

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 572 930**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2012 E 12726357 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2714929**

54 Título: **Composiciones y métodos para la detección de Staphylococcus aureus**

30 Prioridad:

26.05.2011 US 201113116975

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

03.06.2016

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

JOHNSON, JENNY, A.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 572 930 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

Composiciones y métodos para la detección de *Staphylococcus aureus*

5 Campo de la invención

La presente invención está relacionada con el área del diagnóstico microbiológico, y más concretamente, con la detección de *Staphylococcus aureus*.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El *Staphylococcus aureus* ("S. aureus" o "SA") es una bacteria Gram-positiva anaerobia facultativa, cuyo reservorio natural incluye la piel humana y la nariz, y que también puede habitar en las heridas. La mayoría de las personas que son portadoras de S. aureus no muestran signos de infección; sin embargo, S. aureus puede convertirse en invasivo y causar infecciones en el cuerpo si hay brechas en las barreras habituales. S. aureus puede causar una serie de enfermedades que van desde infecciones menores de la piel como el acné, forúnculos y abscesos, a enfermedades graves como la neumonía, meningitis y sepsis. Tejidos distintos de la piel y la nariz pueden infectarse cuando las barreras están alteradas, por ejemplo, la piel o la mucosa de revestimiento, lo que conduce a forúnculos y carbuncos. Las infecciones por S. aureus pueden transmitirse entre personas a través del contacto de la piel de una persona infectada o por contacto con los objetos usados por una persona infectada.

El S. aureus posee una notable capacidad para desarrollar resistencia a los principales antibióticos, incluyendo las penicilinas (metilina, oxacilina, cloxacilina y flucloxacilina), los que le ha valido la etiqueta de "superbacteria". El S. aureus resistente a la metilina (MRSA) es una bacteria que se ha vuelto resistente a las penicilinas, y es responsable de varias infecciones humanas que son difíciles de tratar. El MRSA también se conoce como S. aureus resistente a la oxacilina (ORSA) y S. aureus multiresistente, mientras que las cepas de S. aureus no resistentes a la metilina se denominan a veces S. aureus sensibles a la metilina (MSSA).

El diagnóstico de la infección por S.aureus puede incluir una evaluación médica de los síntomas de un paciente, lo que normalmente no es definitivo porque la infección puede haber sido causada por otras bacterias, como *Streptococcus pyogenes*. Los análisis de sangre, análisis de orina, y a veces los rayos X, se pueden utilizar para diagnosticar las infecciones por S. aureus. Un diagnóstico definitivo puede requerir una prueba de cultivo, que sólo se obtiene tras muchas horas o días, lo que retrasa el tratamiento del paciente. Se han desarrollado ciertos ensayos de PCR que están diseñados para la detección específica del MRSA debido a su mayor importancia clínica en las enfermedades adquiridas en los hospitales y la comunidad. La WO 2005/108579 describe un método para la detección de S. aureus por PCR en tiempo real utilizando cebadores y sondas para el gen FemB. La literatura indica, sin embargo, que también existe una necesidad clínica significativa de detectar el S .aureus sea o no resistente a los antibióticos.

40 Resumen de la invención

La presente invención está relacionada con los métodos para la detección rápida de la presencia o ausencia de S. aureus en una muestra biológica o no biológica, como se define en las reivindicaciones adjuntas. La presente invención incluye métodos de detección que comprenden realizar al menos un paso cíclica, que incluye una fase de amplificación y una fase de hibridación. Además, la presente invención se refiere a los cebadores, sondas y equipos que están diseñados para la detección de S. aureus, como se define en las reivindicaciones adjuntas. El gen diana de los métodos de la presente invención para la detección de S. aureus es un gen de la enzima del polisacárido capsular (CPE). Por ejemplo, se eligió el gen diana CPE cap5N porque se determinó que era específico de S. aureus y no está presente en otras especies de estafilococos, y también demostró una buena homología dentro de S. aureus. El gen CPE tiene una función no confirmada como enzima reductasa en la vía de producción del polisacárido capsular de S. aureus (O'Riordan et al, 2004, Clin Microbiol Rev. 17 (1):218-234).

Se describen oligonucleótidos que comprenden o consisten en una secuencia de nucleótidos seleccionada de las Id. de Sec. N°: 2-4, 6, 8-10, 12, y 14-34 o la cadena complementaria de la misma. En este documento, el oligonucleótido tiene 100 o menos nucleótidos, más preferiblemente 40 o menos nucleótidos. En otro aspecto, los oligonucleótidos descritos incluyen un ácido nucleico que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos un 85%, 90% o 95%, etc.) a una de Id. de Sec. N°: 2-4, 6, 8-10, 12, y 14-34, o la cadena complementaria de la misma, cuyo oligonucleótido tiene 100 o menos nucleótidos. En este documento, la identidad de secuencia es preferiblemente 90%, más preferiblemente 95%. Generalmente, estos oligonucleótidos pueden ser ácidos nucleicos de cebadores, sondas de ácidos nucleicos, o similares. También se describe, que los oligonucleótidos tienen 40 nucleótidos o menos (por ejemplo, 35 o menos nucleótidos, 30 o menos nucleótidos, etc.). También se describe, que los oligonucleótidos comprenden al menos un nucleótido modificado, por ejemplo, para alterar la estabilidad de hibridación del ácido nucleico con respecto a los nucleótidos no modificados. Opcionalmente, los oligonucleótidos comprenden al menos un marcador y/o al menos una porción bloqueadora. También se describe, que los oligonucleótidos incluyen al menos una variación modificada de manera conservadora.

En un aspecto, la presente invención proporciona un conjunto de oligonucleótidos que comprenden un primer oligonucleótido que tiene 40 nucleótidos o menos que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 2 y 17-20, o la cadena complementaria de la misma; y un segundo oligonucleótido que tiene 40 nucleótidos o menos que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 3, 6 y 25-26, o la cadena complementaria de la misma; o un primer oligonucleótido que tiene 40 nucleótidos o menos que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 8, 12 y 14 a 16, o la cadena complementaria de la misma; y un segundo oligonucleótido que tiene 40 nucleótidos o menos que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 9 y 21 a 24, o la cadena complementaria de la misma. En otra realización, el conjunto de oligonucleótidos comprende además un tercer oligonucleótido marcado de forma detectable que tiene 40 nucleótidos o menos que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 4, 27 a 29 y 32 a 34, o la cadena complementaria de la misma si dicho primer oligonucleótido comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 2 y 17-20, o la cadena complementaria de la misma y dicho segundo oligonucleótido comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 3, 6 y 25 a 26, o la cadena complementaria de la misma; o una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 10, 30 y 31, o la cadena complementaria de la misma si dicho primer oligonucleótido comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 8, 12 y 14 a 16, o la cadena complementaria de la misma y dicho segundo oligonucleótido comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 9 y 21 a 24, o la cadena complementaria de la misma.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para detectar SA en una muestra, el método comprende realizar un paso de amplificación que comprende poner en contacto la muestra con un conjunto de cebadores de SA para producir un producto de amplificación si SA está presente en la muestra; la realización de un paso de hibridación comprende poner en contacto el producto de amplificación con una o más sondas de SA detectables; y detectar la presencia o ausencia del producto amplificado, en el que la presencia del producto amplificado es indicativa de la presencia de SA en la muestra y en el que la ausencia del producto amplificado es indicativa de la ausencia de SA en la muestra, en el que el conjunto de cebadores de SA comprende un primer cebador de oligonucleótidos que tiene 40 nucleótidos o menos que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 2 y 17-20, o la cadena complementaria de la misma y un segundo cebador de oligonucleótidos que tiene 40 nucleótidos o menos que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 3, 6 y 25 a 26, o la cadena complementaria de la misma y en el que una o más sondas de SA detectables tienen 40 nucleótidos o menos que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 4, 27 a 29 y 32 a 34, o la cadena complementaria de la misma; o en el que el conjunto de cebadores de SA comprende un primer cebador oligonucleótido que tiene 40 nucleótidos o menos que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 8, 12 y 14 a 16, o la cadena complementaria de la misma y un segundo cebador oligonucleótido que tiene 40 nucleótidos o menos que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 9 y 21 a 24, o la cadena complementaria de la misma y en el que una o más sondas detectables de SA comprenden una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 10, 30 y 31, o la cadena complementaria de la misma. En algunas realizaciones, un paso de hibridación incluye poner en contacto el producto de amplificación con una sonda que está marcada con una porción fluorescente donadora y una porción aceptora fluorescente correspondiente. El método incluye además detectar la presencia o ausencia de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) entre la mitad fluorescente donante y la porción aceptora fluorescente de la sonda. La presencia o ausencia de fluorescencia es indicativa de la presencia o ausencia de SA en la muestra. En un aspecto, la amplificación puede emplear una enzima polimerasa que tiene actividad exonucleasa 5' a 3'. En algunas realizaciones, la primera y segunda porción fluorescente no puede estar a más de 5 nucleótidos de distancia entre ellos dentro de la longitud de la sonda. En otro aspecto, la sonda de SA incluye una secuencia de ácido nucleico que permite la formación de estructura secundaria. Tal formación de estructura secundaria generalmente resulta en una proximidad espacial entre la primera y segunda porción fluorescente. De acuerdo con este método, la segunda porción fluorescente de la sonda puede ser un bloqueador. En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un equipo para detectar un ácido nucleico de SA. El equipo puede incluir un primer oligonucleótido que tiene 40 nucleótidos o menos que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 2 y 17-20, o la cadena complementaria de la misma; un segundo oligonucleótido que tiene 40 nucleótidos o menos que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 3, 6, y 25-26, o la cadena complementaria de la misma; y un tercer oligonucleótido marcado de forma detectable que tiene 40 nucleótidos o menos que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 4, 27-29, y 32-34, o la cadena complementaria de la misma; o un primer oligonucleótido que tiene 40 nucleótidos o menos que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 8, 12, y 14 a 16, o la cadena complementaria de la misma; un segundo oligonucleótido que tiene 40 nucleótidos o menos que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 9 y 21 a 24, o la cadena complementaria de la misma; y un tercer oligonucleótido marcado de forma detectable que tiene 40 nucleótidos o menos que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 10, 30, y 31, o la cadena complementaria de la misma. En un aspecto, el equipo puede incluir sondas ya marcadas con porciones fluorescentes donadoras y sus correspondientes aceptoras, o puede incluir porciones de fluoróforos para el marcaje de las sondas. En ciertas realizaciones, el grupo funcional fluorescente aceptor puede ser un bloqueador. El equipo también puede incluir nucleósidos trifosfato, una polimerasa de ácido nucleico, y/o tampones necesarios para la

función de la polimerasa de ácido nucleico. El equipo también puede incluir un prospecto e instrucciones para utilizar los cebadores, sondas, y grupos funcionales fluorofóricos para detectar la presencia o ausencia de SA en una muestra. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

5 Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica o ensayo de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitantes. En caso de conflicto, permanecerá la presente especificación, incluyendo las definiciones.

