes que reportaban "falsos positivos". Estos suceden cuando los ensayos identifican especímenes como positivos a MRSA que solo contienen cepas susceptibles a la meticilina de *S. aureus* (Wong et al., J. Clin. Microbiol., 48: 3525-3531, 2010). Actualmente se sabe que los resultados "falsos positivos" en ensayos PCR de un solo locus se deben a eliminaciones parciales de *SCCmec*.

65 En la presente divulgación, se extraen los ácidos nucleicos presentes en una muestra clínica o de ensayo obtenida de una muestra o tejido biológico que se sospecha que contiene el SA, y se extraen los MRSA de las muestras mediante métodos conocidos en la técnica. Los ácidos nucleicos se amplifican y se detectan los ácidos nucleicos de SA y de MRSA. Más específicamente, en el caso de SA que no es MRSA, se detecta el gen de lactato deshidrogenasa 1 (*ldh1*),

5 pero no *mecA*, o se detectan en cantidades diferentes; y en el caso de MRSA, se detectan los genes *ldh1* y *mecA* en iguales cantidades. El ácido nucleico amplificado puede detectarse mediante una diversidad de métodos del estado de la técnica, incluyendo transferencia de energía de resonancia de fluorescencia ("FRET"), radioetiquetas, etiquetas enzimáticas, y similares. Los ácidos nucleicos amplificados también pueden detectarse mediante cualquier combinación de técnicas de detección que pueden incluir sondas y/o cebadores de detección de hibridación.

10 En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para detectar SA y MRSA en una muestra biológica de un individuo. La divulgación también proporciona cebadores y sondas oligonucleotídicos que comprenden secuencias de nucleótidos características de secuencias de ácidos nucleicos genómicos de *Staphylococcus aureus* ("SA") y de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina ("MRSA"). El método incluye efectuar al menos una etapa de ciclo de amplificación e hibridación. La etapa de amplificación incluye poner en contacto la muestra de ácido nucleico con pares de cebadores para producir los productos de amplificación si están presentes los ácidos nucleicos de SA y/o *mecA*. Los cebadores preferidos se dirigen a una región específica de diana del gen de lactato deshidrogenasa 1 (*ldh1*; SA) y del gen *mecA* (resistencia a meticilina). Las sondas oligonucleotídicas detectan la diana amplificada directa o indirectamente. La sonda oligonucleotídica preferida es un conjugado de 5'-molécula de unión al surco menor-fluoróforo-oligonucleótido-inactivador-3' que emite fluorescencia tras la hibridación a su diana amplificada complementaria. En algunas realizaciones, uno o más cebadores están etiquetados. En algunas realizaciones, se omiten las sondas. En algunas realizaciones se proporciona un control interno.

20 En una realización, el método comprende la detección de los genes *ldh1* y *mecA*.

25 Además se proporcionan kits para la detección de *Staphylococcus aureus* (SA) y de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) en muestras biológicas que comprenden al menos un oligonucleótido hibridante específico para la amplificación de secuencias de SA y que comprende al menos un oligonucleótido específico para la detección de secuencias de *mecA*.

30 El método incluye además la detección de la presencia o ausencia de una señal fluorescente (por ejemplo, una señal resultante del FRET) de las sondas o cebadores de hibridación. La presencia de la señal fluorescente debido a una primera etiqueta indica normalmente la presencia de SA y la detección de la señal fluorescente debida a la segunda etiqueta indica la presencia de un gen *mecA* en la muestra biológica, mientras que la ausencia de la señal, normalmente debida a la primera etiqueta, indica la ausencia de SA y la ausencia de señal debida a la segunda etiqueta indica la ausencia de *mecA* en la muestra biológica.

35 El método puede incluir además determinar el perfil de temperatura de fusión entre las sondas y los productos de amplificación o amplicones en el caso de cebadores etiquetados. Las curvas de fusión confirman adicionalmente la presencia o ausencia de SA y de *mecA* así como la presencia potencial de mutantes de SA y de *mecA*, con desemparejamientos en el área de la secuencia de la sonda o del amplicón en el caso de cebadores etiquetados.

40 El método puede incluir además determinar la infección mixta, en donde las señales de *ldh1* y *mecA* provienen de diferentes organismos mediante la comparación de las cantidades relativas de los marcadores *ldh1* y *mecA*. Cantidades iguales sugieren infección por MRSA, mientras que diferentes cantidades sugieren una infección mixta de *S. aureus* MRSA-negativo y distinto de *S. aureus* portador de *mecA*.

45 El presente método permite la detección específica, sensible y rápida de SA y MRSA. La infección por MRSA normalmente no es distinguible clínicamente de la de otras bacterias y otros patógenos víricos portadores de *mecA* para los que hay disponibles terapias específicas. Los presentes métodos resuelven este problema para el diagnóstico proporcionando la detección rápida y específica de SA y MRSA, eliminado de este modo los resultados falsos positivos observados en algunos de los ensayos de la técnica. Además, las sondas o cebadores marcados basados en hibridación permiten el análisis de las curvas de fusión, que pueden potencialmente identificar nuevos mutantes de *ldh1* y *mecA*.

50 En otra realización, el método comprende la detección de los genes *mecA*_{LGA251}, *mecA* y *ldh1*.

55 En un método, se etiquetan *mecA*_{LGA251} y *mecA* con el mismo colorante fluorescente, y en otro método se etiquetan con colorantes diferentes.

En otra realización, el método comprende la detección del gen *ldh1*, *SCCmec*, y los sitios de integración o la región puente de *SCCmec*.

60 En otra realización, el método comprende la detección del gen *ldh1*, los sitios de integración o la región puente de *SCCmec* y *mecA*.

En una realización, el método comprende la detección del gen *ldh1* y de al menos un sitio de integración o región puente de *SCCmec*.

65

Otros objetos, características, y ventajas serán evidentes para un experto en la materia a partir de la siguiente descripción detallada y figuras.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 5 La figura 1 ilustra la detección en tiempo real de *ldh1*, *mecA*, y de control interno (CI) en una muestra positiva a MRSA;
- La figura 2 ilustra la detección en tiempo real de *ldh1*, *mecA*, y CI en una muestra negativa a SA;
- 10 La figura 3 ilustra la detección en tiempo real de *ldh1*, *mecA*, y CI en una muestra positiva a SA negativa a MRSA.
- La figura 4 ilustra la detección en tiempo real de *mecA*, *mecA*_{LGA251}, *ldh1* y CI en muestras MRSA-positivas y LGA251-positivas.

15 DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. General

- 20 La presente divulgación proporciona métodos, sondas, y cebadores para la detección de *Staphylococcus aureus* (SA) y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA). Los métodos y composiciones divulgados son altamente específicos para SA y MRSA con alta sensibilidad, especificidad, y velocidad que permiten la detección de niveles clínicamente relevantes. Los métodos y composiciones pueden usarse convenientemente para amplificar y/o detectar SA y *mecA* en muestras. En algunas realizaciones, *mecA* en bacterias distintas de *S. aureus*.

25 II. Definiciones

- Una "muestra", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una muestra de cualquier fuente que se sospeche que contiene *S. aureus*. Estas muestras pueden ensayarse mediante los métodos descritos en el presente documento. Una muestra puede ser de una fuente de laboratorio o de una fuente no de laboratorio. Puede suspenderse o disolverse una muestra en materiales líquidos, tales como tampones, agentes de extracción, disolventes, y similares. Las muestras también incluyen muestras biológicas, tales como tejidos o fluidos animales y humanos, tales como sangre completa, fracciones sanguíneas, suero, plasma, fluido cefalorraquídeo, fluidos linfáticos, leche, orina, varias secreciones externas de los tractos respiratorio, intestinal, y genitourinario, lágrimas, y saliva; y fluidos biológicos, tales como extractos celulares, sobrenadantes de cultivo celular, especímenes de tejidos fijados, y especímenes de células fijadas. Las muestras incluyen frotis nasofaríngeos o de garganta, heces, frotis de heridas o rectales. Las muestras biológicas también pueden incluir secciones de tejidos, tales como muestras de biopsias o autopsias o secciones congeladas extraídas con fines histológicos. Una muestra biológica se obtiene de cualquier animal incluyendo, *por ejemplo*, un ser humano.

- 40 Las cantidades se definen de manera distinta a la descrita en Quality Control for Molecular Diagnostics Organization (www.qcmd.com) en donde la organización considera cantidades comunicadas de manera diferente si no se encuentran en 0,5 log₁₀ copias, que en el caso de C_qs (o C_is) corresponde a AC_q>2.

- 45 Las expresiones "cebador colgante" o "cebador saliente" se refieren a un segmento de secuencia 5' no complementario a una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico de *ldh1* o *mecA*) y un segmento de secuencia 3' complementario a la secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico de *mecA* o *ldh1*). Los cebadores colgantes son adecuados para la extensión o amplificación del cebador de la secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico de *mecA* o *ldh1*). Los cebadores pueden comprender uno o más nucleótidos no complementarios o modificados (por ejemplo, pirazolopirimidinas, tal como se describe más adelante en el presente documento) en cualquier posición incluyendo, *por ejemplo*, el extremo 5'.

- 55 La expresión "sonda de generación de fluorescencia" se refiere bien a a) un oligonucleótido que tiene unida una molécula de unión al surco menor, un fluoróforo, y un inactivador, b) un oligonucleótido que tiene unido un fluoróforo, y un inactivador, c) un oligonucleótido que tiene unida una molécula de unión al surco menor, y un fluoróforo, d) un oligonucleótido que tiene unido un fluoróforo y un inactivador o e) un reactivo de unión a ADN. Las sondas pueden comprender uno o más nucleótidos no complementarios o modificados (por ejemplo, pirazolopirimidinas, tal como se describe más adelante en el presente documento) en cualquier posición incluyendo, *por ejemplo*, el extremo 5'. En algunas realizaciones, el fluoróforo se une al nucleótido modificado. En algunas realizaciones, la sonda se escinde para proporcionar una señal fluorescente.

- 60 La expresión "etiqueta fluorescente" o el término "fluoróforo" se refieren a compuestos con un máximo de emisión de fluorescencia entre aproximadamente 400 y aproximadamente 900 nm. Estos compuestos incluyen, con sus máximos de emisión en nm entre paréntesis, Cy2™ (506), GFP (virado a rojo) (507), YO-PRO™-1 (509), YOYO™-1 (509), Calceína (517), FITC (518), FluorX™ (519), Alexa™ (520), Rodamina 110 (520), 5-FAM (522), Oregon Green™ 500 (522), Oregon Green™ 488 (524), RiboGreen™ (525), Rodamina Green™ (527), Rodamina 123 (529), Magnesium

- Green™ (531), Calcium Green™ (533), TO-PRO™-1 (533), TOTO®-1 (533), JOE (548), BODIPY® 530/550 (550), DII (565), BODIPY® 558/568 (568), BODIPY® 564/570 (570), Cy3™ (570), Alexa™ 546 (570), TRITC (572), Magnesium Orange™ (575), Ficoeritrina R&B (575), Rodamina Faloidina (575), Calcium Orange™ (576), Pironina Y (580), Rodamina B (580), TAMRA (582), Rodamina Red™ (590), Cy3.5™ (596), ROX (608), Calcium Crimson™ (615), Alexa™ 594 (615), Texas Red® (615), Rojo Nilo (628), YO-PRO™-3 (631), YOYO™-3 (631), R-ficocianina (642), C-ficocianina (648), TO-PRO™-3 (660), TOTO®-3 (660), DiD DiIc(5) (665), Cy5™ (670), Tiadiarboecianina (671), y Cy5.5 (694). Los fluoróforos adicionales se divulgan en la Publicación de Patente PCT n.º WO 03/023357 y en la Patente de Estados Unidos n.º 7.671.218. Los ejemplos de estas y otras clases de colorantes adecuados pueden encontrarse en Haugland et al., HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS, SEXTA ED., Molecular Probes, Eugene, Ore. (1996); Patentes de Estados Unidos n.º 3.194.805; 3.128.179; 5.187.288; 5.188.934; 5.227.487; 5.248.782; 5.304.645; 5.433.896; 5.442.045; 5.556.959; 5.583.236; 5.808.044; 5.852.191; 5.986.086; 6.020.481; 6.162.931; 6.180.295; y 6.221.604; la Patente EP n.º 1408366; Smith et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2:1195-1204 (1993). Whitaker, et al., Anal. Biochem. 207:267-279 (1992). Krasoviskii y Bolotin, ORGANIC LUMINESCENT MATERIALS, VCH Publishers, NY. (1988); Zolliger, COLOR CHEMISTRY, 2ª edición, VCH Publishers, NY. (1991); Hirschberg et al., Biochemistry 37:10381-10385 (1998); Fieser y Fieser, REAGENTS FOR ORGANIC SYNTHESIS, Volúmenes 1 a 17, Wiley, EE.UU. (1995); y Geiger et al., Nature 359:859-861 (1992). Otros colorantes adicionales se proporcionan a través de sitios en línea tales como <http://www.zeiss.com>. Los colorantes de fosfonato se divulgan en los documentos de cesión común US 7.671.218 y US 7.767.834.
- Hay orientaciones exhaustivas en la técnica para seleccionar pares de inactivador y fluoróforo y su unión a oligonucleótidos (Haugland, 1996; Patentes de Estados Unidos con n.º 3.996.345 y 4.351.760 y similares). Los inactivadores preferidos se describen en la Patente de Estados Unidos n.º 6.727.356. Otros inactivadores incluyen inactivadores de bis azo (Patente de Estados Unidos n.º 6.790.945) y colorantes de Biosearch Technologies, Inc. (proporcionados como inactivadores Black Hole™: BH-1, BH-2 y BH-3), Dabcyl, TAMRA y carboxitetrametil rodamina.
- El término "enlazador" se refiere a un resto que se usa para ensamblar varias porciones de la molécula o para unir covalentemente la molécula (o porciones de la misma) a un soporte sólido. Típicamente, un grupo enlazador o de unión tiene grupos funcionales que se usan para interactuar y formar enlaces covalentes con grupos funcionales en los ligandos o componentes (por ejemplo, fluoróforos, oligonucleótidos, moléculas de unión al surco menor, o inactivadores) de los conjugados descritos y usados en el presente documento. Los ejemplos de grupos funcionales en los grupos de enlace (antes de la interacción con otros componentes) incluyen -NH₂, -NHNH₂, -ONH₂, -NHC(O)NHNH₂, -OH, y -SH. Los grupos de enlace son también aquellas porciones de la molécula que conectan otros grupos (por ejemplo, restos de fosforamida y similares) al conjugado. Además, un enlazador puede incluir porciones lineales o acíclicas, porciones cíclicas, anillos aromáticos, y combinaciones de los mismos.
- La expresión "soporte sólido" se refiere a cualquier soporte que es compatible con la síntesis de oligonucleótidos, incluyendo, por ejemplo, vidrio, vidrio de poro controlado, materiales poliméricos, poliestireno, perlas, vidrio recubierto, y similares.
- En la descripción en el presente documento, las abreviaturas M, FL, Q, CPG, y ODN se refieren a "molécula de unión al surco menor", "etiqueta fluorescente" o "fluoróforo", "inactivador", "vidrio de poro controlado" (como ejemplo de soporte sólido), y restos o moléculas de "oligonucleótidos", respectivamente, y de un modo que es evidente en el contexto. Los términos "sonda" y "conjugado" se usan de manera intercambiable y se refieren a un oligonucleótido que tiene unida una molécula de unión al surco menor, un fluoróforo, un inactivador.
- Los términos "oligonucleótido", "ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan de manera intercambiable en el presente documento. Estos términos se refieren a un compuesto que comprende ácido nucleico, nucleótido, o su polímero en forma mono o bicatenaria, por ejemplo, ADN, ARN, análogos de nucleótidos naturales, e híbridos de los mismos. Los términos abarcan polímeros que contienen nucleótidos modificados o de origen no natural, o cualquier otro tipo de polímero capaz de emparejarse por bases de manera estable a ADN o ARN incluyendo, pero sin limitación, ácidos peptidonucleicos, tal como se describe en Nielsen et al., Science, 254:1497-1500 (1991), oligómeros de biciclo ADN, tal como se describe en Bolli et al., Nucleic Acids Res., 24:4660-4667 (1996), y estructuras relacionadas. A menos que estén limitados de otro modo, los términos abarcan análogos conocidos de nucleótidos naturales que hibridan con ácidos nucleicos de un modo similar a los nucleótidos de origen natural. Los ejemplos de dichos análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quirales, ribonucleótidos de 2-O-metilo, y ácidos peptidonucleicos (APN). Una "subsecuencia" o "segmento" se refiere a una secuencia de nucleótidos que comprende una parte de una secuencia de nucleótidos más larga.
- La práctica de los métodos descritos en el presente documento empleará, salvo que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química orgánica, bioquímica, síntesis y modificación de oligonucleótidos, química de bioconjugados, hibridación de ácidos nucleicos, biología molecular, microbiología, genética, ADN recombinante, y campos relacionados de la técnica. Estas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Ausubel, et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons (1987, 1988, 1989, 1990, 1991, 1992, 1993, 1994, 1995, 1996); Gait (ed.), OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS: A

PRACTICAL APPROACH, IRL Press (1984); y Eckstein (ed.), OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES: A PRACTICAL APPROACH, IRL Press (1991).