10 Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y en la siguiente descripción. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de los dibujos y la descripción detallada y de las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

15 La Fig. 1 muestra la secuencia de gen de referencia del gen de la enzima de polisacárido capsular cap5N de *Staphylococcus aureus*.

20 Las Fig. 2A-2D muestran las secuencias de amplificación para *Staphylococcus aureus*, incluyendo cada una el cebador corriente arriba (└), el cebador corriente abajo (┘), y la sonda (·).

Las Fig. 3A-3D muestran curvas de amplificación para la detección de *Staphylococcus aureus*.

Descripción detallada de la invención

25 Se describe en el presente documento un ensayo en tiempo real para la detección de *S. aureus* en una muestra. La presente invención proporciona métodos para la detección de *S. aureus*, sea o no resistente a la meticilina. Se proporcionan cebadores y sondas para la detección de *S. aureus*, así como artículos de fabricación o equipos que contienen tales cebadores y sondas. El aumento de la sensibilidad de PCR en tiempo real para la detección de *S. aureus* en comparación con otros métodos, así como las características mejoradas de PCR a tiempo real incluyendo la contención de la muestra y detección en tiempo real del producto amplificado, hacen factible la implementación de esta tecnología para el diagnóstico rutinario en el laboratorio clínico de infecciones de *S. aureus*.

35 Los métodos incluyen la realización de al menos un paso de ciclado que incluye la amplificación de una porción de una molécula de ácido nucleico CPE de SA de una muestra utilizando un par de cebadores de CPE. "Cebadores de CPE" como se utiliza aquí se refiere a oligonucleótidos cebadores que se reasocian específicamente a secuencias de ácido nucleico que codifican CPE, e inician la síntesis de los mismos en condiciones apropiadas. Cada uno de los cebadores de CPE hibrida con un objetivo dentro o adyacente a una molécula de ácido nucleico de CPE tal que al menos una porción de cada producto de amplificación contiene la secuencia de ácido nucleico correspondiente a CPE. El producto de amplificación de CPE se produce siempre que el ácido nucleico de CPE está presente en la muestra, por tanto, la presencia del producto de amplificación de CPE es indicativo de la presencia de SA en la muestra. El producto de amplificación debe contener las secuencias de ácido nucleico que son complementarias a una o más sondas detectables de CPE. Cada etapa de ciclado incluye un paso de amplificación, un paso de hibridación, y un paso de detección, en el que se pone en contacto la muestra con las una o más sondas detectables de CPE para la detección de la presencia o ausencia de SA en la muestra.

45 Tal como se utiliza aquí, el término "amplificación" se refiere al proceso de síntesis de moléculas de ácido nucleico que son complementarias a una o ambas cadenas de una molécula molde de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico de CPE de SA). La amplificación de una molécula de ácido nucleico incluye típicamente la desnaturalización del molde de ácido nucleico, la hibridación de los cebadores al molde de ácido nucleico a una temperatura que está por debajo de las temperaturas de fusión de los cebadores, y la extensión enzimática de los cebadores para generar un producto de amplificación. La amplificación requiere típicamente la presencia de trifosfatos de desoxirribonucleósidos, una enzima polimerasa de DNA (por ejemplo, Platinum® Taq) y un tampón apropiado y/o cofactores para la actividad óptima de la enzima polimerasa (por ejemplo, MgCl₂ y/o KCl).

55 El término "cebador" se usa en el presente documento como es conocido por los expertos en la técnica y se refiere a compuestos oligómeros, principalmente a los oligonucleótidos, y también a oligonucleótidos modificados que son capaces de la síntesis de "cebar" la síntesis de DNA mediante una polimerasa de DNA dependiente de molde, es decir, el extremo 3' del oligonucleótido, proporciona por ejemplo, un grupo 3'-OH libre donde pueden unirse "nucleótidos" adicionales mediante una polimerasa de DNA dependiente del molde proporcionando un enlace fosfodiéster de 3' a 5' mediante el cual se utilizan desoxinucleósidos trifosfato y por el cual se libera pirofosfato. Por lo tanto, no existe - excepto, posiblemente, para la función prevista - ninguna diferencia fundamental entre un "cebador", un "oligonucleótido" o una "sonda", de acuerdo con la invención.

El término "hibridación" se refiere a la hibridación de una o más sondas a un producto de amplificación. Las condiciones de hibridación incluyen típicamente una temperatura que está por debajo de la temperatura de fusión de las sondas pero que evita la hibridación no específica de las sondas.

5 El término "actividad exonucleasa 5' a 3'" se refiere a una actividad de una polimerasa de ácido nucleico, típicamente asociado con la síntesis de la cadena de ácido nucleico, en el que los nucleótidos son eliminados del extremo 5' de la hebra de ácido nucleico.

10 El término "polimerasa termoestable" se refiere a una enzima polimerasa que es estable al calor, es decir, la enzima cataliza la formación de productos de extensión de cebador complementario a un molde y no se desnaturaliza irreversiblemente cuando se somete a temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para efectuar la desnaturalización de ácidos nucleicos de doble cadena del molde. Generalmente, la síntesis se inicia en el extremo 3' de cada cebador y continua en la dirección 5' a 3' a lo largo de la cadena molde. Las polimerasas termoestables han sido aisladas de *Thermus flavus*, *T. ruber*, *T. thermophilus*, *T. aquaticus*, *T. lacteus*, *T. rubens*, *Bacillus stearothermophilus*, y *Methanothermobacter feravidus*. No obstante, las polimerasas que no son termoestables también se pueden emplear en ensayos de PCR siempre que se reponga la enzima. El término "complemento de la misma" se refiere al ácido nucleico que posee la misma longitud, y es exactamente complementario a un ácido nucleico determinado.

20 El término "extensión" o "alargamiento" cuando se utiliza con respecto a los ácidos nucleicos se refiere a cuando se incorporan nucleótidos adicionales (u otras moléculas análogas) a los ácidos nucleicos. Por ejemplo, un ácido nucleico está extendido opcionalmente por un biocatalizador que incorpora los nucleótidos, tal como una polimerasa que añade típicamente nucleótidos en el extremo 3' terminal de un ácido nucleico.

25 Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad" en el contexto de dos o más secuencias de ácido nucleico, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de nucleótidos que son los mismos, cuando se compara y se alinean para una máxima correspondencia, por ejemplo, como se mide usando uno de los algoritmos de comparación de secuencias disponibles para el experto o mediante inspección visual. Ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia son los programas BLAST, que se describen en, por ejemplo, Altschul et al. (1990) "Basic local alignment search tool" *J. Mol. Biol.* 215: 403-410, Gish et al. (1993) "Identification of protein coding regions by database similarity search" *Nature Genet.* 3: 266-272, Madden et al. (1996) "Applications of network BLAST server" *Meth. Enzymol.* 266: 131-141, Altschul et al. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of proteína database search programs " *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, y Zhang et al. (1997) "PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation" *Genome Res.* 7: 649-656.

40 Un "nucleótido modificado" en el contexto de un oligonucleótido se refiere a una alteración en el que al menos un nucleótido de la secuencia de oligonucleótido se sustituye por un nucleótido diferente que proporciona una propiedad deseada al oligonucleótido. Ejemplos de nucleótidos modificados que pueden ser sustituidos en los oligonucleótidos descritos en este documento incluyen, por ejemplo, un C5-metil-dC, un C5-etil-dC, un C5-metil-dU, un C5-etil-dU, una 2,6-diaminopurina, un C5-propinil-dU, un C5-propinil-dA, un C7-propinil-dA, un C7-propinil-dG, un C5-propargilamino-dC, un C5-propargilamino-dU, un C7-propargilamino-dA, un C7-propargilamino-dG, una 7-deaza-2-deoxixantosa, un análogo de pirazolopirimidina, un pseudo-dU, un nitro pirrol, un nitro indol, 2'-0-metil Ribo-U, 2'-0-metil Ribo-C, un N4-etil-dC, un N6-metil-dA, y similares. Muchos otros nucleótidos modificados que pueden ser sustituidos en los oligonucleótidos de la invención se denominan en el presente documento o de otra manera son conocidos en la técnica. En ciertas realizaciones, las sustituciones de nucleótidos modificados modifican las temperaturas de fusión (T_m) de los oligonucleótidos en relación a las temperaturas de fusión de los oligonucleótidos no modificados. Para ilustrar aún más, ciertas sustituciones de nucleótidos modificados pueden reducir la amplificación inespecífica de ácidos nucleicos (por ejemplo, minimizando la formación de dímeros de cebadores o similares), puede aumentar la cantidad de un amplicón diana previsto, y/o similares, en algunas realizaciones de la invención. Ejemplos de estos tipos de modificaciones de ácidos nucleicos se describen en, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 6.001.611.

55 oligonucleótidos y ácidos nucleicos de *S. aureus*

60 La invención proporciona métodos para detectar SA mediante la amplificación de, por ejemplo, una porción del ácido nucleico del gen CPE de SA. Las secuencias de ácido nucleico a partir de SA están disponibles (véase, por ejemplo, GenBank N° de acceso NC_002745). Específicamente, los cebadores y sondas para amplificar y detectar moléculas de ácido nucleico de CPE de SA se proporcionan por la presente invención.

65 Para la detección de SA, se proporcionan cebadores y sondas para amplificar moléculas de ácido nucleico de CPE. Los ácidos nucleicos de CPE distintos de los ejemplificados en la presente memoria también se pueden utilizar para detectar SA en una muestra. Por ejemplo, puede determinarse la especificidad y/o sensibilidad de las variantes funcionales por los expertos en la técnica usando métodos de rutina. Las variantes funcionales representativas

pueden incluir, por ejemplo, una o más deleciones, inserciones y/o sustituciones en los ácidos nucleicos de CPE descritos en este documento.

Más específicamente, los oligonucleótidos de la presente invención incluyen cada uno un ácido nucleico con una secuencia seleccionada de Id. de Sec. N°: 2-4, 6, 8-10, 12, y 14-34, una variante sustancialmente idéntica de la misma en la que la variante tiene al menos, por ejemplo, un 80%, preferiblemente un 90%, o más preferiblemente un 95% de identidad de secuencia con una de las Id. de Sec. N°: 2-4, 6, 8-10, 12, y 14-34, o un complemento de Id. de Sec. N°: 2-4, 6, 8-10, 12, y 14-34 y la variante.

10 Tabla I: Cebadores corriente arriba

ID. de Sec. N°	Secuencia
2	5'- ACACCAATGAACCCTACGACC -3'
8	5'- GATAAGCTTATTGAACAAGGACATCAA -3'
12	5'- AAGATAAGCTTATTGAACAAGGACATC -3'
14	5'- AGGCGTACATGGATATATCGGTAA -3'
15	5'- GCTTATTGAACAAGGACATCAA -3'
16	5'- GATAAGCTTATTGAACAAGGACATC -3'
17	5'- ACACCAATGAACCCTACGAC -3'
18	5'- ACACCAATGAACCCTACGA -3'
19	5'- ACCAATGAACCCTACGACC -3'
20	5' - ATACACAAACACCAATGAACCCTAC -3'

Tabla II: Cebadores corriente abajo

ID. de Sec. N°	Secuencia
3	5'- TAATTGATCAATAAATGCTGTCAGA -3'
6	5'- GATCAATAAATGCTGTCAGATGTTTAA -3'
9	5'- CTTGAGGTGAATTGTTGTGAACC -3'
21	5'- TGCTTGAGGTGAATTGTTGTGAA -3'
22	5'- AGATAGCCTTGCTTGAGGTGAA -3'
23	5'- CTTGAGGTGAATTGTTGTGAA -3'
24	5'- TGAGGTGAATTGTTGTGAACC -3'
25	5'- CAATAAATGCTGTCAGATGTTTAA -3'
26	5'- TAATTGATCAATAAATGCTGTCA -3'

15 Tabla III: Sondas

ID. de Sec. N°	Secuencia
4	5'- TTGCCCAGGAAATTTCCAACGGTT -3'
10	5'- TTAGGAATCAATTATGGAAGTCGACCTCGT -3'
27	5'- TGGTGCACATTGCCCAGGAAATTT -3'
28	5'- CATTGCCCAGGAAATTTCCAACGGTT -3'
29	5'- CCCAGGAAATTTCCAACGGTT -3'
30	5'- CGAGGTCGACTTCCATAATTGATTCCCT -3'
31	5'- ACGAGGTCGACTTCCATAATTGATTCCCTAA -3'
32	5'- AAATTTCTGGGCAATGTGCACCA -3'
33	5'- AACCGTTGGAAATTTCTGGGCAATG -3'
34	5'- AACCGTTGGAAATITCTGGGCAA -3'

Tabla IV: Amplicones

ID. de Sec. N°	Secuencia
5	5'- ACACCAATGA ACCCTACGAC CAACTATGGT ATTTCCAAAA AGTTCGCTGA ACAAGCATT CAAGAATTGA TTAGTGATTC GTTTAAAGTA GCAATTGTGA GACCACCAAT GATTTATGGT GCACATTGCC CAGGAAATTT CCAACGGTTA ATGCAATTGT CAAAGCGATT GCCAATCATT CCAATATTA ACAATCAGCG CAGTGCATTA TATATTAAC ATCTGACAGC ATTTATTGAT CAATTA -3'

7	5'- ACACCAATGA ACCCTACGAC CAACTATGGT ATTTCCAAA AGTTCGCTGA ACAAGCATT CAAGAATTGA TTAGTGATTC GTTTAAAGTA GCAATTGTGA GACCACCAAT GATTTATGGT GCACATTGCC CAGGAAATTT CCAACGGTTA ATGCAATTGT CAAAGCGATT GCCAATCATT CCAATATTA ACAATCAGCG CAGTGCATTA TATATTAAC ATCTGACAGC ATTTATTGAT C -3'
11	5'- GATAAGCTTA TTGAACAAGG ACATCAAGTA GATCAAATTA ATGTTAGGAA TCAATTATGG AAGTCGACCT CGTTCAAAGA TTATGATGTT TTAATTCATA CAGCAGCTTT GGTTACAAC AATTCACCTC AAG -3'
13	5'- AAGATAAGCT TATTGAACAA GGACATCAAG TAGATCAAAT TAATGTTAGG AATCAATTAT GGAAGTCGAC CTCGTTCAA GATTATGATG TTTTAATTCA TACAGCAGCT TTGGTTCACA ACAATTCACC TCAAG -3'

En algunas realizaciones, un oligonucleótido que comprende o que consiste en un cebador corriente arriba de acuerdo con la Tabla I se combina con un oligonucleótido que comprende o que consiste en un cebador corriente abajo de acuerdo con la Tabla II para formar un conjunto de oligonucleótidos capaces de amplificar SA en condiciones adecuadas. En ciertas realizaciones, en el que se utiliza el complemento del oligonucleótido que comprende o que consiste en el cebador corriente arriba de acuerdo con la Tabla I, también se selecciona el complemento del oligonucleótido que comprende o que consiste en el cebador aguas abajo de acuerdo con la Tabla II para formar un conjunto de oligonucleótidos capaces de amplificar SA en condiciones adecuadas. En algunas realizaciones, el conjunto de oligonucleótidos comprende además un tercer oligonucleótido que comprende o que consiste en una sonda de acuerdo con la Tabla III.

En una realización de la invención, un conjunto particular de cebadores y sonda de CPE se utiliza con el fin de proporcionar la detección de SA en una muestra biológica sospechosa de contener SA. El conjunto de cebadores y la sonda puede comprender al menos un cebador y sonda específica para CPE que comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 2-4, 6, 8-10, 12 y 14- 34 o los complementos de las mismas.

En otra realización de la invención, el al menos un cebador y sonda específica para CPE comprende o consiste en una variante funcionalmente activa de cualquiera de los cebadores de Id. de Sec. N°: 2-4, 6, 8-10, 12, y 14-34. Una variante funcionalmente activa de cualquiera de los cebadores y/o sondas de Id. de Sec. N°: 2-4, 6, 8-10, 12, y 14-34 se pueden identificar mediante el uso de los cebadores y/o sondas en el método de la invención. Una variante funcionalmente activa de un cebador y/o sonda de cualquiera de las Id. de Sec. N°: 2-4, 6, 8-10, 12, y 14-34 se refiere a un cebador que proporciona una especificidad y sensibilidad similar o mayor en el método o equipo de la invención en comparación con la secuencia correspondiente de la Id. de Sec. N°: 2-4, 6, 8-10, 12, y 14-34.

La variante puede, por ejemplo, variar de la secuencia de Id. de Sec. N°: 2-4, 6, 8-10, 12, y 14-34 por adiciones de uno o más nucleótidos, deleciones o sustituciones tales como una o más adiciones, deleciones o sustituciones de nucleótidos en el extremo 5' y/o 3' de la correspondiente secuencia de Id. de Sec. N°: 2-4, 6, 8-10, 12, y 14-34. Como se ha detallado anteriormente, un cebador (y/o sonda) puede ser modificado químicamente, es decir, un cebador y/o sonda puede comprender un nucleótido modificado o un compuesto no nucleotídico. Una sonda (o un cebador) es entonces un oligonucleótido modificado. Los "nucleótidos modificados" (o "análogos de nucleótidos") difieren de un "nucleótido" natural por algunas modificaciones, pero aún constan de una base o compuesto similar a una base, un azúcar pentofuranosilo o un compuesto similar al azúcar pentofuranosilo, una porción de fosfato o una porción similar al fosfato, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, un "marcador" puede estar unido a la porción de la base de un "nucleótido" por el que se obtiene un "nucleótido modificado". Una base natural en un "nucleótido" también puede estar sustituida por, por ejemplo, una 7-desazapurina por la que se obtiene también un "nucleótido modificado". Los términos "nucleótido modificado" o "análogo de nucleótido" se usan indistintamente en la presente solicitud. Un "nucleósido modificado" (o "análogo de nucleósido") difiere de un nucleósido natural por alguna modificación en la forma como se describe anteriormente un "nucleótido modificado" (o un "análogo de nucleótido"). Las "variaciones modificadas de manera conservadora" de una secuencia de ácido nucleico particular se refiere a aquellos ácidos nucleicos, que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o, cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Un experto reconocerá que las sustituciones individuales, deleciones o adiciones que alteran, añaden o eliminan un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos (normalmente menos del 5%, más típicamente menos del 4%, 2% o 1%) en una secuencia codificada son "variaciones modificadas de manera conservadora", donde las alteraciones dan como resultado la delección de un aminoácido, la adición de un aminoácido, o la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar.