III. Descripción

5 Los presentes métodos se refieren a la amplificación y/o detección de ácidos nucleicos de SA y MRSA basándose en una detección combinada de *ldh1* como marcador de SA y *mecA* como marcador de resistencia a la meticilina. Son adecuados los cebadores y sondas para su uso en los presentes métodos para detectar SA y MRSA de manera simultánea en una sola reacción o en reacciones separadas. Típicamente, los métodos se llevan a cabo con ADN genómico, que a su vez se amplifica con cualquier método de amplificación basado en ADN. Uno de estos métodos de amplificación es la reacción en cadena de la polimerasa (véase, *por ejemplo*, Patentes de los Estados Unidos con números 4.683.195 y 4.965.188, Mullis et al., Cold Spring Harb. Symp. Quant.Biol., 51 Pt 1:263-273 (1986)). Las amplificaciones se llevan a cabo usando reactivos que están disponibles comercialmente en la actualidad a través de diversos comercializadores (por ejemplo, Life Technologies; Carlsbad, CA; y Qiagen; Valencia, CA).

15 Se conoce bien la amplificación de moldes de ADN usando reacciones (véanse, *por ejemplo*, las Patentes de Estados Unidos con números 4.683.195 y 4.683.202, PCR PROTOCOLS: A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS (Innis et al., eds, 1990)). Los métodos, tales como la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR") y la reacción en cadena de la ligasa ("LCR") pueden usarse para amplificar secuencias de ácido nucleico de las secuencias diana *ldh1/mecA* directamente de una muestra que se sospecha que contiene las secuencias diana. La reacción se lleva a cabo preferentemente en un ciclador termal para facilitar los tiempos de incubación a las temperaturas deseadas. Pueden diseñarse oligonucleótidos degenerados para amplificar homólogos de secuencia de ADN diana usando las secuencias conocidas que codifican la secuencia de ADN diana.

25 Las condiciones de reacción de la PCR ejemplares comprenden típicamente dos o tres ciclos por etapas. Los ciclos en dos etapas tienen una etapa de desnaturalización seguida de una etapa de hibridación/elongación. Los ciclos de tres etapas comprenden una etapa de desnaturalización seguida de una etapa de hibridación seguida de una etapa separada de elongación. Para la PCR, es típica una temperatura de aproximadamente 36°C para la amplificación a baja rigurosidad, aunque pueden variar las temperaturas de hibridación entre aproximadamente 32°C y 48°C, dependiendo de la longitud del cebador. Para la amplificación PCR a alta rigurosidad, es típica una temperatura de aproximadamente 62°C, aunque las temperaturas de hibridación a alta rigurosidad pueden variar desde aproximadamente 50°C a aproximadamente 65°C, dependiendo de la longitud y especificidad del cebador. Las condiciones de ciclado típicas para las amplificaciones tanto a alta como a baja rigurosidad incluyen una fase de desnaturalización de aproximadamente 90°C-95°C durante 0 segundos-15 minutos, una fase de hibridación de aproximadamente 56-60°C durante 0 segundos-2 minutos, y una fase de extensión de aproximadamente 72-76°C durante 0 segundos-2 minutos. Un protocolo de ciclado preferido tiene una fase de desnaturalización de 93°C durante 10 segundos, una fase de hibridación de 56°C durante 30 segundos, y una fase de extensión de 72°C durante 15 segundos.

40 En general, el presente método es para detectar *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en una muestra que contiene ácidos nucleicos mediante la amplificación de los ácidos nucleicos en la muestra y después detectando los ácidos nucleicos en la muestra que comprenden los genes *mecA* y *ldh1* amplificados. La presencia de los genes *mecA* y *ldh1* amplificados en cantidades iguales indica la presencia de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina.

45 Por consiguiente, en un aspecto, un ejemplo de la presente invención para detectar un ácido nucleico de *ldh1* y *mecA* en una muestra comprende:

(a) poner en contacto una muestra que se sospecha que contiene el ácido nucleico de *ldh1* con un primer cebador colgante que tiene la fórmula:



en la que X representa la porción 5' del cebador colgante que no es complementaria al ácido nucleico de SA y n es 1, Y representa la porción 3' del cebador colgante que es complementaria al ácido nucleico *ldh1*, en la que X es de aproximadamente 3-30 nucleótidos de longitud;

(b) poner en contacto la misma muestra que se sospecha que contiene el ácido nucleico de *mecA* con un tercer cebador colgante y un cuarto cebador colgante que tiene la fórmula:



en la que X representa la porción 5' del cebador colgante que no es complementaria al ácido nucleico de *mecA* y n es 1, Y' representa la porción 3' del cebador colgante que es complementaria al ácido nucleico *mecA*, en la que X es de aproximadamente 3-30 nucleótidos de longitud;

60 (c) incubar la mezcla de las etapas (a) y (b) en condiciones suficientes para amplificar el ácido nucleico de *ldh1* y *mecA*, de este modo generar los ácidos nucleicos de *ldh1* y *mecA* amplificados; y

(d) detectar los ácidos nucleicos *ldh1* y *mecA* amplificados en caso de que estén presentes.

El ácido nucleico de *ldh1* y *mecA* puede comprender las siguientes secuencias:

ES 2 570 591 T3

SEQ ID NO:1:

GGTGAACATGGTGACACTGAATTACCAGTATGGTCACACGCTAATATTGCGGGTC
AACCTTTGAAGACATTACTTGAACAACGTCCTGAGGGCAAAGCGC (SEQ ID NO:1)

SEQ ID NO:2:

GTGCGTTAATATTGCCATTATTTCTAATGCGCTATAGATTGAAAGGATCTGTACT
GGGTAAATCAGTATTTACCTTGTCGTAACC (SEQ ID NO:2)

5 La amplificación de los ácidos nucleicos de *mecA* y *ldh1* puede controlarse de manera continua y pueden determinarse las concentraciones relativas en tiempo real. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos de *mecA* y *ldh1* amplificados están presentes a una relación 1:1. Una diferencia en la concentración indica una infección mixta de *Staphylococcus aureus* con un portador de *mecA* negativo a coagulasa, en la muestra.

10 En una realización, la detección se lleva a cabo con una primera sonda generadora de fluorescencia específica para *ldh1* y una segunda sonda generadora de fluorescencia específica para *mecA* en la que las longitudes de onda de emisión son diferentes. En algunas realizaciones, la detección se lleva a cabo con cebadores etiquetados específicos para *ldh1* y *mecA*, que pueden ser cebadores generadores de fluorescencia.

15 En algunas realizaciones se proporcionan métodos para detectar ácido nucleico de *ldh1* y *mecA* en una muestra con un control interno.

En algunas realizaciones se proporcionan métodos para comparar cantidades relativas de ácidos nucleicos de *ldh1* y *mecA* en una muestra.

20 En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para detectar *ldh1* y *mecA* además de sitios de integración o regiones puente de *SCCmec*. Se han divulgado métodos para detectar sitios de integración de *mecA* cadena arriba y cadena abajo del gen *mecA*. La Patente de Estados Unidos n.º 6.156.507 divulga un método que comprende llevar a cabo una reacción con una muestra usando una secuencia de nucleótido de un ADN cromosómico que rodea a un sitio integrado de un *SCCmec* en un cromosoma de un MSSA o de estafilococos resistentes a la meticilina coagulasa-negativos (MSC-NS), en el que dicho método hace uso de la aparición de una reacción negativa cuando dicha muestra contiene *SCCmec* integrado en la misma. La Patente de Estados Unidos n.º 7.838.221 describe métodos que usan nuevas secuencias de unión a la extremidad izquierda de *SCCmec* (MREJ) para la detección y/o identificación de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA).

30 En la realización de los presentes métodos, la mezcla de reacción comprende típicamente dos cebadores colgantes: un cebador colgante directo y un cebador colgante inverso. El cebador colgante directo y el cebador colgante inverso pueden tener, pero no necesariamente, longitudes iguales. En algunas realizaciones se usan cebadores colgante en donde $n = 0$ en uno o más cebadores.

35 En una realización, la porción de secuencia 5' del cebador colgante que no es complementaria con el ácido nucleico de SA o MRSA (X) es de aproximadamente 9-15 nucleótidos de longitud, normalmente aproximadamente 10-14 o aproximadamente 11-13 nucleótidos de longitud, y más normalmente aproximadamente 12 nucleótidos de longitud. La porción de secuencia 5' del cebador colgante que no es complementaria con el ácido nucleico de SA o de MRSA (X) puede tener 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 nucleótidos de longitud.

40 En determinados casos, la porción de secuencia 3' de los cebadores colgantes que es complementaria con el ácido nucleico de SA o de MRSA (Y) comprende un mayor número de nucleótidos que la porción de secuencia 5' del cebador colgante que no es complementaria al ácido nucleico de SA y de MRSA (X). Por ejemplo, la porción de secuencia 3' del cebador colgante que es complementaria al ácido nucleico de SA o MRSA (Y) puede comprender aproximadamente un 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, o 90% de la longitud total del cebador colgante.

45 En otros casos determinados, la porción de secuencia 5' del cebador colgante que no es complementaria al ácido nucleico de SA o MRSA (X) comprende un número aproximadamente igual de nucleótidos que la porción de secuencia 3' del cebador colgante que es complementaria al ácido nucleico de SA o MRSA (Y). Por ejemplo, las porciones X e Y pueden tener cada una aproximadamente 4-30, 6-25, 8-20, o 10-15 nucleótidos de longitud, normalmente aproximadamente 10-14 u 11-13 nucleótidos de longitud, y más normalmente aproximadamente 12 nucleótidos de longitud. Las porciones X e Y pueden tener cada una 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleótidos de longitud.

55 En otra realización, la porción de secuencia 5' del cebador colgante que no es complementaria al ácido nucleico de SA o *mecA* (X) comprende al menos aproximadamente un 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, o 95% de bases de nucleótido de adenina o timina, o bases modificadas de las mismas.

ES 2 570 591 T3

En algunas realizaciones, la porción de secuencia 5' del cebador colgante que no es complementaria con el ácido nucleico de *ldh1* o *mecA* (X) comprende la siguiente secuencia: AATAAATCATAA (SEQ ID NO: 3).

5 En algunas realizaciones se proporcionan para la amplificación cebadores sin salientes complementarios al ácido nucleico de *ldh1* o *mecA*. En algunos casos se proporciona un cebador colgante y un cebador sin salientes.

En otras realizaciones, la porción Y del primer cebador colgante comprende la siguiente secuencia: GGT*GA*ACA*TGGTGACACTGAAT-3' (SEQ ID NO: 4), en la que T* es 5-(4-hidroxi-but-1-inil)-1H-pirimidin-2,4-diona (SUPER T®, Elitech Group) y A* es 4-(4,6-diamino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-but-3-in-1-ol (SUPER A®, Elitech Group). En realizaciones adicionales, la porción Y del segundo cebador colgante comprende la siguiente secuencia: GCGCTTT- GCCCTCAGGACG-3' (SEQ ID NO: 5). Preferentemente, el primer cebador colgante comprende la siguiente secuencia: 5'- AATAAAT- CATAAGGT*GA*ACA*TGGTGACACTGAAT -3' (SEQ ID NO: 6), en la que la secuencia de nucleótidos subrayada no es complementaria a la secuencia de SA y T* es SUPER T® y A* es SUPER A®; y le segundo cebador colgante comprende la siguiente secuencia: 5'
10
15 AATAAATCATAAGCGCTTTGCCCTCAGGACG -3' (SEQ ID NO: 7), en la que la secuencia de nucleótidos subrayada no es complementaria a la secuencia de *ldh1*.

En otras realizaciones, el tercer cebador colgante de *mecA* comprende la siguiente secuencia: GTGCGTTAATATT-GCCATTATTTTCTAATGCG -3' (SEQ ID NO: 8), en la que n = 0. En realizaciones adicionales, el cuarto cebador colgante de *mecA* comprende la siguiente secuencia: GGTTACGGACAAGGTGAAATAITGATTAACC -3' (SEQ ID NO: 9), en la que x = 0 e l es 3-alquilil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (Super Inosina).

20 La muestra se obtiene típicamente de un animal que se sospecha que tiene infección por SA/MRSA. Preferentemente, el animal es un ser humano. Los ejemplos de muestras adecuadas para su uso en los métodos incluyen, pero sin limitación, una muestra de fluido cefalorraquídeo (FCR), un frotis nasofaríngeo, un frotis de garganta, un frotis de heridas o rectal, una muestra de heces, y una combinación de las mismas.

Los ácidos nucleicos de *ldh1* y *mecA* pueden detectarse usando cualquiera de los métodos de detección conocidos en la técnica. Por ejemplo, la detección puede llevarse a cabo tras completar una reacción de amplificación (por ejemplo, usando bromuro de etidio en un gel de agarosa) o simultáneamente durante la reacción de amplificación ("detección en tiempo real"). Véase, por ejemplo, PCR Primer: A Laboratory Manual, Dieffenbach et al. (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press (2003); McPherson et al., PCR Basics, 2000; y Rapid Cycle Real-time PCR Methods and Applications: Quantification, Wittwer et al. (eds.), Springer-Verlag (2004). Preferentemente, los ácidos nucleicos de SA y MRSA amplificados se detectan mediante hibridación a una sonda que se une específicamente al ácido nucleico de SA o MRSA amplificado. En determinados casos, el ácido nucleico de *ldh1* o de *mecA* puede detectarse usando una o más sondas generadoras de fluorescencia. Las sondas generadoras de fluorescencia incluyen sondas que se escinden para liberar fluorescencia (por ejemplo, Taqman, Centaurus, etc.), compuestos de unión a ácidos nucleicos (por ejemplo, Patentes de los Estados Unidos con números 5.994.056, 6.171.785, y 6.569.627; Bengtsson et al., Nucl. Acids Res., 31: e45 (2003)), sondas basadas en hibridación (por ejemplo, MGB Eclipse, Molecular Beacons, Pleiades, Centaurus, etc.), y similares. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico de SA o MRSA se detecta con uno o más compuestos fluorescentes de unión a ácidos nucleicos (por ejemplo, SYBR® Green 1 (Molecular Probes; Eugene, OR), BOXTOX, BEBO (TATAA Biocenter; Gotenborg, Suecia), etc.).

En una realización, el ácido nucleico de *ldh1* o de *mecA* se detecta usando una sonda generadora de fluorescencia que hibrida con cualquiera de los ácidos nucleicos de *ldh1* o de *mecA* y una o más bases de nucleótidos de al menos una secuencia de cebador colgante (típicamente, la región complementaria, Y). Por ejemplo, la sonda generadora de fluorescencia puede hibridar con el ácido nucleico de SA y con una o más bases de nucleótidos de la secuencia de cebador colgante directo, o a una o más bases de nucleótidos de la secuencia del cebador colgante inverso, o simultáneamente a una o más bases de nucleótidos de las secuencias de cebador colgante tanto directo como inverso. La sonda generadora de fluorescencia puede hibridar opcionalmente con el ácido nucleico de *ldh1* o *mecA* y a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 bases de nucleótidos de al menos una secuencia de cebador colgante, particularmente la porción complementaria (Y) de un cebador colgante.