Los oligonucleótidos, que incluyen oligonucleótidos modificados y análogos de oligonucleótidos que amplifican una molécula de ácido nucleico que codifica SA, por ejemplo, los ácidos nucleicos que codifican porciones alternativas de CPE, se pueden diseñar utilizando, por ejemplo, un programa de ordenador tal como OLIGO (Molecular Biology Insights Inc., Cascade, Colo.). Las características importantes cuando se diseñan oligonucleótidos para ser utilizados como cebadores de amplificación incluyen, pero no se limitan a, un producto de amplificación de tamaño apropiado para facilitar la detección (por ejemplo, por electroforesis), temperaturas de fusión similares para los miembros de un par de cebadores, y la longitud de cada cebador (es decir, los cebadores deben ser lo suficientemente largos para hibridarse con especificidad de secuencia y para iniciar la síntesis pero no tan largos como para que se reduzca la fidelidad durante la síntesis de oligonucleótidos). Típicamente, los cebadores de oligonucleótidos tienen de 8 a 50 nucleótidos de longitud (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, o 50 nucleótidos de longitud).

Además de un conjunto de cebadores, los métodos de la invención puede usar una o más sondas con el fin de detectar la presencia o ausencia de SA. El término "sonda" se refiere a ácidos nucleicos producidos sintéticamente o biológicamente (DNA o RNA), que por su diseño o selección, contienen secuencias de nucleótidos específicas que les permiten hibridar en estrictas condiciones predeterminadas definidos específicamente (es decir, preferentemente) a "ácidos nucleicos diana"; en el presente caso a un ácido nucleico CPE de SA (diana). Una "sonda" se puede referir como una "sonda de detección", que significa que detecta el ácido nucleico diana.

De acuerdo con la invención, la sonda de CPE puede marcarse con al menos un marcador fluorescente. En una realización, la sonda de CPE se puede marcar con una porción donadora fluorescente, por ejemplo, un colorante fluorescente, y una porción aceptora fluorescente correspondiente, por ejemplo, un bloqueador.

En una realización de la presente invención, al menos una sonda comprende o consiste en una porción fluorescente y una secuencia de ácido nucleico seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 4, 10, y 27-34 (mostrado sin el marcador).

El diseño de oligonucleótidos para ser utilizados como sondas de hibridación puede llevarse a cabo de una manera similar al diseño de cebadores. Las realizaciones de la presente invención pueden utilizar una sola sonda o un par de sondas para la detección del producto de amplificación. Dependiendo de la realización, la(s) sonda(s) utilizada(s) puede comprender al menos un marcador y/o al menos una porción bloqueadora. Al igual que con los cebadores, las sondas por lo general tienen temperaturas de fusión similares, y la longitud de cada sonda debe ser suficiente para que ocurra una hibridación específica de secuencia pero no tan larga como para que la fidelidad se reduzca durante la síntesis. Típicamente, las sondas de oligonucleótidos son de 15 a 30 (por ejemplo, 16, 18, 20, 21, 22, 23, 24, ó 25) nucleótidos de longitud.

Las construcciones se describen incluyendo vectores que contienen una molécula de ácido nucleico de CPE de SA (por ejemplo, Id. de Sec. N°: 2-4, 6, 8-10, 12, y 14-34). Estas construcciones se pueden utilizar, por ejemplo, como moléculas de ácido nucleico control de molde. Los vectores adecuados para uso en la presente invención están comercialmente disponibles y/o producidos por métodos de tecnología de ácido nucleico recombinante de rutina en la técnica. Las moléculas de ácido nucleico de CPE de SA se pueden obtener, por ejemplo, mediante síntesis química, clonación directa a partir de SA, o mediante amplificación por PCR.

Las construcciones adecuadas para utilizar en los métodos de la invención típicamente incluyen, además de moléculas de ácido nucleico de CPE de SA (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que contiene una o más secuencias de Id. de Sec. N°: 2-4, 6, 8-10, 12, y 14-34), secuencias que codifican un marcador seleccionable (por ejemplo, un gen de resistencia a los antibióticos) para la selección de construcciones y/o transformantes deseados, y un origen de replicación. La elección de sistemas de vectores usualmente depende de varios factores, que incluye, pero no se limita a, la elección de células huésped, eficiencia de replicación, capacidad de selección, la inducibilidad, y la facilidad de recuperación.

Estas construcciones que contienen moléculas de ácidos nucleicos de CPE se pueden propagar en una célula huésped. Como se usa en este documento, el término célula huésped se entiende que incluye procariontes y eucariotas, tales como células de levadura, vegetales y animales. Los huéspedes procariontes pueden incluir *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, y *Bacillus subtilis*. Los huéspedes eucariotas incluyen levaduras tales como *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Pichia pastoris*, células de mamífero tales como células COS o células de ovario de hámster chino (CHO), células de insectos y células de plantas tales como *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum*. Una construcción puede introducirse en una célula huésped utilizando cualquiera de las técnicas comúnmente conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, precipitación con fosfato de calcio, electroporación, choque térmico, lipofección, microinyección, y transferencia de ácido nucleico mediada por virus son métodos comunes para introducir ácidos nucleicos en células huésped. Además, el DNA desnudo se puede entregar directamente a las células (véase, por ejemplo, Pat. de EE.UU. N° 5.580.859 y 5.589.466).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Las patentes de EE.UU. N° 4.683.202, 4.683.195, 4.800.159, y 4.965.188 describen técnicas de PCR convencionales. La PCR emplea típicamente dos cebadores de oligonucleótidos que se unen a un molde de ácido nucleico seleccionado (por ejemplo, DNA o RNA). Los cebadores útiles en la presente invención incluyen oligonucleótidos capaces de actuar como un punto de iniciación de la síntesis de ácidos nucleicos dentro de secuencias de ácido nucleico de CPE de SA (por ejemplo, Id. de Sec. N°: 2, 3, 6, 8, 9, 12, y 14-27). Un cebador se puede purificar a partir de una digestión de restricción por métodos convencionales, o puede ser producido sintéticamente. El cebador es preferentemente de cadena sencilla para una máxima eficiencia en la amplificación, pero el cebador puede ser de doble cadena. Los cebadores de doble cadena se desnaturalizan primero, es decir, se tratan para separar las hebras. Un método de desnaturalización de ácidos nucleicos de doble cadena es por calentamiento.

Si el ácido nucleico molde es de doble cadena, es necesario separar las dos hebras antes de que pueda ser utilizado como un molde de PCR. La separación de las cadenas puede llevarse a cabo por cualquier método de desnaturalización adecuado, incluyendo métodos físicos, químicos o enzimáticos. Un método de separación de las cadenas de ácido nucleico implica calentar el ácido nucleico hasta que se desnaturaliza predominantemente (por ejemplo, mas de un 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% desnaturalizado). Las condiciones de calentamiento necesarias para la desnaturalización del ácido nucleico molde dependerán, por ejemplo, de la concentración de sal en el tampón y la composición de nucleótidos y de la longitud de los ácidos nucleicos a desnaturalizar, pero típicamente está en el rango de aproximadamente 90 °C a aproximadamente 105 °C durante un tiempo dependiendo de las características de la reacción tales como la temperatura y la longitud del ácido nucleico. La desnaturalización se realiza típicamente durante aproximadamente 30 seg. a 4 min. (por ejemplo, 1 min. a 2 min. 30 seg., o 1,5 min.).

Si el ácido nucleico molde de doble cadena se desnaturaliza mediante calor, se deja que la mezcla de reacción se enfríe a una temperatura que promueve la hibridación de cada cebador con su secuencia diana en el ácido nucleico de CPE. La temperatura para la hibridación normalmente está entre aproximadamente 35 °C a aproximadamente 65 °C (por ejemplo, entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 60 °C; entre 45 °C a aproximadamente 50 °C). Los tiempos de hibridación puede ser de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 1 min. (por ejemplo, de aproximadamente 20 segundos a aproximadamente 50 segundos; de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 40 segundos). La mezcla de reacción se ajusta luego a una temperatura a la cual se promueve o optimiza la actividad de la polimerasa, es decir, una temperatura suficiente para que se produzca la extensión del cebador hibridado para generar productos complementarios al ácido nucleico molde. La temperatura debe ser suficiente para sintetizar un producto de extensión de cada cebador que se hibrida a un molde de ácido nucleico, pero no debe ser tan alta como para desnaturalizar un producto de extensión de su molde complementario (por ejemplo, la temperatura para la extensión generalmente varía entre aproximadamente 40 °C a aproximadamente 80 °C (por ejemplo, de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C; aproximadamente 60 °C). Los tiempos de extensión pueden ser de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 5 min. (por ejemplo, de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 4 min.; de aproximadamente 1 min. a aproximadamente 3 min.; de aproximadamente 1 min. 30 seg. a aproximadamente 2 min.).

Los ensayos de PCR pueden emplear ácido nucleico de SA tal como RNA o DNA (DNAC). El ácido nucleico molde no necesita ser purificado; puede ser una fracción menor de una mezcla compleja, tal como ácido nucleico de SA contenido en las células humanas. Los ácidos nucleicos de SA pueden ser extraídos de una muestra biológica mediante técnicas rutinarias, tales como las descritos en *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications* (Persing et al. (eds), 1993, American Society for Microbiology, Washington DC). Los ácidos nucleicos se pueden obtener de cualquier número de fuentes, tales como plásmidos, o fuentes naturales incluyendo bacterias, levaduras, virus, organelos, u organismos superiores tales como plantas o animales.

Los cebadores de oligonucleótidos (por ejemplo, Id. de Sec. N°: 2, 3, 6, 8, 9, 12, y 14-27) se combinan con reactivos de PCR bajo condiciones de reacción que inducen la extensión del cebador. Por ejemplo, reacciones de extensión de la cadena generalmente incluyen KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), MgCl₂ 15 mM, gelatina 0,001% (p/v), molde de DNA desnaturalizado 0,5 a 1,0 µg, 50 pmoles de cada cebador de oligonucleótido, 2,5 U de Taq polimerasa, y DMSO 10%). Las reacciones usualmente contienen 150 a 320 µM de cada uno de dATP, dCTP, dTTP, dGTP, o uno o más análogos de los mismos.