En una realización preferida, la sonda generadora de fluorescencia para el gen *ldh1* comprende la siguiente secuencia:

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

en la que Ra se selecciona independientemente entre (M)_a-F1 y (M)_a-Q, Rb se selecciona independientemente entre (M)_a-F1 y (M)_a-Q, y M es una molécula de unión al surco menor, a es 0 o 1, F1 es un fluoróforo con longitud de onda de emisión entre aproximadamente 400 y 900 nm, G* es 6-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (SUPER G®, Elitech Group) y Q es un inactivador no fluorescente, con la salvedad de que la sustitución de Ra y Rb permite la inactivación de la fluorescencia cuando la sonda no está hibridada.

En otra realización preferida, la sonda generadora de fluorescencia para *mecA* comprende la siguiente secuencia:

65 5'-Ra- G*AAAGGATCTGTACTGG*G -Rb-5' (SEQ ID NO: 11),

en la que Ra se selecciona independientemente entre (M)_a-F1 y (M)_a-Q, Rb se selecciona independientemente entre (M)_a-F1 y (M)_a-Q, y M es una molécula de unión al surco menor, a es 0 o 1, Fl es un fluoróforo con longitud de onda de emisión entre aproximadamente 400 y 900 nm, G* es SUPER G® (Elitech Group) y Q es un inactivador no fluorescente, con la salvedad de que la sustitución de Ra y Rb permite la inactivación de la fluorescencia cuando la sonda no está hibridada.

En una realización, Ra en SEQ ID NO: 10 es (M)_a-Fl en la que M es DPl₃, Fl es Aquaphlour™ 554 y Q es el inactivador Eclipse® Dark y la SEQ ID NO:11; Ra en SEQ ID NO:11 es (M)_a-Fl en la que M es DPl₃, Fl es FAM y Q es el Eclipse® Dark.

Los cebadores preferidos pueden incorporar características adicionales, que permiten la detección o inmovilización del cebador pero no alteran la propiedad básica del cebador, *por ejemplo*, para actuar como punto de inicio de la síntesis de ácido nucleico. En algunos casos, los cebadores contienen una o más bases no naturales o bases modificadas en una de las dos o en ambas regiones de secuencia complementarias y no complementarias del cebador.

En determinados casos, la amplificación se lleva a cabo usando una polimerasa. La polimerasa puede, pero no necesariamente, tener actividad de nucleasa 5'. En otros casos determinados, la extensión del cebador se lleva a cabo usando una transcriptasa inversa y la amplificación se lleva a cabo usando una polimerasa.

En otra realización, las secuencias del cebador se solapan, en las que la estabilidad del dúplex de secuencia solapante es menor que la estabilidad de los dúplex de cebador-diana individuales.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para detectar simultáneamente ácidos nucleicos de una diversidad de *S. aureus* en una muestra, que comprenden:

(a) poner en contacto una muestra que se sospecha que contiene los ácidos nucleicos de *S. aureus* con:

(i) un primer cebador colgante que comprende la siguiente secuencia: 5'-AATAAATCATAAGGT*GA*ACA*TGGTGACACT- GAAT -3' (SEQ ID NO: 6, en la que la secuencia de nucleótidos subrayada no es complementaria a la secuencia de *ldh1* y A* es SuperA® y T* es Super T®, que son bases modificadas; y

(ii) un segundo cebador colgante que comprende la siguiente secuencia: 5'-AATAAATCATAAGCGCTTTGCCCTCAGGACG -3' (SEQ ID NO: 7), en la que la secuencia de nucleótidos subrayada no es complementaria a la secuencia de *ldh1*,

(b) incubar la mezcla de reacción de la etapa (a) en condiciones suficientes para amplificar el ácido nucleico de *ldh1*, generando de este modo ácidos nucleicos amplificados a partir de una muestra que contiene SA; y

(c) detectar los ácidos nucleicos de SA amplificados.

En el método para detectar simultáneamente ácidos nucleicos, puede añadirse una etapa adicional después de la etapa (a) poniendo en contacto la muestra después de la etapa (a), en la que la mezcla de la etapa (a) se pone en contacto con:

(i) un tercer cebador colgante que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 8, GTGCGTTAATATTGCCATTATTTCTAATGCG; y

(ii) un cuarto cebador colgante que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 9, GGTTACGGACAAGGTGAAATAITGAT- TAACC, en la que I es 3-alquil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (Super Inosina), el en que los cebadores colgantes tercero y cuarto comprenden cada uno una porción de secuencia que es complementaria al ácido nucleico de *mecA*.

En una realización, los cebadores y sondas para la detección de *mecA*, *ldh1* y de control interno están multiplexados. Cada una de las sondas se marca individualmente con un marcador diferente. En otra realización, las sondas tienen la misma etiqueta.

La muestra se obtiene típicamente de un animal que se sospecha que tiene infección por MRSA. Preferentemente, el animal es un ser humano. Los ejemplos de muestras adecuadas para su uso en los métodos incluyen, pero sin limitación, un frotis de heridas, un frotis nasofaríngeo, un frotis de garganta, un frotis rectal, una muestra de heces, y una combinación de las mismas.

En otro aspecto más, se proporcionan kits para detectar ácido nucleico de SA en una muestra, que comprenden:

(a) un primer cebador colgante que comprende la siguiente secuencia: 5'-AATAAATCATAAGGT*GA*ACA*TGGTGACACTGAAT -3' (SEQ ID NO: 6), en la que la secuencia de nucleótidos subrayada no es complementaria a la secuencia de *ldh1* y A* es Super A y T* es Super T; y

(b) un segundo cebador colgante que comprende la siguiente secuencia: 5' AATAAATCATAAGCGCTTTGCCCTCAGGACG -3' (SEQ ID NO: 7), en la que la secuencia de nucleótidos subrayada no es complementaria a la secuencia de *ldh1*.

5 En otro aspecto, se proporcionan kits para detectar ácidos nucleicos de *mecA* en una muestra, bien solos o en combinación con aquellos para detectar ácidos nucleicos de *ldh1*, que comprenden:

(a) un primer cebador que comprende la siguiente secuencia: 5'-GTGCGTTAATATTGCCATTATTTTCTAATGCG -3' (SEQ ID NO: 8), y

10 (b) un segundo cebador que comprende la siguiente secuencia: 5' GGTTACGGACAAGGTGAAATAITGATTAACC -3' (SEQ ID NO: 9).

En determinados casos, los kits comprenden además una sonda generadora de fluorescencia, tal como una sonda fluorescente basada en hibridación o un compuesto fluorescente de unión a ácidos nucleicos. En una realización preferida, la sonda generadora de fluorescencia de *ldh1* comprende la siguiente secuencia:

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

20 en la que Ra se selecciona independientemente entre (M)_a-F1 y (M)_a-Q, Rb se selecciona independientemente entre (M)_a-F1 y (M)_a-Q, y M es una molécula de unión al surco menor, a es 0 o 1, FI es un fluoróforo con longitud de onda de emisión entre aproximadamente 400 y 900 nm, G* es Super G® (Elitech Group) y Q es un inactivador no fluorescente, con la salvedad de que la sustitución de Ra y Rb permite la inactivación de la fluorescencia cuando la sonda no está hibridada.

25 En otros casos, los kits comprenden además una sonda generadora de fluorescencia, tal como una sonda fluorescente basada en hibridación o un compuesto fluorescente de unión a ácidos nucleicos. En otra realización preferida, la sonda generadora de fluorescencia de *mecA* comprende la siguiente secuencia:

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

30 en la que Ra se selecciona independientemente entre (M)_a-F1 y (M)_a-Q, Rb se selecciona independientemente entre (M)_a-F1 y (M)_a-Q, y M es una molécula de unión al surco menor, a es 0 o 1, FI es un fluoróforo con longitud de onda de emisión entre aproximadamente 400 y 900 nm, G* es Super G® (Elitech Group) y Q es un inactivador no fluorescente, con la salvedad de que la sustitución de Ra y Rb permite la inactivación de la fluorescencia cuando la sonda no está hibridada.

En otro caso más, los kits comprenden un par de cebadores de *ldh1* y un par de cebadores de *mecA*.

En algunos casos, los kits comprenden una sonda de *ldh1* y una sonda de *mecA*.

40 En otros casos determinados, los kits comprenden además un ácido nucleico de control que es adecuado para su uso como control interno. el molde de CI contiene un fragmento de ADN diana no específico no codificante en un vector plasmídico. Preferentemente, la inserción de plásmido del ácido nucleico de control comprende la siguiente secuencia:

5'-

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

45 los kits también pueden comprender cebadores y sondas dirigidos contra el ácido nucleico de control. Como ejemplo no limitante, pueden incluirse en los kits una sonda de control (por ejemplo, una sonda generadora de fluorescencia) y un conjunto de cebadores de control diseñado contra la secuencia de ácido nucleico del fragmento de ADN diana no específico no codificante en un vector plasmídico (SEQ ID NO: 12). Preferentemente, la sonda y los cebadores de control tienen las siguientes secuencias:

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

55 en la que Ra se selecciona independientemente entre (M)_a-F1 y (M)_a-Q, Rb se selecciona independientemente entre (M)_a-F1 y (M)_a-Q, y M es una molécula de unión al surco menor, a es 0 o 1, FI es un fluoróforo con longitud de onda de emisión entre aproximadamente 400 y 900 nm, G* es Super G® (Elitech Group) y Q es un inactivador no fluorescente, con la salvedad de que la sustitución de Ra y Rb permite la inactivación de la fluorescencia cuando la sonda no está hibridada.

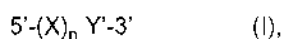
En realizaciones adicionales, puede detectarse una mutación en los genes *ldh1* y *mecA* mediante el siguiente método:

(a) poner en contacto la muestra con un primer cebador colgante y un segundo cebador colgante que tienen la fórmula:



en la que X representa una porción 5' de los cebadores colgantes que no es complementaria al gen *ldh1*, n es 1, Y representa una porción 3' de los cebadores colgantes que es complementaria al gen *ldh1*, y X tiene aproximadamente 3-30 nucleótidos de longitud;

10 (b) poner en contacto la muestra después de la etapa (a) con un tercer cebador colgante y un cuarto cebador colgante que tiene la fórmula:



15 en la que X representa una porción 5' de los cebadores colgantes que no es complementaria al gen de *mecA*, n es 1, Y representa una porción 3' de los cebadores colgantes que es complementaria al gen *mecA*, y X tiene aproximadamente 3-30 nucleótidos de longitud;

(c) incubar la muestra siguiendo las etapas (a) y (b) en condiciones suficientes para producir los genes *ldh1* y *mecA* amplificados; y

20 (d) poner en contacto los genes *ldh1* y *mecA* con sondas generadoras de fluorescencia, en el que una primera sonda generadora de fluorescencia es complementaria al gen *ldh1* amplificado y un gen *ldh1* de tipo silvestre y una segunda sonda generadora de fluorescencia es complementaria al gen *mecA* amplificado y a un gen *mecA* de tipo silvestre, y
 (e) efectuar un análisis de curva de fusión en los genes *ldh1* y *mecA* amplificados en presencia de las sondas generadoras de fluorescencia, en el que una diferencia de aproximadamente 3-12°C entre una temperatura de fusión (T_f) de los ácidos nucleicos de *ldh1* de tipo silvestre y amplificados indica la presencia de una mutación en el ácido nucleico de *ldh1* amplificado y una diferencia de aproximadamente 3-12°C entre la temperatura de fusión (T_f) del ácido nucleico de *mecA* amplificado y de tipo silvestre indica la presencia de una mutación en el ácido nucleico de *mecA* amplificado.

30 El método puede incluir adicionalmente determinar la infección mixta, en donde las señales de *ldh1* y *mecA* o *mecA*_{LGA251} provienen de distintos organismos mediante la comparación de las cantidades relativas de los marcadores *ldh1* y *mecA* o *ldh1* y *mecA*_{LGA251}. Cantidades iguales de *ldh1* y *mecA* o *ldh1* y *mecA*_{LGA251} sugieren infección por MRSA mientras que cantidades distintas sugieren una infección mixta MRSA-negativa de portadores de *ldh1* y *mecA*.

35 El presente método permite la detección específica, sensible y rápida de SA y MRSA. La infección por MRSA normalmente no es distinguible clínicamente de la de otras bacterias y otros patógenos víricos portadores de *mecA* para los que hay disponibles terapias específicas. Los presentes métodos resuelven este problema para el diagnóstico proporcionando la detección rápida y específica de SA y MRSA, eliminando de este modo los falsos positivos observados en algunos de los ensayos de la técnica. Además, las sondas basadas en hibridación permiten el análisis
 40 de las curvas de fusión, que pueden identificar nuevos mutantes potenciales de *ldh1*, *mecA* y *mecA*_{LGA251}.

En otros casos determinados, los kits comprenden además un ácido nucleico de control que es adecuado para su uso como control positivo (CP). El molde de CP contiene porciones de ADN de *ldh1* y *mecA* en un vector de plásmido. Preferentemente, la inserción de plásmido del ácido nucleico de control comprende la siguiente secuencia:

5'-
 ACGTAGCGTCGATGCTCAAATTATTGGTGAACATGGTGACACTGAATTACCAGTATG

 GTCACACGCTAATATTGCGGGTCAACCTTTGAAGACATTACTTGAACAACGTCCTGA
 GGGCAAAGCGCAAATTGAACAAATTTTGTTCAAACACGTGATGCAGCATATGACAT
 TATTCAAGCTAAAGGTGCCACTTATTATGGTGTGCAATGGGATTAGCTAGAAAGCTA
 TCTGCAGAATTCGCCCTTTTACGACTTGTTCATACCATCAGTTAATAGATTGATATT
 TTCTTTGGAAATAATTTTTCTTCCAAACTTTGTTTTTCGIGTCTTTTAATAAGTGAG
 GTGCGTTAATATTGCCATTATTTCTAATGCGCTATAGATTGAAAAGGATCTGTACTGG
 GTTAATCAGTATTTACCTTGTCCGTAACCTGAATCAGCTAATAATATTTTATTATCT
 AAATTTTTGTTTGAATTTGAGCATTATAAAATGGATAATCACTTGGTATATCTTCAC
 CAACACCTAG-3' (SEQ ID NO:18).

45 En otros casos determinados, los kits comprenden además un ácido nucleico de control que es adecuado para su uso como control positivo de *mecA*_{LGA251} (*mecA*_{LGA251} CP). Contiene un solo fragmento del gen LGA251 de *mecA* en un

vector de plásmido. Preferentemente, la inserción de plásmido del ácido nucleico de control comprende la siguiente secuencia: .

CTCGTCAGAATTAATTGGACCCACATAACCTAAAAGGTGTACTGT
TGCTTCGTTCAATGGATAAACACGGC (SEQ ID NO:19)

- 5 En otras realizaciones, se proporcionan cebadores sin salientes complementarios a *mecA*_{LGA251} para amplificación. En algunos casos, ambos cebadores son sin salientes. En otros casos, se proporcionan un cebador sin un saliente y un cebador colgante.

- 10 En algunas realizaciones, el primer cebador de *mecA*_{LGA251} comprende la siguiente secuencia: CTCGTCA-GAAT*T*AATTGGACCCAC (SEQ ID NO: 20), en el que T* es 5-(4-hidroxi-but-1-inil)-1H-pirimidin-2,4-diona (SUPER T®, Elitech Group). En realizaciones adicionales, el segundo cebador de *mecA*_{LGA251} comprende la siguiente secuencia: GCCGT- GTTTATCCATTGAACGAAGCA (SEQ ID NO: 21).

- 15 En otras realizaciones, la amplificación del gen *mecA*_{LGA251} se lleva a cabo con pares de cebadores que comprenden las secuencias GGATATGGCCAAGGCGAGATACTAGTAAACC (SEQ ID NO: 23) y GAGGATTTTGTATATTTCCGT-TATTTTCTAAAGCACTG (SEQ ID NO: 24); AATAAATCATAAGGGTTGAACCTGGTGATGTAGTG (SEQ ID NO: 25) y AATAAATCATAACAATAAAAAAGAGCCT*T*TGCTCAAC (SEQ ID NO: 26). En otro método, comprende cualesquiera 10 bases de nucleótidos de las SEQ ID NO: 23 a 26.

- 20 En una realización preferida, la sonda generadora de fluorescencia para el gen *mecA*_{LGA251} comprende la siguiente secuencia:

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

- 25 en la que Ra se selecciona independientemente entre (M)_a-F1 y (M)_a-Q, Rb se selecciona independientemente entre (M)_a-F1 y (M)_a-Q, G* es 6-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (SUPER G®, Elitech Group) y M es una molécula de unión al surco menor, a es 0 o 1, Fl es un fluoróforo con longitud de onda de emisión entre aproximadamente 400 y 900 nm, y Q es un inactivador no fluorescente, con la salvedad de que la sustitución de Ra y Rb permite la inactivación de la fluorescencia cuando la sonda no está hibridada.

- 30 En otra realización preferida, la sonda generadora de fluorescencia para *mecA*_{LGA251} comprende las siguientes secuencias:

5' -Ra-G*ATAAAAT*T*T*GTA*TA*GG-Rb-3' (SEQ IDNO: 28) y

- 35 5' -Ra-FAM-AAAT*T*T*CAAATCACTAC-Rb-3' (SEQ ID NO: 29)

- 40 en la que Ra se selecciona independientemente entre (M)_a-F1 y (M)_a-Q, Rb se selecciona independientemente entre (M)_a-F1 y (M)_a-Q, y M es una molécula de unión al surco menor, a es 0 o 1, Fl es un fluoróforo con longitud de onda de emisión entre aproximadamente 400 y 900 nm, G* es 6-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (SUPER G®, Elitech Group), T* is Super T, A* es 4-(4,6-diamino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-but-3-in-1-ol (SUPER A®, Elitech Group) y Q es un inactivador no fluorescente, con la salvedad de que la sustitución de Ra y Rb permite la inactivación de la fluorescencia cuando la sonda no está hibridada. En otro método, comprende cualesquiera 10 bases de nucleótidos de las SEQ ID NO: 27 a 29.

45 IV. Cebadores y sondas

- En un aspecto, se proporcionan cebadores oligonucleotídicos ("cebadores salientes", "cebadores colgantes" o "cebadores adaptadores") que se indican lo más generalmente como cebadores 5'-X-Y-3' o 5'-(X)_nY'-3'. X representa la porción de secuencia del cebador que no es complementaria al ácido nucleico de *ldh1* o *mecA*, e Y o Y' representa la porción de secuencia del cebador que es complementaria al ácido nucleico de *ldh1* o *mecA*, respectivamente.

Por consiguiente, en un grupo de realizaciones, el cebador tiene la fórmula:

55 5'-(X)_nY-3' (I),

o

60 5'-(X)_nY'-3' (II),

en las que X representa la secuencia 5' del cebador no complementaria al ácido nucleico de *ldh1* o *mecA*, Y representa la secuencia 3' complementaria del cebador para *ldh1*, Y' representa la secuencia 3' complementaria del cebador para *mecA*, y 5'-X-Y-3' o 5'-(X)_nY'-3' representan al cebador de oligómero de ácido nucleico. En determinadas realizaciones

adicionales, X es [A- B]_m e Y es [A-B]_p, en el que A representa un armazón de fosfato de azúcar, un armazón de fosfato de azúcar modificado, un armazón de ácido nucleico bloqueado, una quimera o una variante del mismo usada en la preparación de ácidos nucleicos; B representa a una base de ácido nucleico o una base modificada de una base; y el subíndice m es un número entero de entre aproximadamente 3-18 o 4-16, normalmente entre aproximadamente 8-15, 10-14, o 11-13, y más normalmente aproximadamente 12. El subíndice p es un número entero de entre aproximadamente 4-50, normalmente entre aproximadamente 8-20, 10-18, o 12-16. En determinadas realizaciones, los valores de los subíndices m y n son iguales, por ejemplo, tanto m como p pueden ser simultáneamente un número entero de entre aproximadamente 8-15, 10-14 u 11-13, y más normalmente aproximadamente 12.

Los cebadores y sondas se preparan generalmente usando métodos de fase sólida conocidos para los expertos en la materia. En general, los materiales de partida están comercialmente disponibles, o pueden prepararse de manera directa a partir de materiales de partida comercialmente disponibles usando manipulaciones de grupos funcionales adecuadas tal como se describe en, por ejemplo, March et al., *ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY - Reactions, Mechanisms and Structures*, 4^a ed., John Wiley & Sons, Nueva York, NY (1992).

En una realización, los cebadores y sondas pueden comprender cualquier nucleótido de origen natural, nucleótidos de origen no natural, o nucleótidos modificados conocidos en la técnica (véase, *por ejemplo*, la Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 20050118623; y la Patente de Estados Unidos n.º 6.949.367).

En una realización, los cebadores y sondas pueden comprender bases universales o promiscuas.

Se consideran bases modificadas aquellas que difieren de las bases de origen natural por la adición o eliminación de uno o más grupos funcionales, diferencias en la estructura de anillo heterocíclico (es decir, sustitución de carbono por un heteroátomo, o viceversa), y/o la unión de una o más estructuras de brazo enlazador a la base. Los nucleótidos modificados preferidos son aquellos basados en una estructura de pirimidina o una estructura de purina, siendo estas últimas preferentemente 7-desazapurinas y sus derivados y pirazolopirimidinas (descritas en el documento de cesión común RE 38.416; la Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 20050118623, y la Patente de Estados Unidos n.º 6.127.121). En las bases modificadas se incluyen aquellas que difieren de las bases de origen natural en donde el armazón del azúcar se modifica (Patente EP n.º 1314734), bases universales (Publicación de Patente PCT n.º WO 02/062816) y bases promiscuas (documento U.S. 7.348.146).

Las bases modificadas ejemplares incluyen, pero sin limitación, el análogo de guanina, 6-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (ppG o PPG, también citado como SUPER G®) y el análogo de adenina 4-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina (ppA o PPA). También puede usarse el análogo de xanteno 1H-pirazolo[5,4-d]pirimidin-4(5H)-6(7H)-diona (ppX). Estos análogos de bases, cuando están presentes en un oligonucleótido, fortalecen la hibridación y mejoran la discriminación de los desemparejamientos. Todas las formas tautoméricas de bases de origen natural, bases modificadas, y análogos de bases pueden incluirse en los conjugados de oligonucleótidos. Otras bases modificadas útiles en los presentes métodos incluyen

6-amino-3-prop-1-inil-5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona (PPPG);
 6-amino-3-(3-hidroxi-prop-1-inil)-1-5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona (HOPPPG);
 6-amino-3-(3-aminoprop-1-inil)-5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona (NH₂PPPG);
 4-amino-3-(prop-1-inil)pirazolo[3,4-d]pirimidin (PPA); 4-amino-3-(3-hidroxi-prop-1-inil)pirazolo[3,4-d]pirimidina (HOPPPA); 4-amino-3-(3-aminoprop-1-inil)pirazolo[3,4-d]pirimidin (NH₂PPPA);
 3-prop-1-inilpirazolo[3,4-d]pirimidin-4,6-diamino ((NH₂)₂PPPA); 2-(4,6-diaminopirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)etin-1-ol ((NH₂)₂PPPAOH); 3-(2-aminoetil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4,6-diamina ((NH₂)₂PPPAH₂);
 5-prop-1-inil-1,3-dihidropirimidin-2,4-diona (PU); 5-(3-hidroxi-prop-1-inil)-1,3-dihidropirimidin-2,4-diona (HOPU);
 6-amino-5-prop-1-inil-3-dihidropirimidin-2-ona (PC); 6-amino-5-(3-hidroxi-prop-1-ini)-1,3-dihidropirimidin-2-ona (NH₂PC);
 5-[4-amino-3-(3-metoxiprop-1-inil)pirazol[3,4-d]pirimidinil]-2-(hidroximetil)oxolan-3-ol (CH₃OPPPA);
 6-amino-1-[4-hidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]-3-(3-metoxiprop-1-inil)-5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona, (CH₃OPPPG); 4,(4,6-diamino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-but-3-in-1-ol (SUPERA®);
 6-amino-3-(4-hidroxi-but-1-inil)-1,5-dihidro-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona;
 5-(4-hidroxi-but-1-inil)-1H-pirimidin-2,4-diona (SUPERT®); 3-yodo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4,6-diamina ((NH₂)₂PPAI); 3-bromo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4,6-diamina ((NH₂)₂PPABr);
 3-cloro-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4,6-diamina ((NH₂)₂PPACl); 3-yodo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina (PPAI); 3-bromo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina (PPABr); y 3-cloro-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina (PPAC1).

Además de las bases modificadas indicadas anteriormente, los oligonucleótidos pueden tener un armazón de azúcar o de restos glucosídicos, preferentemente 2-desoxirribofuranósidos en los que todos los engarces internucleótido son los engarces fosfodiéster de origen natural. En realizaciones alternativas, sin embargo, los grupos 2-desoxi-β-D-ribofuranosa se reemplazan por otros azúcares, por ejemplo, β-D-ribofuranosa. Además, puede estar presente β-D-ribofuranosa en la que el 2-OH del resto de ribosa está alquilado con un grupo alquilo C₁₋₆ (2-(O-alquilo C₁₋₆)ribosa) o con un grupo alqueno C₂₋₆ (2-(O-alqueno C₂₋₆)ribosa), o está reemplazado por un grupo flúor (2-fluororribosa). Los azúcares formadores de oligómeros útiles relacionados son aquellos que están "bloqueados", es decir, que contienen un puente de metileno entre C-4' y un átomo de oxígeno en C-2'. También pueden usarse otros restos de azúcar compatibles con la hibridación del oligonucleótido, y se conocen por los expertos en la materia,

incluyendo, pero sin limitación, α -D-arabinofuranósidos, α -2'-desoxirribofuranósidos, y 2',3'-didesoxi-3'-aminorribofuranósidos. Los oligonucleótidos que contienen α -D-arabinofuranósidos pueden prepararse tal como se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 5.177.196. Los oligonucleótidos que contienen 2',3'-didesoxi-3'-aminorribofuranósidos se describen en Chen et al., *Nucleic Acids Res.*, 23:2661-2668 (1995).

5 También se han descrito procedimientos sintéticos para ácidos nucleicos bloqueados (Singh et al., *Chem. Comm.*, 455-456 (1998); Wengel, *Acc. Chem. Res.*, 32:301-310 (1998)) y para oligonucleótidos que contienen 2'-halógeno-2'-desoxirribofuranósidos (Palissa et al., *Z. Chem.*, 27:216 (1987)). El armazón de fosfato de los oligonucleótidos modificados descritos en el presente documento también pueden modificarse de tal forma que los oligonucleótidos contienen engarces fosforotioato y/o metilfosfonatos y/o fosforamidatos (Chen et al., *Nucl. Acids Res.*, 23:2662-2668 (1995)). Las combinaciones de engarces de oligonucleótidos también se encuentran dentro del alcance de la presente divulgación. Otras modificaciones adicionales más son conocidas para los expertos en la materia.

La capacidad para diseñar sondas y cebadores de un modo predecible usando un algoritmo que puede dirigir el uso o la incorporación de bases modificadas, moléculas de unión al surco menor, fluoróforos y/o inactivadores basándose en sus propiedades termodinámicas se han descrito en, *por ejemplo*, la Patente de Estados Unidos n.º 6.683.173. Por consiguiente, se contempla en la presente divulgación el uso de cualquier combinación de bases normales, bases de pirazolo[3,4-d]pirimidina no sustituidas (por ejemplo, PPG y PPA), pirazolo[3,4-d]pirimidinas 3-sustituidas, purinas modificadas, pirimidinas modificadas, pirimidinas 5-sustituidas, bases universales, modificaciones de azúcares, modificaciones de armazón, y/o moléculas de unión al surco menor para equilibrar la T_f (por ejemplo, entre aproximadamente 5-8°C) de un producto hibridado con un ácido nucleico modificado.

Ya que las sondas de FRET de los presentes métodos no están escindidas, a diferencia de los ensayos basados en 5'-nucleasas que sí lo están, el análisis de la curva de fusión puede usarse para analizar mutaciones que pueden tener lugar en la región de sonda. Se han comunicado análisis de mutaciones en la sonda (Stevenson J, et al., *J Clin Microbiol.*, 43: 2391-8 (2005)).

También se proporcionan micromatrices de oligómeros en las que está presente en la matriz al menos uno de los oligómeros descritos en el presente documento. Los oligómeros divulgados en el presente documento pueden usarse en forma de oligómeros inmobilizados en matrices de oligómeros, tales como aquellos divulgados en, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos n.º 5.492.806; 5.525.464; 5.556.752 y en la Publicaciones PCT WO 92/10588 y WO 96/17957.

Se proporcionan descripciones detalladas de la química usada para sintetizar oligonucleótidos mediante el método de fosforamidita en las Patentes de Estados Unidos n.º 4.458.066 y 4.415.732; Caruthers et al., *Genetic Engineering*, 4:1-17 (1982). y en el manual del usuario de los sintetizadores de polinucleótidos, modelos 392 y 394, páginas 6-1 a 6-22, Applied Biosystems, n.º de pieza 901237 (1991). Los oligonucleótidos etiquetados pueden sintetizarse enzimáticamente, *por ejemplo*, usando ADN polimerasa o ligasa, (*véase, por ejemplo*, Stryer, *Biochemistry*, Capítulo 24, W. H. Freeman and Company (1981)), o mediante síntesis química, por ejemplo, mediante un método de fosforamidita, un método de fosfito-triéster, y similares, (*véase, por ejemplo*, Gait, *OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS*, IRL Press (1990)). Pueden introducirse etiquetas durante la síntesis enzimática utilizando monómeros de nucleósido trifosfato etiquetados, o introducirse durante la síntesis química usando no nucleótidos o nucleótidos de fosforamidita etiquetados, o pueden introducirse después de la síntesis.

V. Componentes de reacción de amplificación adicionales. Tampones

Los tampones que pueden emplearse son tampones basados en borato, fosfato, carbonato, barbital, Tris, etc., véase, *por ejemplo*, la patente de Estados Unidos n.º 5.508.178). El pH de la reacción debe mantenerse en el intervalo de desde aproximadamente 4,5 a aproximadamente 9,5 (*véase, por ejemplo*, la patente de Estados Unidos n.º 5.508.178). El tampón convencional usado en las reacciones de amplificación es un tampón basado en Tris entre 10 y 50 mM con pH de aproximadamente 8,3 a 8,8 (*véase, por ejemplo*, Innis et al., *anteriormente citado*).

Un experto en la materia reconocerá que las condiciones del tampón deben diseñarse para permitir el funcionamiento de todas las reacciones de interés. Por lo tanto, pueden diseñarse las condiciones del tampón para soportar la reacción de amplificación así como cualquier reacción posterior con enzimas de restricción. Puede ensayarse cualquier tampón de reacción particular respecto de su capacidad para soportar diversas reacciones ensayando las reacciones tanto individualmente como en combinación.

Concentración de sal

La concentración de sal presente en la reacción puede afectar a la capacidad de los cebadores para hibridar al ácido nucleico diana (*véase, por ejemplo*, Innis et al., *anteriormente citado*). Puede añadirse cloruro de potasio a una concentración de hasta aproximadamente 50 mM a la mezcla de reacción para promover la hibridación del cebador. También puede añadirse cloruro de sodio para promover la hibridación del cebador (*véase, por ejemplo*, Innis et al., *anteriormente citado*).

Concentración de ión magnesio

La concentración de ión magnesio en la reacción puede afectar a la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana de SA o MRSA (véase, *por ejemplo*, Innis *et al.*, *anteriormente citado*). La hibridación del cebador, la desnaturalización de la hebra, la especificidad de la amplificación, la formación de dímero de cebador, y la actividad enzimática son todas ejemplos de parámetros que se ven afectados por la concentración de magnesio (véase, *por ejemplo*, Innis *et al.*, *anteriormente citado*). Las reacciones de amplificación deben contener un exceso de concentración de magnesio de 0,5 a 6,0 mM frente a la concentración de dNTPs. La presencia de quelantes de magnesio en la reacción puede afectar a la concentración óptima de magnesio. Puede llevarse a cabo una serie de reacciones frente a un intervalo de concentraciones de magnesio para determinar la concentración óptima de magnesio. La concentración óptima de magnesio puede variar dependiendo de la naturaleza del ácido nucleico de SA o de MRSA diana y de los cebadores que se estén usando, entre otros parámetros.