Las hebras recién sintetizadas forman una molécula de doble cadena que se puede utilizar en los siguientes pasos de la reacción. Los pasos de separación de las hebras, hibridación, y alargamiento se pueden repetir tan a menudo como sea necesario para producir la cantidad deseada de productos de amplificación correspondientes a la molécula diana de ácido nucleico de CPE. Los factores limitantes en la reacción son las cantidades de cebadores, enzima termoestable y trifosfatos de nucleósidos presentes en la reacción. Los pasos de ciclación (es decir, desnaturalización, hibridación, y extensión) se repiten preferiblemente al menos una vez. Para uso en la detección, el número de pasos de ciclado dependerá, por ejemplo, de la naturaleza de la muestra. Si la muestra es una mezcla compleja de ácidos nucleicos, se requerirán más pasos de ciclado para amplificar lo suficiente la secuencia diana para la detección. Generalmente, los pasos de ciclado se repiten al menos aproximadamente 20 veces, pero se pueden repetir tanto como 40, 60, o incluso 100 veces.

Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET)

La tecnología FRET (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos. N° 4.996.143, 5.565.322, 5.849.489, y 6.162.603) se basa en un concepto de que cuando una porción donadora fluorescente y una porción aceptora funcional fluorescente correspondiente se posicionan dentro de una cierta distancia entre ellos, tiene lugar una transferencia de energía entre las dos porciones fluorescentes que se pueden visualizar o detectar y/o cuantificar de algún otro modo. El donador típicamente transfiere la energía al aceptor cuando el donador es excitado por la radiación de luz con una longitud de onda adecuada. El aceptor típicamente reemite la energía transferida en forma de radiación de luz con una longitud de onda diferente.

En un ejemplo, una sonda de oligonucleótido puede contener una porción fluorescente donadora y un bloqueador correspondiente, que disipa la energía transferida en una forma distinta que la luz. Cuando la sonda está intacta, la transferencia de energía se produce normalmente entre las dos porciones fluorescentes de tal manera que la emisión fluorescente de la fracción donadora fluorescente se bloquea. Durante un paso de extensión de una reacción en cadena de la polimerasa, una sonda unida a un producto de amplificación se escinde por la actividad exonucleasa 5' a 3' de, por ejemplo, una Taq polimerasa de tal modo que la emisión fluorescente de la porción donadora fluorescente ya no se bloquea. Ejemplos de sondas para este propósito se describen en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 5.210.015, 5.994.056, y 6.171.785. Las parejas donadoras-aceptoras de uso general incluyen el par FAM-TAMRA. Los bloqueadores comúnmente utilizados son DABCYL y TAMRA. Los bloqueadores oscuros de uso general incluyen BlackHole Quenchers™ (BHQ), (Biosearch Technologies, Inc., Novato, Cal.), Iowa Black™, (Integrated DNA Tech., Inc., Coralville, Iowa), BlackBerry™ Quencher 650 (BBQ-650), (Berry & Assoc., Dexter, Mich.).

En otro ejemplo, dos sondas de oligonucleótidos, cada una conteniendo una porción fluorescente, pueden hibridarse a un producto de amplificación en posiciones particulares determinadas por la complementariedad de las sondas de oligonucleótidos a la secuencia de ácido nucleico diana de CPE. Tras la hibridación de las sondas de oligonucleótidos con el ácido nucleico del producto de amplificación en las posiciones apropiadas, se genera una señal FRET. Las temperaturas de hibridación pueden variar entre aproximadamente 35 °C a aproximadamente 65 °C durante aproximadamente 10 segundos hasta aproximadamente 1 min.

El análisis fluorescente se puede llevar a cabo utilizando, por ejemplo, un sistema de microscopio de epifluorescencia de recuento de fotones (que contiene el espejo dicróico apropiado y filtros para la monitorización de la emisión fluorescente en el rango particular), un sistema fotomultiplicador de recuento de fotones, o un fluorómetro. La excitación para iniciar la transferencia de energía puede llevarse a cabo con un láser de ion argón, una lámpara de arco de mercurio (Hg) de alta intensidad, una fuente de luz de fibra óptica, u otra fuente de luz de alta intensidad filtrada de forma adecuada para la excitación en el rango deseado.

Tal como se usa en el presente documento con respecto a las porciones donadoras y las correspondientes porciones aceptoras fluorescentes, "correspondiente" se refiere a una porción fluorescente aceptora que tiene un espectro de emisión que se solapa con el espectro de excitación de la porción fluorescente donadora. La máxima longitud de onda del espectro de emisión de la porción fluorescente aceptora debe ser al menos 100 nm mayor que la longitud de onda máxima del espectro de excitación de la porción fluorescente donadora. En consecuencia, se puede producir entre ellos la transferencia eficiente de energía no radiactiva.

Las porciones donadoras fluorescentes y aceptoras correspondiente se escogen generalmente por (a) alta eficiencia de transferencia de energía de Forster; (b) un gran desplazamiento final de Stokes (> 100 nm); (C) desplazamiento de la emisión lo más lejos posible en la porción roja del espectro visible (> 600 nm); y (d) desplazamiento de la emisión a una longitud de onda mayor que la emisión fluorescente de agua Raman producida por la excitación a la longitud de onda de excitación del donador. Por ejemplo, una fracción donadora fluorescente se puede escoger que tiene su máximo de excitación cerca de una línea láser (por ejemplo, Helio-Cadmio 442 nm o Argón 488 nm), un coeficiente de extinción alto, un rendimiento cuántico alto, y un buen solapamiento de su emisión fluorescente con el espectro de excitación del grupo funcional fluorescente aceptor correspondiente. Un grupo funcional fluorescente aceptor correspondiente se puede escoger que tiene un alto coeficiente de extinción, un alto rendimiento cuántico, un buen solapamiento de su excitación con la emisión de la fracción donadora fluorescente, y emisión en la parte roja del espectro visible (> 600 nm).

Porciones donadoras fluorescentes representativas que se pueden utilizar con diversas porciones fluorescentes aceptoras en tecnología FRET incluyen fluoresceína, amarillo Lucifer, B-ficoeritrina, isotiocianato de 9-acridina, amarillo Lucifer VS, ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatostilbeno-2,2'-disulfónico, 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metil-cumarina, succinimido-1-pirenobutirato, y derivados de ácido 4-acetamido-4'-isotiorianatostilbeno-2,2'-disulfónico. Porciones aceptoras fluorescentes representativas, dependiendo de la porción donadora fluorescente utilizada, incluyen LC Red 640, LC Red 705, Cy5, Cy5.5, cloruro de sulfonilo B rodamina de lisamina, tetrametil rodamina isotiocianato, rodamina x isotiocianato, eritrosina isotiocianato, fluoresceína, pentaacetato de dietilentriamina, u otros quelatos de iones lantánidos (por ejemplo, europio, o terbio). Se pueden obtener porciones donadoras y aceptoras fluorescentes, por ejemplo, de Molecular Probes (Junction City, Oreg.) o de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Las porciones donadoras yceptoras fluorescentes se pueden unir al oligonucleótido sonda apropiado a través de un brazo de unión. La longitud de cada brazo de unión es importante, ya que los brazos de unión afectarán la distancia entre las porciones donadoras yceptoras fluorescentes. La longitud de un brazo de unión para el propósito de la presente invención es la distancia en Angstroms (Å) desde la base de nucleótido a la porción fluorescente. En general, un brazo conector es de aproximadamente 10 Å a aproximadamente 25 Å. El brazo de unión puede ser del tipo descrito en el documento WO 84/03285. El documento WO 84/03285 también describe métodos para unir brazos conectores a una base de nucleótido en particular, y también para unir porciones fluorescentes a un brazo conector.

Una porción aceptora fluorescente tal como un LC Red 640-NHS-éster se puede combinar con C6-fosforamiditas (Disponible de ABI (Foster City, Calif.) o de Glen Research (Sterling, Va.)) Para producir, por ejemplo, LC Red 640-fosforamidita. Los enlazadores que se utilizan frecuentemente para acoplar una porción donadora fluorescente tal como fluoresceína a un oligonucleótido incluyen enlazadores de tiourea (derivados de FITC, por ejemplo, fluoresceína-CPG de Glen Research o ChemGene (Ashland, Mass.)), enlazadores de amida (derivados de fluoresceína-NHS-éster, tales como fluoresceína-CPG de BioGenex (San Ramon, Calif.)), o 3'-amino-GPC que requieren de acoplamiento de una fluoresceína-NHS-éster después de la síntesis de oligonucleótidos.

Detección de Staphylococcus aureus

La presente invención proporciona métodos para detectar la presencia o ausencia de SA en una muestra biológica o no biológica. Los métodos proporcionados por la invención evitan problemas de contaminación de la muestra, falsos negativos, y falsos positivos. Los métodos incluyen la realización de al menos un paso de ciclado que incluye la amplificación de una porción de una molécula de ácido nucleico de CPE de SA de una muestra utilizando un par de cebadores de CPE, y un paso de detección de FRET. Los pasos de ciclado múltiples se llevan a cabo, preferiblemente en un termociclador. Los métodos de la invención pueden realizarse usando los cebadores de CPE y sondas para detectar la presencia de CPE, y la detección de CPE indica la presencia de un SA en la muestra.