Concentración de desoxinucleótido trifosfato

Los desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) se añaden a la reacción a una concentración final de desde aproximadamente 20 mM a aproximadamente 300 mM. Típicamente, cada uno de los cuatro dNTPs (G, A, C, T) están presentes a concentraciones equivalentes (véase, *por ejemplo*, Innis *et al.*, *anteriormente citado*). En algunas realizaciones, se usa N-glucosilasa de uracilo con dUTP (en lugar de TTP) en las reacciones PCR.

Polimerasas de ácidos nucleicos

Hay comercialmente disponibles una diversidad de polimerasas dependientes de ADN que funcionarán usando los presentes métodos y composiciones. Por ejemplo, puede usarse ADN polimerasa Taq para amplificar secuencias de ADN diana. El ensayo PCR puede llevarse a cabo usando como componente enzimático una fuente de ADN polimerasa termoestable que comprende de manera adecuada ADN polimerasa Taq que puede ser enzima nativa purificada a partir de *Thermus aquaticus* y/o una forma diseñada por ingeniería genética de la enzima. Otras enzimas polimerasas comercialmente disponibles incluyen, *por ejemplo*, polimerasas Taq y ADN polimerasa Tfi, comercializadas por Life Technologies, Promega o Pharmacia. Otros ejemplos de ADN polimerasas termoestables que pueden usarse incluyen ADN polimerasas obtenidas a partir de, *por ejemplo*, especies de *Thermus* y *Pyrococcus*. Los intervalos de concentración de la polimerasa pueden variar entre 1-5 unidades por mezcla de reacción. La mezcla de reacción es típicamente de entre aproximadamente 5 µl y aproximadamente 100 µl.

VI. Otros reactivos

En ocasiones se añaden agentes adicionales a la reacción para lograr los resultados deseados. Por ejemplo, puede añadirse DMSO a la reacción, pero se ha comunicado que inhibe la actividad de la ADN polimerasa Taq. Sin embargo, se ha recomendado el DMSO para la amplificación de múltiples secuencias diana en la misma reacción (véase, *por ejemplo*, Innis *et al.*, *anteriormente citado*). Normalmente se añaden agentes estabilizantes, tales como glicerol, gelatina, albúmina de suero bovino y detergentes no iónicos (por ejemplo, Tween 20) a las reacciones de amplificación (véase, *por ejemplo*, Innis *et al.*, *anteriormente citado*). También puede añadirse inhibidor de RNasa (Ambion; Austin; TX) para limitar la degradación del ARN. Además, puede añadirse betaína (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO), un agente isoestabilizante, para igualar la contribución del emparejamiento de bases de GC y AT a la estabilidad del dúplex de ácido nucleico.

VII. Moléculas de unión al surco menor

Los conjugados (o "sondas") de molécula de unión al surco menor-oligonucleótido se describen en, *por ejemplo*, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.801.155 y 6.312.894. Estos conjugados forman dúplex hiperestabilizados con ADN complementario. En particular, la especificidad de secuencia de las sondas de unión al surco menor es excelente para aplicaciones a alta temperatura, tales como PCR. Estas sondas/conjugados también tendrán conjugada opcionalmente una molécula de unión al surco menor. Se han descrito en la bibliografía una diversidad de moléculas de unión al surco menor adecuadas (véase, *por ejemplo*, la Patente de Estados Unidos n.º 5.801.155; Wemmer *et al.*, Curr. Opin. Struct. Biol., 7:355-361 (1997). Walker *et al.*, Biopolymers, 44:323-334 (1997). Zimmer *et al.*, U. Prog. Biophys. Molec. Bio., 47:31-112 (1986). y Reddy *et al.*, J. W., Pharmacol. Therap., 84:1-111 (1999)).

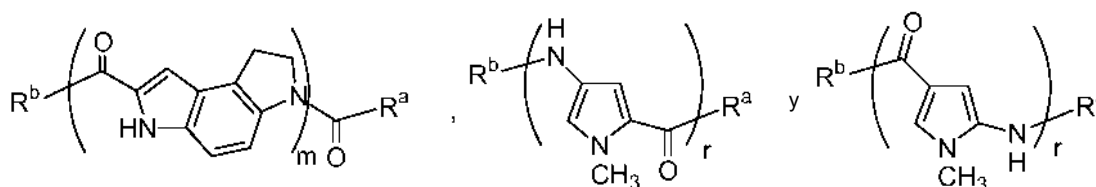
Los conjugados de molécula de unión al surco menor-inactivador-oligonucleótido-fluoróforo puede encontrarse en una disposición lineal (tal como se sugiere por la fórmula 5'-M-Q-ODN-FI-3' o 5'-M-FI-ODN-Q-3') o en una disposición ramificada en la que el inactivador (Q) y la molécula de unión al surco menor (M) están unidas a un grupo enlazador que sirve para unir ODN, Q, y M. Además, el inactivador puede unirse en el extremo distal (en relación a la unión a ODN) de la molécula de unión al surco menor (por ejemplo, 5'-Q- M-ODN-F1-3'). Se pretende que cada una de las disposiciones esté incluida cuando se usa la abreviatura lineal (M-Q-ODN-F1). Además, las porciones de molécula de unión al surco menor e inactivador pueden unirse cada una a uno de los extremos 3' o 5' del oligonucleótido, o en una posición interna del oligonucleótido, siempre que dicha unión no interfiera con los mecanismos de inactivación del conjugado. En general, esto puede lograrse mediante el uso de un grupo enlazador adecuado (véase, *por ejemplo*, la patente de Estados Unidos n.º 7.381.818).

Los métodos adecuados para unir moléculas de unión al surco menor (así como grupos indicadores, tales como fluoróforos e inactivadores descritos más adelante) mediante enlazadores a oligonucleótidos se describen en, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos n.º 5.512.677; 5.419.966; 5.696.251; 5.585.481; 5.942.610; y 5.736.626.

- 5 La molécula de unión al surco menor se une generalmente en la posición 3' o 5' de la porción de oligonucleótido a través de un grupo enlazador adecuado. La unión en el extremo 5' proporciona tanto un beneficio de estabilidad del híbrido, ya que la fusión de un dúplex de oligonucleótido comienza en el extremo, así como reduce y/o evita la digestión por nucleasas de la sonda durante las reacciones de amplificación.
- 10 La localización de una molécula de unión al surco menor dentro de un conjugado de molécula de unión al surco menor-oligonucleótido también puede afectar a las propiedades discriminantes de dicho conjugado. Una región desemparejada dentro de un dúplex dará como resultado cambios en la forma del surco menor en las proximidades de las bases mal emparejadas. Ya que las moléculas de unión al surco menor se ajustan mejor dentro del surco menor de un dúplex de ADN perfectamente emparejado, los desemparejamientos que dan como resultado cambios de forma en el surco menor podrían reducir la fuerza de unión de la molécula de unión al surco menor a una región que contiene un desemparejamiento. De este modo, podría reducirse la capacidad de una molécula de unión al surco menor para estabilizar dicho híbrido, aumentando de este modo la capacidad de un conjugado de molécula de unión al surco menor-oligonucleótido para discriminar un desemparejamiento de un dúplex perfectamente emparejado. Por otra parte, si un desemparejamiento se encuentra fuera de la región complementaria a un conjugado de molécula de unión al surco menor-oligonucleótido, se espera que la capacidad discriminante para los oligonucleótidos no conjugados y conjugados a una molécula de unión al surco menor de igual longitud sea aproximadamente la misma. Ya que la capacidad de una sonda oligonucleotídica para discriminar desemparejamientos de un solo par de bases depende de su longitud, los oligonucleótidos más cortos son más eficaces para discriminar desemparejamientos. La ventaja principal del uso de conjugados de molécula de unión al surco menor-oligonucleótido en este contexto es el hecho de que pueden usarse oligonucleótidos mucho más cortos en comparación con aquellos usados en la técnica anterior (es decir, 20 meros o menores), que tienen mayores potencias de discriminación, debido al pronunciado efecto estabilizante de la conjugación a moléculas de unión al surco menor.

- 30 En un grupo de realizaciones, la molécula de unión al surco menor se selecciona entre el grupo que consiste en los análogos de CC1065, lexitropsinas, distamicina, netropsina, berenilo, duocarmicina, pentamidina, y 4,6-diamino-2-fenilindol y pirrolo[2,1c][1,4]benzodiazepinas.

Las moléculas de unión al surco menor preferidas adicionales son aquellas seleccionadas entre las fórmulas:



- 35 en las que el subíndice m es un número entero de 2 a 5; el subíndice r es un número entero de entre 2 a 10; y cada uno de R^a y R^b es independientemente un grupo enlazador al oligonucleótido (bien directa o indirectamente a través de un inactivador), H, -OR^c, -NR^cR^d, -COOR^c o -CONR^cR^d, en el que R^c y R^d se seleccionan entre H, heteroalquilo (C₂-C₁₂), heteroalqueno (C₃-C₁₂), heteroalquinilo (C₃-C₁₂), alquilo (C₁-C₁₂), alqueno (C₂-C₁₂), alquinilo (C₂-C₁₂), arilalquilo (C₁-C₁₂) y arilo, con la salvedad de que uno de R^a y R^b representa un grupo de unión a ODN o Q. En una realización adicional, cada uno de los anillos en cada estructura puede contener una o más sustituciones adicionales seleccionadas entre H, halógeno, alquilo (C₁-C₈), OR_g, N(R_g)₂, N⁺(R_g)₃, SR_g, COR_g, CO₂R_g, CON(R_g)₂, PO₃⁻(CH₂)_mSO₃⁻, (CH₂)_mCO₂⁻, (CH₂)_mOPO₃⁻², y NHC(O)(CH₂)_mCO₂⁻, y ésteres y sales de los mismos, en el que cada R_g es independientemente H o alquilo (C₁-C₈), y el subíndice m es un número entero de 0 a 6. El símbolo R_n representa H o un grupo (típicamente el vestigio de un grupo enlazador usado en la síntesis de fase sólida) que tiene entre 1-30 átomos seleccionados entre C, N, O, P, y S que es bien cíclico, acíclico, o una combinación de los mismos, y que tiene átomos de hidrógeno adicionales para rellenar las valencias disponibles.

- 50 Las moléculas de unión al surco menor particularmente preferidas son el trímero 3-carbamoil-1,2-dihidro-(3H)-pirrolo[3,2- e]indol-7-carboxilato (CDPI₃) o una triamida de dihidrociclopirroloindol sustituida (DPI₃), el pentámero de N-metilpirrol-4-carbox-2-amida (MPC₅), y otras moléculas de unión al surco menor que muestran discriminación de desemparejamientos aumentada. Las moléculas de unión al surco menor adicionales que serán útiles se divulgan en la Patente de Estados Unidos n.º 5.801.155. En determinadas realizaciones, las moléculas de unión al surco menor pueden tener unidos grupos potenciadores de la hidrosolubilidad (por ejemplo, azúcares, aminoácidos, ácidos carboxílicos o sustituyentes de ácidos sulfónicos, y similares). Véase, por ejemplo, el documento RE 38.416; y la Patente de Estados Unidos n.º 7.582.739.

Los métodos de detección desarrollados recientemente emplean el proceso de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) para la detección de la hibridación de la sonda en lugar de la detección directa de la intensidad de fluorescencia. En este tipo de ensayo, la FRET tiene lugar entre un fluoróforo donante (indicador) y una molécula aceptora (inactivador) cuando el espectro de absorción de la molécula inactivadora se solapa con el espectro de emisión del fluoróforo donante y las dos moléculas se encuentran en estrecha proximidad. La energía del estado excitado del fluoróforo donante se transfiere al aceptor vecino mediante una interacción dipolo-dipolo inducido de resonancia, que da como resultado la inactivación de la fluorescencia donante. Si la molécula aceptora es un fluoróforo, en ocasiones puede aumentarse su fluorescencia. La eficacia de la transferencia de energía entre las moléculasceptoras y donantes es altamente dependiente de la distancia entre las moléculas. Se conocen ecuaciones que describen esta relación. La distancia de Forster (R_0) se describe como la distancia entre las moléculasceptoras y donantes en donde la eficacia de la transferencia de energía es del 50%. También se conocen otros mecanismos de inactivación de la fluorescencia, tales como la inactivación por colisión y por transferencia de carga. Hay orientaciones exhaustivas en la técnica para seleccionar pares de inactivador y fluoróforo y su unión a oligonucleótidos (véase, *por ejemplo*, Haugland, HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS, novena edición, Molecular Probes, Eugene, OR (2002) y la edición web en www.probes.com/handbook; y las Patentes de Estados Unidos n.º 3.996.345 y 4.351.760). Los inactivadores preferidos se describen en las Patentes de Estados Unidos n.º 6.727.356 y 6.790.945; y en las Publicaciones de Patente de Estados Unidos n.º 20030096254 y 20020155484. Existen colorantes de mono y bis-azo adicionales disponibles de Berry y Asociados (Dexter, MI) y Glen Research (Sterling, VA).

Los fluoróforos útiles en los presentes métodos son generalmente colorantes orgánicos fluorescentes que se han derivatizado para su unión al carbono 3' o 5' terminal de la sonda oligonucleotídica, preferentemente a través de un grupo enlazador. Un experto en la materia apreciará que los fluoróforos adecuados se seleccionan en combinación con un inactivador que es típicamente también un colorante inorgánico, que puede ser fluorescente o no serlo.

Hay una gran cantidad de orientación práctica disponible en la bibliografía para seleccionar pares de fluoróforo-inactivador para sondas particulares. Véase, *por ejemplo*, Pesce et al. (eds.), FLUORESCENCE SPECTROSCOPY, Marcel Dekker, Nueva York (1971); White et al., FLUORESCENCE ANALYSIS: A PRACTICAL APPROACH, Marcel Dekker, Nueva York (1970); y similares. La bibliografía también incluye referencias que proporcionan listas exhaustivas de moléculas cromogénicas (inactivadoras) y sus propiedades ópticas relevantes para seleccionar pares de fluoróforo-inactivador. Véase, *por ejemplo*, Berlman, HANDBOOK OF FLUORESCENCE SPECTRA OF AROMATIC MOLECULES, 2ª EDICIÓN, Academic Press, Nueva York (1971); Griffiths, COLOUR AND CONSTITUTION OF ORGANIC MOLECULES, Academic Press, Nueva York (1976); Bishop (ed.), INDICATORS, Pergamon Press, Oxford (1972); Haugland, HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS, novena edición, Molecular Probes, Eugene, OR (2002) y la edición web en www.probes.com/handbook; Pringsheim, FLUORESCENCE AND PHOSPHORESCENCE, Interscience Publishers, Nueva York (1949); y similares. Además, se conocen bien métodos para derivatizar fluoróforos e inactivadores para la unión covalente a través de grupos reactivos comunes. Véase, *por ejemplo*, Haugland, *anteriormente citado*; y las Patentes de Estados Unidos n.º 3.996.345 y 4.351.760.

Los fluoróforos preferidos son aquellos basados en colorantes de xanteno, una variedad de los cuales están comercialmente disponibles con sustituyentes útiles para la unión bien de un grupo enlazador o para la unión directa a un oligonucleótido. Otro grupo de compuestos fluorescentes son las naftilamidas, que tienen un grupo amino en la posición α o β . Entre dichos compuestos de naftilamino se encuentran el 1-dimetilaminonaftil-5-sulfonato, sulfonato de 1-anilino-8-naftaleno, y sulfonato de 2-p-toluidinil-6-naftaleno. Otros colorantes incluyen 3-fenil-7-isocianatocumarina, acridinas, tales como 9-isotiocianatoacridina y naranja de acridina, N-(p-(2-benzoxazolil)fenil)maleimida, benzoxadiazoles, estilbenos, pirenos, y similares. Otros fluoróforos adecuados más incluyen los colorantes de resofurina, colorantes de rodamina, colorantes de cianina, y colorantes BODIPY. Se prefieren particularmente los colorantes fosfonilados descritos en las Patentes de Estados Unidos n.º 7.671.218 y 7.767.834. Los ejemplos de colorantes fosfonilados adecuados se exponen en la tabla 1.