Tal como se describe en el presente documento, los productos de amplificación se pueden detectar usando sondas de hibridación marcadas que se aprovechan de la tecnología de FRET. Un formato FRET utiliza la tecnología TaqMan® para detectar la presencia o ausencia de un producto de amplificación, y por lo tanto, la presencia o ausencia de SA. La tecnología TaqMan® utiliza una sonda de hibridación de cadena simple marcada con dos porciones fluorescentes. Cuando una primera porción fluorescente es excitada con luz de una longitud de onda adecuada, la energía absorbida se transfiere a una segunda porción fluorescente de acuerdo con los principios de FRET. La segunda porción fluorescente es generalmente una molécula bloqueadora. Durante el paso de hibridación de la reacción de PCR, la sonda de hibridación marcada se une al DNA diana (es decir, el producto de amplificación) y es degradada por la actividad exonucleasa 5' a 3' de la Taq polimerasa durante la fase de extensión posterior. Como resultado, la porción fluorescente excitada y la porción bloqueadora pasan a estar espacialmente separadas una de otra. Como consecuencia, tras la excitación de la primera porción fluorescente en ausencia del bloqueador, se puede detectar la emisión de fluorescencia de la primera porción fluorescente. A modo de ejemplo, un sistema ABI PRISM® 7700 de detección de secuencias (Applied Biosystems, Foster City, CA) utiliza tecnología TaqMan®, y es adecuado para realizar los métodos descritos en este documento para detectar la presencia o ausencia de SA en la muestra.

Las balizas moleculares también se pueden utilizar junto con FRET para detectar la presencia de un producto de amplificación utilizando los métodos de PCR en tiempo real de la invención. La tecnología de baliza molecular utiliza una sonda de hibridación marcada con una primera porción fluorescente y una segunda porción fluorescente. La segunda porción fluorescente es generalmente un bloqueador, y los marcadores fluorescentes están situados normalmente en cada extremo de la sonda. La tecnología de baliza molecular utiliza un oligonucleótido de sonda que tiene secuencias que permiten la formación de estructura secundaria (por ejemplo, una horquilla). Como resultado de la formación de la estructura secundaria dentro de la sonda, ambas porciones fluorescentes están en proximidad espacial cuando la sonda está en solución. Después de la hibridación a los ácidos nucleicos diana (es decir, productos de amplificación), la estructura secundaria de la sonda se interrumpe y las porciones fluorescentes se separan la una de la otra de tal manera que después de la excitación con luz de una longitud de onda adecuada, se puede detectar la emisión de la primera porción fluorescente.

Otro formato común de la tecnología de FRET utiliza dos sondas de hibridación. Cada sonda se puede marcar con una porción fluorescente diferente y, en general están diseñados para hibridar en proximidad cercana uno al otro en una molécula de DNA diana (por ejemplo, un producto de amplificación). Una porción donadora fluorescente, por ejemplo, fluoresceína, se excita a 470 nm por la fuente de luz del Instrumento LightCycler®. Durante FRET, la fluoresceína transfiere su energía a una porción aceptora fluorescente tal como LightCycler®-Red 640 (LC Red 640) o LightCycler®-Red 705 (LC Red 705). La porción aceptora fluorescente emite después luz de una longitud de onda más larga, que es detectada por el sistema de detección óptico del instrumento LightCycler®. Una FRET eficiente solo puede tener lugar cuando las porciones fluorescentes están en proximidad local directa y cuando el espectro de emisión de la porción donadora fluorescente se solapa con el espectro de absorción de la porción aceptora fluorescente. La intensidad de la señal emitida se puede correlacionar con el número de moléculas de DNA diana original (por ejemplo, el número de genomas de SA). Si se produce la amplificación del ácido nucleico de CPE y se

produce un producto de amplificación, el paso de hibridar resulta en una señal detectable basada en FRET entre los miembros del par de sondas.

5 En general, la presencia de FRET indica la presencia de SA en la muestra, y la ausencia de FRET indica la ausencia de SA en la muestra. Sin embargo, la inadecuada recogida de muestras, retrasos en el transporte, condiciones de transporte inapropiados, o el uso de ciertos hisopos de recogida (alginato de calcio o bastón de aluminio) son todas las condiciones que pueden afectar el éxito y/o exactitud de un resultado de la prueba. Utilizando los métodos descritos en este documento, la detección de FRET dentro de, por ejemplo, 45 pasos de ciclado es indicativo de una infección por SA.

10 Las muestras biológicas representativas que se pueden utilizar en la práctica de los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a hisopos dérmicos, hisopos nasales, hisopos de heridas, cultivos de sangre, infecciones de tejidos blandos y piel. Los métodos de recolección y almacenamiento de muestras biológicas son conocidos por los expertos en la técnica. Las muestras biológicas pueden ser procesadas (por ejemplo, por métodos de extracción de ácidos nucleicos y/o equipos conocidos en la técnica) para liberar los ácidos nucleicos de SA o en algunos casos, la muestra biológica puede ponerse en contacto directamente con los componentes de la reacción de PCR y los oligonucleótidos apropiados.

15 El análisis de la curva de fusión es un paso adicional que puede incluirse en un perfil de ciclado. El análisis de la curva de fusión se basa en el hecho de que el DNA se funde a una temperatura característica llamada temperatura de fusión (T_m), que se define como la temperatura a la que la mitad de los dúplex de DNA se han separado en cadenas sencillas. La temperatura de fusión de un DNA depende principalmente de su composición de nucleótidos. Por lo tanto, las moléculas de DNA ricas en nucleótidos G y C tienen una T_m mayor que los que tienen una abundancia de nucleótidos A y T. Mediante la detección de la temperatura a la que se pierde la señal, se puede determinar la temperatura de fusión de las sondas. Del mismo modo, mediante la detección de la temperatura a la que se genera la señal, se puede determinar la temperatura de hibridación de las sondas. La(s) temperatura(s) de fusión de las sondas de CPE a partir del producto de amplificación de CPE puede confirmar la presencia o ausencia de SA en la muestra.

20 En cada análisis con el termociclador, también se analizan muestras control. Las muestras control positivo pueden amplificar el molde de ácido nucleico de SA control (diferente de CPE) usando, por ejemplo, cebadores control y sondas control. Las muestras control positivo también pueden amplificar, por ejemplo, una construcción de plásmido que contenga moléculas del ácido nucleico de la CPE de SA. Tal plásmido control se puede amplificar internamente (por ejemplo, en la muestra) o en una muestra de análisis separada analizada conjuntamente con las muestras de los pacientes. Cada análisis con el termociclador también puede incluir un control negativo que, por ejemplo, carece del molde de DNA de SA. Tales controles son indicadores del éxito o el fracaso de la amplificación, hibridación, y/o reacción de FRET. Por lo tanto, las reacciones de control pueden determinar fácilmente, por ejemplo, la capacidad de los cebadores de hibridar con especificidad de secuencia y para iniciar la elongación, así como la capacidad de las sondas para hibridar con especificidad de secuencia y de producir la FRET.

25 En una realización, los métodos de la invención incluyen medidas para evitar la contaminación. Por ejemplo, un método enzimático que utiliza uracilglicosilasa de DNA se describe en la patente de EE.UU. Nº 5.035.996, 5.683.896 y 5.945.313 para reducir o eliminar la contaminación entre un análisis de termociclador y el siguiente.

30 Los métodos convencionales de PCR junto con la tecnología de FRET se pueden utilizar para poner en práctica los métodos de la invención. En una realización, se utiliza un instrumento LightCycler®. Las siguientes solicitudes de patente describen la PCR en tiempo real tal como se utiliza en la tecnología LightCycler®: WO 97/46707, WO 97/46714, y WO 97/46712.

35 El LightCycler® puede utilizarse mediante una estación de trabajo PC y puede utilizar un sistema operativo Windows NT. Las señales de las muestras se obtienen a medida que la máquina posiciona los capilares secuencialmente sobre la unidad óptica. El software puede mostrar las señales de fluorescencia en tiempo real inmediatamente después de cada medición. El tiempo de adquisición de fluorescencia es de 10-100 milisegundos (ms). Tras cada etapa de ciclado, se puede mostrar la cantidad de fluorescencia frente al número de ciclos que se actualiza continuamente para todas las muestras. Los datos generados pueden almacenarse para su posterior análisis.

40 Como alternativa a la FRET, un producto de amplificación se puede detectar utilizando un colorante de unión al DNA de doble cadena como un colorante fluorescente de unión al DNA (por ejemplo, SYBR® Green o SYBR® Gold (Molecular Probes)). Tras la interacción con el ácido nucleico de doble cadena, tales colorantes fluorescentes de unión al DNA emiten una señal de fluorescencia tras la excitación con luz a una longitud de onda adecuada. También se puede utilizar un colorante de unión al DNA de doble cadena como un agente intercalante en el ácido nucleico. Cuando se utilizan colorantes de unión al DNA de doble cadena, generalmente se realiza un análisis de curva de fusión para la confirmación de la presencia del producto de amplificación.

45 Se entenderá que la presente invención no está limitada por la configuración de uno o más instrumentos disponibles comercialmente.

Artículos de fabricación/equipos

5 La presente invención proporciona además artículos de fabricación o equipos para detectar el SA. Un artículo de fabricación según la presente invención puede incluir cebadores y sondas utilizados para detectar el SA, junto con los materiales de envasado adecuados. Los cebadores y sondas representativas para detección de SA pueden hibridarse a las moléculas del ácido nucleico de la CPE de SA. Además, los equipos también pueden incluir reactivos y los materiales necesarios para la inmovilización, hibridación y detección de DNA, tales soportes sólidos, tampones, enzimas y los estándares de DNA, empaquetados de forma adecuada. Los métodos de diseño de
10 cebadores y sondas se describen aquí, y se proporcionan ejemplos representativos de cebadores y sondas que amplifican y se hibridan a las moléculas de ácido nucleico de la CPE de SA.

15 Los artículos de fabricación de la invención también pueden incluir uno o más residuos fluorescentes para marcar las sondas o, alternativamente, las sondas suministradas con el equipo pueden estar marcadas. Por ejemplo, un artículo de fabricación puede incluir una porción fluorescente donadora para marcar una de las sondas de CPE y una porción fluorescente aceptora para marcar la otra sonda de CPE, respectivamente. Ejemplos de porciones fluorescentes donadoras de FRET adecuadas y de los correspondientes porciones fluorescentesceptoras se han proporcionado anteriormente.