Tabla 1. Colorantes de xanteno y cianina

n.º	Nombre	Estructura del colorante
1	FAM	
2	AquaPhlour® 554 (AP 554)	
3	AquaPhlour® 593 (AP 593)	
4	AquaPhlour® 642 (AP 642)	

VIII. Grupos enlazadores

- 5 Los expertos en la materia conocen una diversidad de grupos enlazadores para unir fluoróforos, inactivadores, y moléculas de unión al surco menor a los extremos 5' o 3' de oligonucleótidos. Véase, por ejemplo, Eckstein, (ed.), OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES: A PRACTICAL APPROACH, IRL Press, Oxford (1991); Zuckerman et al., Nuc. Acids Res., 15:5305-5321 (1987). Sharma et al., Nuc. Acids Res., 19:3019 (1991); Giusti et al., PCR Methods and Applications, 2:223-227 (1993), Patentes de los Estados Unidos con números 4.757.141 y 4.739.044, Agrawal et al., Tetrahedron Letters, 31:1543-1546 (1990). Sproat et al., Nuc. Acids Res., 15:4837 (1987); Nelson et al., Nuc. Acids Res., 17:7187-7194 (1989). y similares. Pueden usarse otros grupos enlazadores adicionales comercialmente disponibles que pueden unirse a un oligonucleótido durante la síntesis y están disponibles a través de, *por ejemplo*, Clontech Laboratories (Palo Alto, CA.). Otras metodologías para unir un fluoróforo a una porción de oligonucleótido implica el uso de química de fosforamidita al concluir la síntesis de fase sólida mediante colorantes derivatizados con un resto de fosforamidita. Véase, *por ejemplo*, Patentes de Estados Unidos n.º 5.231.191; 4.997.928; 6.653.473; 6.790.945; y 6.972.339; y la Publicación de Patente PCT n.º WO 01/42505.
- 10
- 15

IX. Métodos de uso

Los cebadores y sondas para detectar tanto MRSA como SA, basándose en una detección combinada de marcadores de *ldh1* y *mecA*, proporcionan numerosas ventajas frente a los cebadores y sondas de ensayo existentes, incluyendo la especificidad. Los cebadores y sondas son particularmente útiles cuando se usan para detectar una secuencia diana en tiempo real (o coincidente) con un proceso de amplificación, tal como, por ejemplo, PCR. Además, las sondas preferidas no se digieren por la actividad de 5'-nucleasa. Por consiguiente, las reacciones de amplificación pueden archivarse y volver a evaluarse mediante el análisis de la curva de fusión.

Los métodos divulgados en el presente documento se ponen en práctica con ácido desoxirribonucleico (ADN) como material de partida. Típicamente, la diana de ADN se amplifica con cualquier método de amplificación basado en ADN. Uno de estos métodos de amplificación es la reacción en cadena de la polimerasa (véase, *por ejemplo*, Patentes de los Estados Unidos con números 4.683.195 y 4.965.188, y Mullis et al., Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 51 Pt 1:263-273 (1986)). En algunos casos, el ADNc transcrito se amplifica mediante métodos distintos de la PCR. El uso de uno cualquiera de los cebadores y sondas en los métodos de amplificación no de PCR se encuentran dentro del alcance de la presente divulgación. Además de las reacciones de amplificación más tradicionales discutidos anteriormente, los presentes métodos son útiles en amplificaciones que implican uniones por tres vías (véase, *por ejemplo*, la Publicación de Patente PCT n.º WO 99/37085), amplificación de señal (véase, *por ejemplo*, Capaldi et al., Narc. Acids Res., 28:E21 (2000)), RNasa H, círculos rotatorios, escisión invasiva de sondas de oligonucleótidos mediante endonucleasas colgantes (véase, *por ejemplo*, Lyamichev et al., Nature Biotechnol., 17:292-296 (1999)), ensayos del tipo de replicación se secuencia autosostenida (véase, *por ejemplo*, Mueller et al., Histochem. Cell Biol., 108:431-437 (1997)), y similares.

El ADN o ADNc amplificado se detecta mediante técnicas convencionales que incluyen el uso de cebadores o sondas adecuadamente etiquetados. Las etiquetas detectables adecuadas incluyen las fluorescentes, quimioluminiscentes, colorimétricas, radiactivas, químicas, anticuerpos y antígenos, biotina, y similares. Los métodos adecuados para detectar dichas etiquetas se conocen bien en la técnica y están disponibles comercialmente.

Las sondas preferidas son sondas basadas en hibridación, que contienen un grupo de unión al surco menor en el extremo 5' de la sonda. El uso de estas sondas de detección para detectar dianas amplificadas se describe en las Patentes de Estados Unidos n.º 7.205.105 y 7.381.818. Como alternativa, las sondas escindidas por la actividad de 5'-nucleasa de la polimerasa se incluyen dentro del ámbito de la presente divulgación (véase, *por ejemplo*, la Patente de Estados Unidos n.º 6.312.894; y Livak, Genet Anal., 14:143-149, 1999).

X. Kits

Además se proporcionan kits para la detección de ácidos nucleicos de MRSA/SA (por ejemplo, en una muestra, tal como una muestra biológica). Los kits comprenden típicamente dos o más componentes necesarios para amplificar ácidos nucleicos de *ldh1* y *mecA*. Los componentes pueden ser compuestos, reactivos, envases, y/o equipamiento. Por ejemplo, un envase en un kit puede contener un primer cebador colgante y un segundo cebador colgante, por ejemplo, las SEQ ID NO: 6 y 7 y otro envase en el kit puede contener un tercer y un cuarto cebador colgante, *por ejemplo*, SEQ ID NO:9. Además, los kits pueden contener una o más sondas, *por ejemplo*, SEQ ID NO: 10 y 11. Los kits también pueden contener una o más secuencias de ácido nucleico de control, *por ejemplo*, SEQ ID NO: 12, y sondas y cebadores para amplificar la secuencia de control, *por ejemplo*, SEC ID N.º: 13,14, y 15. En algunas realizaciones, los kits comprenden instrucciones para su uso, *es decir*, instrucciones para usar los cebadores en reacciones de amplificación y/o detección descritas en el presente documento y comparando.

XI. Análisis informático

En otra realización, se proporcionan un método y un sistema para analizar los resultados de ensayo de un sujeto para determinar si dicho sujeto es positivo a MRSA. Dicho sistema comprende: medios de procesamiento informático para recibir, procesar y comunicar datos; medios de almacenamiento para almacenar datos, incluyendo una base de datos de referencia que incluye umbrales de ciclo de control (Ct) de *mecA* y *ldh1* correspondientes a su estado de detección de MRSA asignado, a saber, MRSA-positivo, MRSA-negativo/SA-negativo, análisis inválido, MRSA-negativo/SA-positivo y MRSA-negativo/SA-negativo; y un programa informático incluido en el procesador informático. Los umbrales de ciclo se definen como el número de ciclos necesarios para que la señal fluorescente cruce el umbral, o que exceda el nivel de fondo. Una vez que los datos que consisten en o que incluyen el resultado de un análisis de una muestra, que incluye medidas de *mecA* y *ldh1* y umbrales de ciclo de control (Ct) para una muestra particular, se recibe o introduce, el programa informático procesa dichos datos en el contexto de dicha base de datos de referencia para determinar, como resultado, el estado de MRSA del sujeto. El resultado puede comunicarse una vez conocido, preferentemente a un usuario que ha introducido dichos datos.

En una realización, el resultado puede comunicarse a un proveedor de atención sanitaria.

En una realización adicional, donde el resultado comunicado es "positivo a MRSA/SA", este resultado se supone positivo para MRSA y comprende la detección de las dianas de *mecA* y *ldh1* en cantidades aproximadamente iguales. Se entiende que MRSA positivo incluye todas las cepas de *mecA*, incluyendo, por ejemplo, LGA₂₅₁.

5 En una realización, en donde el resultado comunicado es "MRSA negativo, SA positivo", este resultado se supone positivo para SA y comprende la detección solo de la diana de *ldh1* o la detección de *mecA* y *ldh1* en cantidades diferentes.

10 En una realización en donde el resultado comunicado es "MRSA/SA negativo", este resultado se supone negativo para SA y comprende la ausencia de detección de la diana de *ldh1*.

En una realización en donde el resultado comunicado es "MRSA positivo", este resultado se supone positivo para MRSA y comprende la detección de una secuencia de unión de *mecA*.

15 En una realización en donde el resultado comunicado es "MRSA negativo", este resultado se supone negativo para MRSA y comprende la ausencia de detección de una secuencia de unión de *mecA*.

20 En una realización en donde el resultado comunicado es "SA positivo", este resultado se supone positivo para SA y comprende la detección de una o más dianas específicas de secuencia de SA con la salvedad de que la diana de *ldh1* también se detecta. Se han comunicado dianas de *ldh1* específicas de secuencia incluyendo una región génica reguladora de gap (véase la Patente de Estados Unidos n.º 6946267), así como de spa, nuc, Sa442, clfA, femA y femB.

25 En una realización preferida, la interpretación del resultado se efectúa mediante procesamiento informático. En otra realización preferida, el procesamiento informático se efectúa mediante una función de Excel "condicionada". El uso de una función de Excel "condicionada" que calcula una interpretación de resultados se demuestra en el ejemplo 8.

EJEMPLOS

30 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar, pero no limitar, la materia objeto descrita en el presente documento.

35 Se lleva a cabo la PCR usando las concentraciones finales de los componentes de ensayo en el mono-reactivo mostrado en la tabla 2 a continuación. dT_(β)-AP593 es un control de referencia pasivo. La mezcla maestra 2X Tfi PCR (Life Science Technologies, Inc) contiene todos los reactivos necesarios para llevar a cabo la PCR, incluyendo uracilo-N-glucosilasa (UNG). El potenciador es glicerol al 2,65% y Triton X-100 al 0,3%.

Tabla 2

SEQ ID	Nombre del componente	Oligosecuencia	1X Final
6	LDH-L12	AATAAATCATAAGGT*GA*ACA*TGGTGAC ACTGAAT	0,500 mM
7	LDH-E4	AATAAATCATAAGCGCTTTGCCCTCAGGA CG	1.260mM
8	MEC-L4	GTGCGTTAATATTGCCATTATTTCTAATG CG	0,500 mM
9	MEC-E6	GGTTACGGACAAGGTGAAATAITGATTAAC C	1,260 mM
10	LDH-AP554-5	MGB-AP554- G*ACATTACT*T*GA*ACAA*CG-EDQ	0,500 mM
11	MEC-FAM3	MGB-FAM-G*AAAGGATCTGTACTGG*G- EDQ	0,200 mM
13	E6132-642-3	MGB-AP642-G*AATG*CGGTACGTGGTCC- EDQ	0,200 mM
14	E6132-E	CTCATTTTTTCTACCGGAGATCTTGT	0,100 mM
15	E6132-L	CTGCACGGACCAGTTACTTTACG	0,300 mM
16	dT _(β) -AP593 Referencia pasiva	TTTTTTTT - AP593	0,035 mM
	Mezcla maestra 2X Tfi PCR	NA	1,00X
	Potenciador de PCR 10X	NA	1,00X
	Agua de grado para biología molecular	NA	NA

40 Se introducen veinte microlitros del mono-reactivo en una placa para PCR de 96 pocillos con 10 µl de muestra de ácido nucleico. El ácido nucleico de muestra se obtiene mediante extracción con easyMAG usando reactivos de instrucción NucliSENSE easyMAG e instrucciones (Biomieurex, l'Etoile, Francia). La placa se sella con película adhesiva óptica

MicroAmp® (Applied Biosystems, Foster City, CA) y después se centrifugaron para recoger la solución de ensayo en el fondo del pocillo de la placa. Entonces se lleva a cabo el ensayo en una máquina para PCR en tiempo real ABI 7500 DX Fast Block con el protocolo mostrado en la tabla 3 a continuación.

5 Tabla 3. Protocolo de PCR en tiempo real de ABI 7500DX Fast Block

Etapa	Tiempo	Temperatura
UNG	2 min	50°C
Desnaturalización	2 min	93 °C
ciclado PCR (45X)	10 s	93 °C
	30 s	56° C
	20 s	72 °C
Tiempo total	10 h 10 min	

EJEMPLO 1

10 Este ejemplo establece los criterios para la identificación de MRSA y SA usando detección génica de *mecA* y *ldh1*. Ya que *mecA* y *ldh1* están presentes como genes de una sola copia, en un genoma de MRSA, las cantidades relativas respectivas deben estar en la misma proporción (1:1) en un caso de una sola infección por MRSA. En el caso de infección mixta por SA e infección por estafilococos coagulasa-negativos resistentes a la meticilina, las cantidades relativas de los marcadores respectivos serán diferentes. El valor Cq obtenido mediante la PCR en tiempo real es indicativo de la cantidad relativa de cada marcador. Por lo tanto, mediante la comparación de valores de Cq es posible 15 comparar cantidades relativas de los marcadores. La presencia de marcadores tanto de SA como de *mecA* en la misma cantidad relativa (es decir, el valor absoluto de $C_{q1} - C_{q2}$, una diferencia en Cq denominada "ACq menor de 2") es indicativa de MRSA; cantidades relativas diferentes (una diferencia en Cq mayor o igual a 2) o la presencia únicamente de marcador génico específico de *Staphylococcus aureus* es indicativo de SA. Se supone que la situación con exactamente la misma cantidad de diferentes bacterias en una muestra es despreciablemente rara.

20 Por lo tanto, se ensayaron 3174 en un estudio de investigación prospectivo en tres ubicaciones. En comparación con el método de cultivo de referencia (prueba de aglutinación de látex y susceptibilidad a disco de cefoxitina después de enriquecimiento del caldo) se identificaron un 92% de muestras ensayadas positivas para MRSA, un 96% de muestras ensayadas positivas para SA, y un 95% de muestras negativas.

25 EJEMPLO 2

30 Este ejemplo ilustra el análisis PCR en tiempo real de una infección por MRSA frente a infecciones mixtas de *S. aureus* MRSA negativo y bacterias coagulasa-negativas *mecA*-positivas (MRCoNS). Se ejecutaron muestras MRSA positiva/CI (figura 1), *S. aureus*-negativa /CI (figura 2) y MRSA-negativa *S. aureus*-positiva /CI (figura 3) en los reactivos y condiciones indicados anteriormente. Las Cq similares para *mecA* y *ldh1* en la figura 1 indican infección por MRSA. La incapacidad de la curva en tiempo real de *ldh1* para cruzar el umbral en la figura 2 indica ausencia de *S. aureus* en una muestra. La diferencia significativa en las Cq entre *mecA* y *ldh1* en la figura 3 indica una infección mixta de *S. aureus* MRSA-negativo y bacterias negativas a coagulasa *mecA*-positivas.

35 EJEMPLO 3

40 Este ejemplo establece los criterios para la identificación de MRSA y SA usando detección génica de *mecA*, sitio de inserción de *SCCmec*, y detección génica de *ldh1*.

La detección del marcador de sitio de inserción de *SCCmec* (región de puente de *SCCmec*) se añade para tener en cuenta la situación en la que hay aproximadamente la misma cantidad de diferentes bacterias (MSSA y MRCoNS) en una muestra.

45 La tabla 4 a continuación muestra una comparación de las Cq en PCR en tiempo real para el sitio de inserción de *SCCmec*, *ldh1* y *mecA* usando un panel representativo de muestras clínicas. La presencia de marcadores tanto de SA como de *mecA* en la misma cantidad relativa (ACq menor de 2) es indicativa de MRSA si esa muestra es positiva para la PCR de región de puente de *SCCmec*; diferentes cantidades relativas (ACq igual o mayor de 2) o la presencia únicamente del marcador génico específico de *Staphylococcus aureus* es indicativa de SA incluso si la muestra es positiva para la PCR de región de puente de *SCCmec*. Los cebadores de sitio de inserción de *SCCmec* se describieron anteriormente (Huletsky, A., et al., J. Clin. Microbiol., 42: 1875-1884 (2004)). La sonda usada fue MGB-AP642-AAT-TAACACAACCCGCAT-Q (SEQ ID NO: 17).

Tabla 4

Muestra n.º	LDH1 =C _{q1}	<i>mecA</i> = C _{q2}	$\Delta C_{q1} - C_{q2}$	Región de puente de <i>SCCmec</i>	Resultado de PCR en tiempo real	Resultado de cultivo	¿Concordante?
256	23,76	24,56	0,81	+	MRSA	MRSA	Sí

261	26,53	27,13	0,60	-	MSSA	MSSA	Sí
269	25,85	28,75	2,90	+	MSSA	MSSA	Sí
273	32,76	38,93	6,17	-	MSSA	MSSA	Sí
282	20,33	21,11	0,77	+	MRSA	MRSA	Sí
288	32,10	-	NA	-	MSSA	MSSA	Sí
291	22,80	30,86	8,05	-	MSSA	MSSA	Sí
292	25,22	24,59	0,63	+	MRSA	MRSA	Sí
298	34,19	37,66	3,47	-	MSSA	MSSA	Sí
300	29,16	27,98	1,18	-	MSSA	MSSA	Sí
301	32,18	32,34	0,16	+	MRSA	MSSA	No
309	24,09	25,22	1,12	+	MRSA	MRSA	Sí
337	27,78	26,02	1,76	-	MSSA	MSSA	Sí
345	28,32	28,21	0,11	-	MSSA	MSSA	Sí

Tal como se muestra en la tabla 4 anterior, las muestras 261, 300, 337 y 345 tienen aproximadamente las mismas cantidades de marcadores *mecA* y *ldh1*, pero son negativas para el marcador de región puente de *SCCmec*. Esto es indicativo de una infección mixta (MSSA y MRCoNS) que se confirmó mediante resultados de cultivo microbiano.

5 EJEMPLO 4

Este ejemplo ilustra la sensibilidad del ensayo usando un cultivo criodesecado de organismo comprado a la ATCC. También compara los C_q de la PCR en tiempo real de la detección de *ldh1* con y sin un control interno (CI).

10 Se rehidrató *Staphylococcus aureus*; subespecie *aureus*; cepa BAA-1762, cultivo LN 593372 47, y se subcultivó del modo siguiente. En primer lugar se añaden de manera aséptica de 0,3 a 0,4 ml de medio de caldo de soja triptica (VWR 90000-376) al material criodesecado con una pipeta Pasteur y se mezclaron bien. Después se transfirió la mezcla total a 5 ml del mismo medio en un tubo de ensayo y se incubó a 37°C durante 24 horas. El título bacteriano se determinó preparando diluciones en serie de factor diez del cultivo bacteriano en medio de caldo de soja triptica. Se transfirieron 100 µl de diluciones de 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} a placas de agar de soja tripticasa y se incubaron durante toda la noche a $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Se contaron las colonias en las placas que contenían 10 - 200 colonias y se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC)/ml del modo siguiente:

20
$$\text{UFC/ml} = \text{número de colonias} \times 10 \times \text{factor de dilución}$$

Se prepararon dos conjuntos de siete diluciones de factor diez, abarcando un intervalo de 10^7 - 10 UFC/ml en medio de recogida ESwab. Mezclaron un ml de la primera dilución con 10 µl de control interno 2 (CI2) y no con el segundo. Ambos conjuntos se extrajeron usando el sistema de extracción automatizada NucliSENS easyMAG y se eluyeron en un volumen de 50 µl. Se ensayaron mediante PCR tres replicados de 10 µl de cada muestra extraída.

Para representar el grupo de datos de blanco, las muestras negativas (SN) medio ESwab no estimulado (M110024)) se extrajeron por separado usando el mismo proceso, y se ensayaron replicados de 10 µl de cada muestra negativa extraída mediante PCR junto con muestras de UFC. Se compararon las C_q de dos conjuntos de reacciones positivas a diana (con/sin CI).

La tabla 5 a continuación muestra las C_q de diluciones en serie de cultivos de *S. aureus* que detectan *ldh1*, que es un marcador de SA, en presencia y ausencia de un control interno (CI).

35

Tabla 5

Nombre de muestra	C_q media	ΔC_q media
1e7 No CI2/+CI2	13,27 / 13,28	0,01
1e6 No CI2/+CI2	16,88 / 16,87	0,00
1e5 No CI2/+CI2	20,38 / 20,38	-0,01
1e4 No CI2/+CI2	23,82 / 23,83	-0,01
1e3 No CI2/+CI2	27,13 / 27,12	-0,01
1e2 No CI2/+CI2	30,50 / 30,30	-0,03
1e1 No CI2/+CI2	33,43 / 33,37	0,10

Este ejemplo muestra que el ensayo detecta fácilmente al menos 10 UFC/ml y que se observan C_q similares con o sin CI.

40 EJEMPLO 5

Este ejemplo ilustra la capacidad del ensayo para detectar >99% de un número adecuado de cepas de MRSA que abarcan un amplio patrón de diversidad y la carga clínica relevante (aproximadamente 100 copias de genoma/PCR).

5 Cada cepa de *S. aureus* de la ATCC (listadas en la tabla 6 a continuación) se emplacó en una placa de agar de soja tríptica y se incubó a 37°C durante 24 horas. Se verificó la uniformidad de colonias. Se transfirió una colonia de cada placa a un tubo separado (único para cada cepa) que contenía 5 ml de medio de caldo de soja tríptica y se dejó crecer durante toda la noche a 37°C. Se mezclaron 1 ml de cada medio ESwab con 10 µl del cultivo de toda la noche, y se extrajo en un instrumento EasyMag (Biomerieux) usando el protocolo Generic 2.0.1 y se eluyeron en un volumen de 50 µl. Se usaron 10 µl de cada muestra en la reacción PCR. Los resultados de *ldh1* y *mecA* se analizaron y se resumen en la tabla 7 a continuación, indicando la diferenciación satisfactoria de muestras *mecA*-negativas de MSSA de las muestras *mecA*-positivas de MRSA. Como era de esperar, todas las cepas de *S. aureus* fueron positivo para el marcador *ldh1* de SA.

Tabla 6. La lista de cepas de *Staphylococcus aureus* ensayadas (ATCC)

Número de artículo ATCC	Descripción de la cepa	Número de lote	<i>mecA</i>	SCC tipo
BAA-1556 (NRS482)	StrainFPR3757; clon USA300 de MRSA adquirido comunalmente	58468651	Positiva	N/A
BAA-39	Cepa HUSA304; Clon húngaro de MRSA	4248847	Positiva	N/A
BAA-40	Cepa CPS22; Clon portugués de MRSA	57600149	Positiva	N/A
33591	Cepa 328: MRSA	57882703	Positiva	
BAA-1762	Cepa GA217; USA300 MRSA (SCCmec IVb)	59337247	Positiva	IVb
BAA-1720	MRSA252; Cepa adquirida en hospital aislada en Reino Unido	59049230	Positiva	II
12600	Cepa NCTC 8532, MSSA	58532124	Negativa	-
25923	Cepa Seattle 1945, MSSA	58414955	Negativa	-

15

Tabla 7. Los resultados de ensayos de cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC)

Número de artículo ATCC	gen <i>ldh1</i>	gen <i>mecA</i>
BAA-1556	Positiva	Positiva
Número de artículo ATCC	gen <i>ldh1</i>	gen <i>mecA</i>
BAA-39	Positiva	Positiva
BAA-40	Positiva	Positiva
33591	Positiva	Positiva
BAA-1762	Positiva	Positiva
BAA-1720	Positiva	Positiva
12600	Positiva	Negativa
25923	Positiva	Negativa

Tal como se muestra en las tablas 6 y 7 la detección de los genes *mecA* e *ldh1* detecta específicamente MRSA y SA.

20 EJEMPLO 6

Este ejemplo ilustra la especificidad del ensayo. Esta se evaluó ensayando respecto de la reactividad cruzada con especies relacionadas filogenéticamente con *S. aureus*, microorganismos patógenos y con microorganismos comúnmente presentes en la microflora nasal normal. El panel de ensayo (tabla 8) consistió en 17 especies víricas, 3 fúngicas, 1 de micoplasma, y 41 bacterianas. Los microorganismos se ensayaron como cultivos en concentraciones de 1×10^6 UFC (1×10^5 UFP)/frotis. Además se ensayaron células humanas a una concentración de 10^6 células/ml. Las células humanas y todas las especies ensayadas fueron negativas para MRSA y SA. La especificidad analítica fue del 100%.

30

Tabla 8. Especies ensayadas respecto de reactividad cruzada e interferencia microbiana

Especies de	Otros organismos	Virus
<i>Staphylococcus</i>		
<u>CoNS*</u>	<i>Acinetobacter haemolyticus</i> ,	<i>Adenovirus Tipo 1</i> , <i>Adenovirus</i>
<i>Staphylococcus</i>	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bordetella</i>	<i>Tipo 7A</i> ,
<i>arlettae</i> ,	<i>pertussis</i> , <i>Citrobacter freundii</i> ,	<i>Coronavirus humano (229E)</i> ,
<i>Staphylococcus capitis</i> ,	<i>Citrobacter koseri</i> ,	<i>Coronavirus humano (OC43)</i> ,
<i>Staphylococcus</i>	<i>Corynebacterium aquaticum</i> ,	<i>cytomegalovirus</i> ,
<i>carneus</i> ,	<i>Corynebacterium bovis</i> ,	<i>Coxsackievirus Tipo A21</i> , <i>virus</i>
<i>Staphylococcus</i>	<i>Corynebacterium flavescens</i> ,	<i>de Epstein Barr</i> ,
<i>chromogenes</i> ,	<i>Corynebacterium genitalium</i> ,	<i>virus de la gripe A humano</i> ,
<i>Staphylococcus</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i> ,	<i>virus de la gripe B humano</i> ,
<i>equorum</i> ,	<i>Enterococcus faecalis</i> ,	<i>parainfluenza humana de tipo 2</i> ,
<i>Staphylococcus felis</i> ,	<i>Enterococcus faecium</i> ,	<i>parainfluenza humana de tipo 3</i> ,
<i>Staphylococcus</i>	<i>Enterococcus flavescens</i> ,	<i>metaneumovirus humano 3 de</i>
<i>gallinarum</i> ,	<i>Enterococcus gallinarum</i> ,	<i>tipo B1</i> ,
<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Enterococcus hirae</i> , <i>Escherichia</i>	<i>sarampión</i> ,
<i>subsp. hominis</i> ,	<i>coli</i> , <i>Productor de ESBL</i> , <i>Klebsiella</i>	<i>virus de las paperas</i> ,
<i>Staphylococcus kloosii</i> ,	<i>oxytoca</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> ,	<i>Virus respiratorio sincitial de tipo</i>
<i>Staphylococcus lentus</i> ,	<i>Productor de ESBL</i> , <i>Listeria</i>	<i>B</i> ,
<i>Staphylococcus pulvereri</i> ,	<i>monocytogenes</i> , <i>Moraxella</i>	<i>Rinovirus de tipo 1A</i>
<i>Staphylococcus</i>	<i>catarrhalis</i> , <i>Pasteurella aerogenes</i> ,	
<i>simulans</i> ,	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> ,	
<i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ,	
<u>MSCoPS*</u>	<i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Serratia</i>	
<i>Staphylococcus delphini</i> ,	<i>marcescens</i> , <i>Shigella sonnei</i> ,	
<u>MSCoNS*</u>	<i>Streptococcus mitis</i> , <i>Streptococcus</i>	
<i>Staphylococcus</i>	<i>salivarius</i> , <i>Yersinia</i>	
<i>epidermidis</i> ,	<i>enterocolitica</i> , <i>Candida albicans</i> ,	
<i>Staphylococcus xylosum</i>	<i>Candida glabrata</i> , <i>Cryptococcus</i>	
<u>MRCoNS*</u>	<i>neoformans</i> , <i>Lactobacillus</i>	
<i>Staphylococcus</i>	<i>acidophilus</i> , <i>Legionella</i>	
<i>epidermidis</i>	<i>pneumophila</i> , <i>Mycobacterium</i>	
<u>CoPS*</u>	<i>tuberculosis avirulenta</i> ,	
<i>Staphylococcus hyicus</i> ,	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> ,	
<i>Staphylococcus</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> ,	
<i>intermedius</i>	<i>Streptococcus mutans</i> ,	
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ,	
	<i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Homo</i>	
	<i>sapiens</i> , <i>Células humanas HT1080</i>	
* CoNS: <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativos, MSCoPS: <i>Staphylococcus</i> susceptibles a meticilina coagulasa positivos, MSCoNS: <i>Staphylococcus</i> susceptibles a meticilina coagulasa negativos, MRCoNS: <i>Staphylococcus</i> resistentes a meticilina coagulasa negativos, CoPS: <i>Staphylococcus</i> coagulasa positivos		

EJEMPLO 7

- 5 Este ejemplo ilustra la detección exitosa de aislado de MRSA portador del gen *mecA* y del aislado LGA251 de MRSA que tiene un gen diferente al de la mayoría de genes de resistencia a meticilina de MRSA y se denomina *mecA*_{LGA251}. La amplificación PCR se efectuó tal como se divulga en la tabla 2, con condiciones como las descritas en la tabla 3 excepto que se añadieron los cebadores de SEQ ID NO: 20 a 22 representando los cebadores y sondas para la amplificación PCR de *mecA*_{LGA251} (tabla 9).

10

Tabla 9. Secuencias de cebador y sonda para la detección de *mecA*_{LGA251}

SEQ ID	Nombre del componente	Oligosecuencia	1X Final
20	LGA-L12	CTCGTCAGAAT*T*AATTGGACCCAC	0,500 µM
21	LGA-E5	GCCGTGTTTATCCATTGAACGAAGCA	1,260 µM
22	LGA-FAM11	MGB-FAM-G*TAAAAGGTGTA CTGTTGC-EDQ	0,200 µM

Estos resultados se muestran en la figura 4: para muestras tanto MRSA-positivas como LGA251-positivas las C_q para *ldh1* y *mecA* (*mecA*_{LGA251}) son similares.

15

EJEMPLO 8

Este ejemplo demuestra la interpretación de resultados para un método y sistema informático descrito en el presente documento usando la funcionalidad "condicional" de Excel para muestras de frotis nasal procesadas usando extracción bioMerieux EasyMag y un instrumento de PCR en tiempo real Applied Biosystems ® 7500 Fast Dx.

El Ct (ciclo umbral, también citado como C_q) se define como el número de ciclos necesarios para que la señal fluorescente cruce el umbral (es decir, que supere el nivel de fondo). El ciclo umbral de SA (*ldh1*) se define como C_{T1} , el ciclo umbral de *mecA* se define como C_{T2} , y el umbral de control CI se define como C_T .

Las situaciones 1-5 definidas a continuación demuestran los valores de Ct seleccionados y su resultado asignado.

Situación 1: SI $C_{T1} > 35,0$ Y $C_{T2} > 35,0$ Y $CI C_T < 34,0$, entonces el resultado es "MRSA-negativo/SA-negativo".

Situación 2: SI $C_{T1} > 35,0$ Y $C_{T2} > 35,0$ Y $CI C_T > 34,0$, entonces el resultado es "inválido".

Situación 3: SI $C_{T1} < 35,0$ Y $C_{T2} < 35,0$ Y $|C_{T1} - C_{T2}| < 2$, entonces el resultado es "MRSA-positivo".

Situación 4: SI $C_{T1} < 35,0$, Y $|C_{T1} - C_{T2}| > 2$, entonces el resultado es "MRSA-negativo/SA-positivo".

Situación 5: SI $C_{T1} > 35,0$ Y $C_{T2} < 35,0$, entonces el resultado es "MRSA-negativo/SA-negativo".

La tabla 10 a continuación muestra datos de muestras clínicas recogidas en forma de Ct recogidos en las columnas B, C, y D. Los resúmenes de situación después de la tabla 10 muestran ejemplos de las llamadas generadas por las funciones "condicionales" de Excel usando resultados de muestras clínicas seleccionados representativos de cuatro de las situaciones expuestas anteriormente. E2, E7, E20, y E4 se refieren a los números de células correspondientes a llamadas de muestra mostradas en la columna E.