20 Los artículos de fabricación de la invención también puede contener un prospecto o etiqueta del paquete que tiene instrucciones sobre el mismo para el uso de los cebadores y sondas de CPE para detectar el SA en una muestra. Los artículos de fabricación pueden incluir adicionalmente reactivos para llevar a cabo los métodos descritos en este documento (por ejemplo, tampones, enzimas polimerasa, cofactores o agentes para evitar la contaminación). Tales reactivos pueden ser específicos para uno de los instrumentos disponibles comercialmente aquí descritos.

25 La invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Ejemplos

30 Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas. Se entenderá que se pueden realizar modificaciones en los procedimientos indicados sin apartarse del espíritu de la invención.

Ejemplo 1

Selección del gen diana de la enzima del polisacárido capsular

40 Se determinó que el gen diana CPE era específico de *S. aureus* y que no estaba presente en otras especies de estafilococos mediante el análisis de secuencias con BLAST usando los genomas completos disponibles al público de *S. aureus* y otras especies de *Staphylococcus*.

45 Se escogieron los sitios de los cebadores dentro del gen CPE para producir amplicones de menos de 250 pb de longitud, y que tuvieran los nucleótidos doble dA o doble dC en el extremo 3' (si era posible). También se seleccionaron los cebadores para que tuvieran una Tm mayor de 64°C, y se fabricaron con un modificador de t-butilbencilo en 3' para reducir los dímeros de cebadores y aumentar la especificidad durante la PCR. Después de elegir los sitios iniciales para los cebadores, se hicieron búsquedas de BLAST para comprobar la especificidad de *S. aureus*, y se evaluaron utilizando el software de análisis de cebadores Oligo 6 para comprobar la probabilidad de la formación de dímeros de cebadores y los falsos sitios de cebado en otros lugares del gen de la CPE.

50 La homología del gen de la CPE dentro de *S. aureus* se verificó mediante la secuenciación del gen de la CPE de 20 aislados independientes de *S. aureus*, así como mediante la búsqueda BLAST en las bases de datos de secuencias públicas. La exclusividad de cada conjunto de cebadores se verificó mediante amplificación con otras especies de estafilococos (*S. captis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. ludgunensis*, *S. carnosus*, *S. saprophyticus* y *S. scirui*).

55 El gen cap5N de la CPE de *S. aureus* es de aproximadamente 880 pares de bases de longitud, y debido a su presencia única y de elevada homología en *S. aureus*, es una diana ideal con especificidad y exclusividad de este organismo. Varios posibles amplicones de PCR se diseñaron y analizaron para el rendimiento óptimo de este gen, y las siguientes cuatro opciones de grupos de oligos produjeron la mayor cantidad de productos (observado mediante electroforesis en gel), así como la fluorescencia más elevada y los valores de hombro más tempranos observados mediante análisis TaqMan.

Conjunto de oligos de la CPE N° 1

65 Cebador directo: ACACCAATGAACCCTACGACJ (J = t-butilbencilo dC) (Id. de Sec. N°: 2)
Cebador reverso: TAATTGATCAATAAATGCTGTCAGJ (J = t-butilbencilo dA) (Id. de Sec. N°: 3)

ES 2 572 930 T3

Sonda: ETTGCCCOAGGAAATTTCCAACGGTTP (E = thFAM, Q = BHQ2, P = 3 'fosfato) (Id. de Sec. Nº: 4)

Amplicón generado a partir del conjunto de oligos Nº 1:

ACACCAATGAACCCTACGACCAACTATGGTATTTCCAAAAAGTTCGCTGAACAAG
CATTACAAGAATTGATTAGTGATTTCGTTTAAAGTAGCAATTGTGAGACCACCAAT
GATTTATGGTGCACATTGCCAGGAAATTTCCAACGGTTAATGCAATTGTCAAAG
CGATTGCCAATCATTCCAATATTAACAATCAGCGCAGTGCATTATATATTA AAC
ATCTGACAGCATTATTGATCAATTA Id. de Sec. Nº: 5

5

Conjunto de oligos de la CPE Nº 2

Cebador directo: ACACCAATGAACCCTACGACJ (J = t-butilbencilo dC) (Id. de Sec. Nº: 2)

10 Cebador reverso: GATCAATAAATGCTGTCAGATGTTAJ (J = t-butilbencilo dA) (Id. de Sec. Nº: 6)

Sonda: ETTGCCCOAGGAAATTTCCAACGGTTP (E = thFAM, Q = BHQ2, P = 3 'fosfato) (Id. de Sec. Nº: 4)

Amplicón generado a partir del conjunto de oligos Nº 2:

ACACCAATGAACCCTACGACCAACTATGGTATTTCCAAAAAGTTCGCTGAACAAG
CATTACAAGAATTGATTAGTGATTTCGTTTAAAGTAGCAATTGTGAGACCACCAAT
GATTTATGGTGCACATTGCCAGGAAATTTCCAACGGTTAATGCAATTGTCAAAG

CGATTGCCAATCATTCCAATATTAACAATCAGCGCAGTGCATTATATATTA AAC
ATCTGACAGCATTATTGATC Id. de Sec. Nº: 7

15

Conjunto de oligos de la CPE Nº 3

Cebador directo: GATAAGCTTATTGAACAAGGACATCAJ (J = t-butilbencilo dA) (Id. de Sec. Nº: 8)

20 Cebador reverso: CTTGAGGTGAATTGTTGTGAACJ (J = t-butilbencilo dC) (Id. de Sec. Nº: 9)

Sonda: ETAGGAQATCAATTATGGAAGTCGACCTCGTP (E = thFAM, Q = BHQ2, P = 3'fosfato) (Id. de Sec. Nº: 10)

Amplicón generado a partir del conjunto de oligos Nº 3:

GATAAGCTTATTGAACAAGGACATCAAGTAGATCAAATTAATGTTAGGAATCAAT
TATGGAAGTCGACCTCGTTCAAAGATTATGATGTTTAAATTCATACAGCAGCTTT
GGTTCACAACAATTCACCTCAAG Id. de Sec. Nº: 11

25

Conjunto de oligos de la CPE Nº 4:

Cebador directo: AAGATAAGCTTATTGAACAAGGACATJ (J = t-butilbencilo dC) (Id. de Sec. Nº: 12)

30 Cebador reverso: CTTGAGGTGAATTGTTGTGAACJ (J = t-butilbencilo dC) (Id. de Sec. Nº: 9)

Sonda: ETAGGAQATCAATTAmGAAGTCGACCTCGTP (E = thFAM, Q = BHQ2, P = 3'fosfato) (Id. de Sec. Nº: 10)

Amplicón generado a partir del conjunto de oligos Nº 4:

AAGATAAGCTTATTGAACAAGGACATCAAGTAGATCAAATTAATGTTAGGAATC
AATTATGGAAGTCGACCTCGTTCAAAGATTATGATGTTTAAATTCATACAGCAGC
TTTGGTTCACAACAATTCACCTCAAG Id. de Sec. Nº: 13

35

Condiciones de PCR: 25 µl de DNA genómico de S. aureus diluido en Tris 30 mM, pH 8,5, más 18 µl de mezcla maestra (tricina 154 mM, hidróxido de potasio 110 mM, acetato de potasio 190 mM, 19% de glicerol (v/v), 2,3% de

DMSO, dATP 1,16 mM, dCTP 1,16 mM, dGTP 1,16 mM, dUTP 1,16 mM, 1,0 µM del cebador directo del ensayo, 1,0 µM de cebador reverso del ensayo, sonda 0.185 µM, 308 U/ml de polimerasa de DNA ZO5, 150 U/ml UNG, 0,09% de azida sódica (p/v), a pH 8,50, más 7 µl de mezcla de activación (cloruro de magnesio 50 mM).

5 Instrumento de PCR: LightCycler® 480 con configuración de filtros Cobas® z480

Ejemplo 2

Método de evaluación del rendimiento de los oligos de la CPE

10 Haciendo referencia a las figuras 3A-3D, se realizó una evaluación de los conjuntos de oligos de la CPE N°1 a 4 mediante la evaluación de DNA genómico a partir de 12 organismos *S. aureus* únicos cultivados. El DNA genómico de cada organismo *S. aureus* se diluyó a ~ 10⁵c/PCR en Tris 30 mM, a pH 8,5, y se añadieron 25 µl de DNA genómico a 18 µl de mezcla maestra pre-formulada más 7 µl de reactivo de activación. La mezcla maestra pre-formulada contenía las siguientes concentraciones de los componentes: tricina 154 mM, hidróxido de potasio 110 mM, acetato de potasio 190 mM, 19% de glicerol (v/v), 2,3% de DMSO, dATP 1,16 mM, dCTP 1,16 mM, dGTP 1,16 mM, dUTP 1,16 mM, 1,0 µM del cebador directo del ensayo, 1,0 µM de cebador reverso del ensayo, sonda 0,185 µM, 308 U/ml de polimerasa de DNA ZO5, 150 U/ml UNG, 0,09% de azida sódica (p/v), a pH 8,50. El reactivo de activación contenía cloruro de magnesio 50 mM.

20 Ejemplo 3

Método de evaluación de la exclusividad

25 La evaluación de la exclusividad del conjunto de oligos de la CPE N° 4 se realizó mediante la combinación de 1 µl de DNA genómico de *Staph* sp. diluido a ~ 10⁶c/µl en Tris 30 mM, a pH 8,5, más 50 µl de mezcla maestra reconstituida. La mezcla maestra reconstituida consistía en DNA genómico en 25 µl de Tris 30 mM, a pH 8,5, más 18 µl de mezcla maestra pre-formulada más 7 µl de mezcla de activación (50 µl de volumen total). La mezcla maestra pre-formulada contenía las siguientes concentraciones de los componentes: tricina 154 mM, hidróxido de potasio 110 mM, acetato de potasio 190 mM, 19% de glicerol (v/v), 2,3% de DMSO, dATP 1,16 mM, dCTP 1,16 mM, dGTP 1,16 mM, dUTP 1,16 mM, 1,0 µM del cebador directo del ensayo, 1,0 µM de cebador reverso del ensayo, 6,0 µM de otros cebadores del ensayo (fuera de la diana CPE), sonda en la diana CPE 0.185 µM, otras sondas de ensayo 1.0 µM (fuera de la diana CPE), 308 U/ml de polimerasa de DNA ZO5, 150 U/ml UNG, 0,09% de azida sódica (p/v), a pH 8,50. El reactivo de activación contenía cloruro de magnesio 50 mM.