Tabla 10

	A	B	C	D	E
1	n.º de ID de muestra	CI	<i>ldh1</i>	<i>mecA</i>	Prueba de MRSA/SA ELITe MGB (efectuado mediante Epoch) (Algorithm)
2	1	30,0174	50	37,7872	NEG
3	2	30,1315	50	38,3186	NEG
4	3	30,009	37,8131	33,0587	NEG
5	4	30,0331	38,3301	38,3669	NEG
6	5	30,1328	50	31,525	NEG
7	6	30,2983	23,7551	24,5647	MRSA
8	7	30,0692	50	36,3243	NEG
9	8	30,1117	35,5751	35,7861	NEG
10	9	30,1551	50	32,1061	NEG
11	10	30,1809	50	28,3299	NEG
12	11	30,1308	26,5344	27,1298	MRSA
13	12	29,9252	50	33,0466	NEG
14	13	30,0645	35,4711	33,3906	NEG
15	14	29,9879	50	50	NEG
16	15	31,1728	37,0959	36,048	NEG
17	16	30,3026	50	36,0029	NEG
18	17	30,6207	50	50	NEG
19	18	30,3318	50	30,5635	NEG
20	19	30,246	25,8525	28,7516	SA

Situación 1:

E2=IF(AND(C2<=35.05,ABS(C2-D2)<2,D2<=35.05),"MRSA",IF(AND(C2<=35.05,ABS(C2-D2)>=2),"SA","NEG"))
 Resultado de la llamada: "MRSA-Negativo/SA-Negativo"

5

Situación 3:

E7=IF(AND(C7<=35.05,ABS(C7-D7)<2,D7<=35.05),"MRSA",IF(AND(C7<=35.05,ABS(C7-D7)>=2),"SA","NEG"))
 Resultado de la llamada: "MRSA-Positivo"

10

Situación 4:

E20=IF(AND(C20<=35.05,ABS(C20-D20)<2,D20<=35.05),"MRSA",IF(AND(C20<=35.05,ABS(C20-D20)>=2),"SA",
 "NEG")) Resultado de la llamada: "MRSA-Negativo/SA-Positivo"

15

Situación 5:

E4 = IF(AND(C4<=35.05,ABS(C4-D4)<2,D4<=35.05),"MRSA",IF(AND(C4<=35.05,ABS(C4-D4)>=2),"SA","NEG"))
 Resultado de la llamada: "MRSA-Negativo/SA-Negativo"

20

Cabe destacar que no se proporciona un ejemplo de la situación 2 debido a la ausencia de un resultado inválido en la tabla 10.

REFERENCIAS

25

Documentos de Patente de Estados Unidos

Patentes de Estados Unidos n.º 3.194.805; 3.128.179; 3.996.345; 4.351.760; 4.683.195; 4.683.202; 4.965.188; 5.187.288; 5.188.934; 5.227.487; 5.248.782; 5.304.645; 5.433.896; 5.442.045; 5.492.806; 5.525.464; 5.556.752; 5.556.959; 5.583.236; 5.808.044; 5.852.191; 5.986.086; 5.994.056; 6.020.481; 6.127.121; 6.156.507; 6.162.931; 6.171.785; 6.180.295; 6.221.604; 6.569.627; 6.727.356; 6.790.945; 6.946.267; 6.949.367; 7.348.146; 7.671.218; 7.767.834; 7.838.221; documento RE 38.416;

30

Publicación de patente estadounidense con número 2005/0118623.

35

Documentos de Patente Internacional

Publicación Internacional de Patente n.º WO 03/023357, WO 02/062816, WO 92/10588 y WO 96/17957.

40

Patentes EP n.º 1408366, 1314734

Otras publicaciones

Ausubel, et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons (1987, 1988, 1989, 1990, 1991, 1992, 1993, 1994, 1995, 1996).

45

Bengtsson et al., Nucl. Acids Res., 31: e45 (2003)

Blanc et al., J. Clin. Microbiol., 49: 722-724 (2011)

Bolli et al., Nucleic Acids Res., 24:4660-4667 (1996)

Boucher et al., CID., 51 (Suplemento 2): S183S197 (2010)

50

Brown et al., Pharmacoconomics, 28: 567-575 (2010)

Chen et al., Nucleic Acids Res., 23:2661-2668 (1995)

Dieffenbach et al. (eds.), PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2003)

Eckstein (ed.), OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES: A PRACTICAL APPROACH, IRL Press (1991)

Fieser y Fieser, REAGENTS FOR ORGANIC SYNTHESIS, Volúmenes 1 a 17, Wiley, EE.UU. (1995)

55

Gait (ed.), OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS: A PRACTICAL APPROACH, IRL Press (1984)

Geiger et al., Nature 359:859-861 (1992)

Gemmel et al., J. Antimicrob. Chemother., 57: 589-608 (2006)

Hartman y Tomasz, J. Bacteriol., 158: 513-516 (1984)

60

Haugland et al., Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Sexta Ed., Molecular Probes, Eugene, Ore. (1996)

Hiramatsu et al., Int. J. Me. Microbiol., 292:67-74 (2002)

Hirschberg et al., Biochemistry 37:10381-10385 (1998)

Huletsky et al., J. Clin. Microbiol., 42: 1875-1884 (2004)

65

Innis et al., eds, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, 1990 Kolman et al., BMC Res. Notes, 3; 110 (2010)

Krasoviskii y Bolotin, Organic Luminescent Materials, VCH Publishers, NY. (1988)

- March et al., *ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY - Reactions, Mechanisms and Structures*, 4^a ed., John Wiley & Sons, Nueva York, NY (1992)
- McPherson et al., *PCR Basics*, 2000
- Mullis et al., *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 51 Pt 1:263-273 (1986)
- 5 Nielsen et al., *Science*, 254:1497-1500 (1991)
- Palissa et al., *Z. Chem.*, 27:216 (1987)
- Richardson et al., *Science*, 319: 1672 (2008)
- Rossney et al., *J. Clin. Microbiol.*, 46:3285-3290 (2008)
- Sambrook, Fritsch y Maniatis, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)
- 10 Sherlock et al., *Clin. Microbiol. Infect.* 16:955-959 (2010)
- Singh et al., *Chem. Comm.*, 455-456 (1998)
- Smith et al., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*:1195-1204 (1993)
- Stevenson J et al., *J Clin Microbiol.*, 43: 2391-8 (2005)
- 15 Warren et al., *J. Clin Microbiol.*, 42: 5578-5581 (2004)
- Wengel, *Acc. Chem. Res.*, 32:301-310 (1998)
- Whitaker, et al., *Anal. Biochem.* 207:267-279 (1992)
- Wittwer et al. (eds.), *Rapid Cycle Real-time PCR Methods and Applications: Quantification*, Springer-Verlag (2004)
- Wong et al. *J. Clin. Microbiol.*, 48: 3525-3531 (2010)
- 20 Zolliger, *Color Chemistry*, 2^a edición, VCH Publishers, NY. (1991)

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar un *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina ("MRSA") en una muestra que contiene ácidos nucleicos que comprende:
- 5 amplificar los ácidos nucleicos en la muestra; y
detectar en la muestra ácidos nucleicos que comprenden los genes *mecA*, *ldh1* y *mecA*_{LGA251} amplificados, en el que la presencia de los genes *mecA* y *ldh1* amplificados a una relación de aproximadamente 1:1 o los genes *mecA*_{LGA251} y *ldh1* a una relación de aproximadamente 1:1 indica la presencia de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra que comprende los genes *mecA*, *ldh1* y *mecA*_{LGA251} amplificados se pone en contacto con un primer cebador que tiene la SEQ ID NO: 20 y un segundo cebador que tiene la SEQ ID NO: 21.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, en el que los genes *mecA* y *ldh1* amplificados se detectan mediante cebadores etiquetados específicos de *mecA* o cebadores etiquetados específicos de *ldh1*.
4. El método de la reivindicación 3, en el que los cebadores son cebadores generadores de fluorescencia.
- 20 5. El método de la reivindicación 1, que además comprende la etapa de detectar ácidos nucleicos en la muestra que comprenden al menos un sitio de integración o una región de puente de SCC*mec*.
6. Un procedimiento para detectar, en una muestra, ácidos nucleicos de *Staphylococcus aureus* ("SA"), *Staphylococcus aureus* LGA251 resistente a meticilina ("LGA251") y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina ("MRSA"), usando la detección combinada de los genes *ldh1*, *mecA*_{LGA251} y *mecA* que comprende:
- 25 (a) poner en contacto la muestra con un primer cebador colgante y un segundo cebador colgante que tiene la fórmula:
- 30 5'-(X)_n Y-3' (I),
- en el que X representa una porción 5' de los cebadores colgantes que no es complementaria al gen *ldh1*, n es 1, Y representa una porción 3' de los cebadores colgantes que es complementaria al gen *ldh1*, y X tiene aproximadamente 3-30 nucleótidos de longitud;
- 35 (b) poner en contacto la muestra después de la etapa (a) con un tercer cebador colgante y un cuarto cebador colgante que tienen la fórmula:
- 40 5'-(X)_n Y'-3' (I),
- en la que X representa una porción 5' de los cebadores colgantes que no es complementaria al gen *mecA*, n es 1, Y' representa una porción 3' de los cebadores colgantes que es complementaria al gen *mecA* y X tiene aproximadamente 3-30 nucleótidos de longitud;
- 45 (c) poner en contacto la muestra después de la etapa (b) con un quinto cebador colgante y un sexto cebador colgante que tienen la fórmula:
- 50 5'-(X)_n Y'-3' (I),
- en la que X representa una porción 5' de los cebadores colgantes que no es complementaria al gen *mecA*_{LGA251}, n es 1, Y' representa una porción 3' de los cebadores colgantes que es complementaria al gen *mecA*_{LGA251} y X tiene aproximadamente 3-30 nucleótidos de longitud;
- (d) incubar la muestra después de las etapas (a), (b) y (c) en condiciones suficientes para amplificar los genes *ldh1*, *mecA* y *mecA*_{LGA251}; y
- (e) detectar los genes *ldh1*, *mecA* y *mecA*_{LGA251} en la muestra.

Figura 1

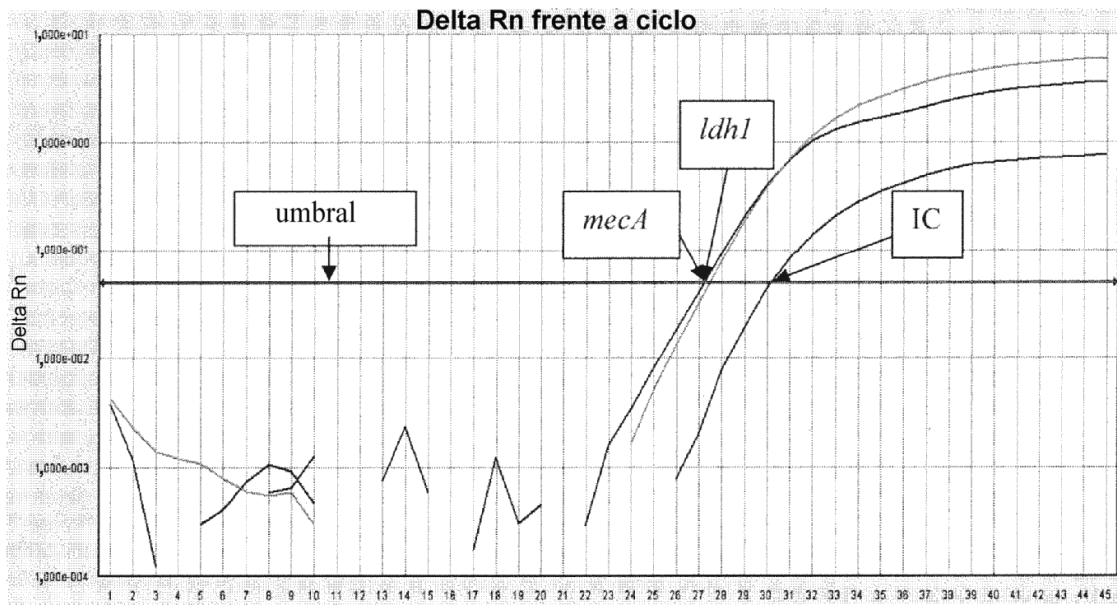


Figura 2

Delta Rn frente a ciclo

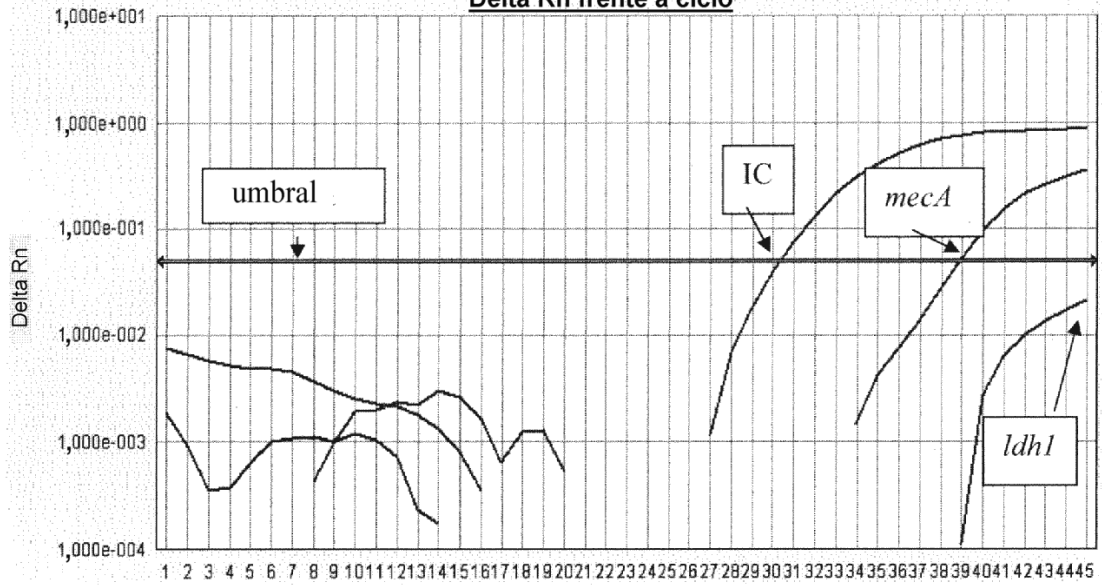


Figura 3

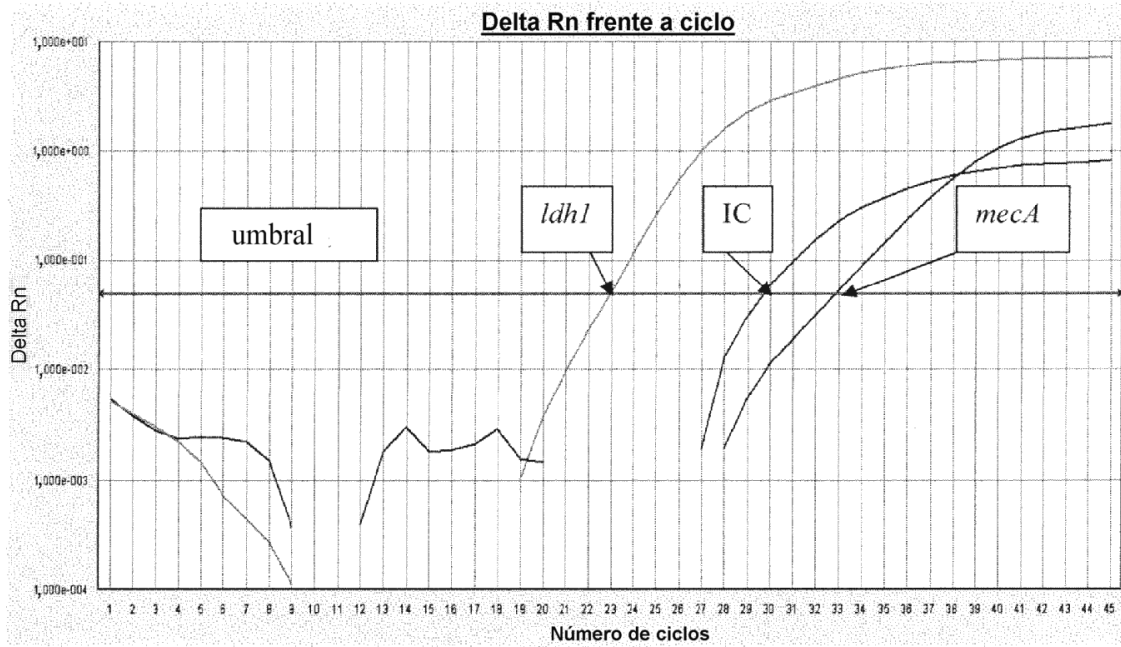


Figura 4