35

Conjunto de oligos de la CPE N°4			Conjunto de oligos de la CPE N°4 (cont.)		
Organism	ID	Ct's	Organism	ID	Ct's
<i>S. capitis</i>	1194	-1	<i>S. haemolyticus</i>	6760	-1
<i>S. capitis</i>	3104	-1	<i>S. haemolyticus</i>	6762	-1
<i>S. capitis</i>	5662	-1	<i>S. haemolyticus</i>	10734	-1
<i>S. capitis</i>	10728	-1	<i>S. haemolyticus</i>	10735	-1
<i>S. capitis</i>	10729	-1	<i>S. haemolyticus</i>	10736	-1
<i>S. capitis</i>	10730	-1	<i>S. haemolyticus</i>	10737	-1
<i>S. capitis</i>	10731	-1	<i>S. haemolyticus</i>	1207	-1
<i>S. capitis</i>	10732	-1	Organism	ID	Ct's
<i>S. capitis</i>	10733	-1	<i>S. ludgunensis</i>	5743	-1
Organism	ID	Ct's	<i>S. ludgunensis</i>	7039	-1
<i>S. saprophyticus</i>	10738	-1	<i>S. ludgunensis</i>	10739	-1
<i>S. saprophyticus</i>	10740	-1	Organism	ID	Ct's
Organism	ID	Ct's	<i>S. hominis</i>	3106	-1
<i>S. sciuri</i>	323	-1	<i>S. hominis</i>	5651	-1
<i>S. sciuri</i>	10741	-1	<i>S. hominis</i>	10742	-1
Organism	ID	Ct's	<i>S. hominis</i>	10743	-1
<i>S. aureus</i> (ctrl)	10710	29.42	<i>S. hominis</i>	10744	-1
<i>S. aureus</i> (ctrl)	10714	28.54	<i>S. hominis</i>	10745	-1
			Organism	ID	Ct's
			<i>S. epidermidis</i>	5657	-1

Aunque la invención anterior se ha descrito en cierto detalle con el fin de clarificar y mejorar su comprensión, será evidente para un experto en la técnica a partir de una lectura de esta descripción que se pueden introducir varios cambios en la forma y los detalles. Por ejemplo, todas las técnicas y aparatos descritos anteriormente pueden utilizarse en varias combinaciones.

40

ES 2 572 930 T3

Listado de secuencias

	<110> F. Hoffmann-La Roche AG Roche Diagnostics GmbH	
	<120> Composiciones y métodos para la detección de Staphylococcus aureus	
	<130> 27414 WO-HS	
	<150> US 13/116975	
5	<151> 26.05.2011	
	<160> 34	
	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1	
	<211> 888	
10	<212> DNA	
	<213> Staphylococcus aureus	
	<400> 1	
	atgagaaaa atattttaat tacaggcgta catggatata tchgtaatgc tttaaaagat	60
	aagcttattg aacaaggaca tcaagtagat caaattaatg ttaggaatca attatggaag	120
	tcgacctcgt tcaaagatta tgatgtttta attcatacag cagctttggt tcacaacaat	180
	tcacctcaag caaggctatc tgattatatg caagtgaata tgttgctgac gaaacaattg	240
	gcacaaaagg ctaaagctga agacgttaaa caatttattt ttatgagtac tatggcagtt	300
	tatgaaaag aaggctatg tggtaaatca gatcaagttg atacacaaac accaatgaac	360
	cctacgacca actatggtat ttccaaaaag ttcgctgaac aagcattaca agaattgatt	420
	agtgattcgt ttaaagtagc aattgtgaga ccaccaatga tttatggtgc acattgccca	480
	ggaaatttcc aacggttaat gcaattgtca aagcgattgc caatcattcc caatattaac	540
	aatcagcgca gtgcattata tattaacat ctgacagcat ttattgatca attaatatca	600
	ttagaagtga cagggtgtga ccacctcaa gatagttttt actttgatac atcgtcagta	660
	atgtatgaaa tacgtcgcca atcacatcgt aaaacggtat tgatcaacat gccttcaatg	720
	ctaaataagt attttaataa gttgtcggtc tttagaaaat tattcggcaa tttaatatac	780
	agcaatcgt tatatgaaa taataatgca cttgaaatta ttctggaaa aatgtcactt	840
	gttattgceg acatcatgga tgaacgaca accaaagata aggcataa	888
15	<210> 2	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> oligonucleótido	
	<400> 2	
	acaccaatga accctacgac c	21
25	<210> 3	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> oligonucleótido	
	<400> 3	
	taattgatca ataaatgctg tcaga	25
35	<210> 4	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	

ES 2 572 930 T3

<223> oligonucleótido
<400> 4

5 ttgccagga aattccaac ggtt 24

<210> 5
<211> 246
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> oligonucleótido
<400> 5

acaccaatga accctacgac caactatggt atttcacaaa agttcgctga acaagcatta 60
caagaattga ttagtgattc gtttaaagta gcaattgtga gaccaccaat gatttatggt 120
gcacattgcc caggaaattt ccaacggta atgcaattgt caaagcgatt gccaatcatt 180
cccaatatta acaatcagcg cagtgacatta tatattaac atctgacagc atttattgat 240
caatta 246

15 <210> 6
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> oligonucleótido
<400> 6

25 gatcaataaa tgctgcaga tgttaa 27

<210> 7
<211> 241
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> oligonucleótido
<400> 7

acaccaatga accctacgac caactatggt atttcacaaa agttcgctga acaagcatta 60
caagaattga ttagtgattc gtttaaagta gcaattgtga gaccaccaat gatttatggt 120
gcacattgcc caggaaattt ccaacggta atgcaattgt caaagcgatt gccaatcatt 180
cccaatatta acaatcagcg cagtgacatta tatattaac atctgacagc atttattgat 240
c 241

35 <210> 8
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> oligonucleótido
<400> 8

45 gataagctta ttgaacaagg acatcaa 27

<210> 9
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> oligonucleótido
<400> 9

ES 2 572 930 T3

cttgagggtga attgtgtga acc 23

5 <210> 10
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 10 <400> 10

ttaggaatca attatggaag tcgacctcgt 30

15 <210> 11
 <211> 133
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 20 <400> 11

gataagctta ttgaacaagg acatcaagta gatcaaatta atgttaggaa tcaattatgg 60

aagtcgacct cgttcaaaga ttatgatggt ttaattcata cagcagcttt ggttcacaac 120

aattcacctc aag 133

25 <210> 12
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 30 <400> 12

aagataagct tattgaacaa ggacatc 27

35 <210> 13
 <211> 135
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 40 <400> 13

aagataagct tattgaacaa ggacatcaag tagatcaaat taatgttagg aatcaattat 60

ggaagtcgac ctcgttcaaa gattatgatg ttttaattca tacagcagct ttggttcaca 120

acaattcacc tcaag 135

45 <210> 14
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 50 <400> 14

aggcgtacat ggatatatcg gtaa 24

55 <210> 15
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 15

5 gcttattgaa caaggacatc aa 22
 <210> 16
 <211> 25
 <212> DNA
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 16

15 gataagctta ttgaacaagg acatc 25
 <210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 17

25 acaccaatga accctacgac 20
 <210> 18
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 18

35 acaccaatga accctacga 19
 <210> 19
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 19

45 accaatgaac cctacgacc 19
 <210> 20
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 20

55 atacacaaac accaatgaac cctac 25
 <210> 21
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 21

65 tgcttgaggt gaattgtgt gaa 23
 <210> 22

<211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> oligonucleótido
 <400> 22

 agatagcctt gcttgagtg aa 22

 10 <210> 23
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> oligonucleótido
 <400> 23
 cttgaggtga attgttgga a 21

 20 <210> 24
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Oligonucleótido
 <400> 24

 tgaggtgaat tgttggaac c 21

 30 <210> 25
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> oligonucleótido
 <400> 25

 caataaatgc tgcagatgt taa 24

 40 <210> 26
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 26

 taattgatca ataaatgctg tca 23

 50 <210> 27
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> oligonucleótido
 <400> 27

 tgggtcacat tgcccaggaa attt 24

 60 <210> 28
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 65 <223> oligonucleótido
 <400> 28

	cattgccag gaaattcca acggtt	26
	<210> 29	
	<211> 21	
5	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido	
	<400> 29	
10	cccaggaaat ttccaacggt t	21
	<210> 30	
	<211> 27	
15	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido	
	<400> 30	
20	cgaggtcgac ttccataatt gattcct	27
	<210> 31	
	<211> 30	
25	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido	
	<400> 31	
30	acgaggtcga ctccataat tgattcctaa	30
	<210> 32	
	<211> 24	
35	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido	
	<400> 32	
40	aaatttctg ggcaatgtg acca	24
	<210> 33	
	<211> 26	
45	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido	
	<400> 33	
50	aaccgttga aatttctgg gcaatg	26
	<210> 34	
	<211> 24	
55	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido	
	<400> 34	
60	aaccgttga aatttctgg gcaa	24

REIVINDICACIONES

1. Un conjunto de oligonucleótidos que comprenden

5 - un primer oligonucleótido que tiene 40 o menos nucleótidos, que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las Id. de Sec. N°: 2 y 17-20, o la cadena complementaria de los mismos; y

- un segundo oligonucleótido que tiene 40 o menos nucleótidos, que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las Id. de Sec. N°: 3, 6 y 25 a 26, o la cadena complementaria de los mismos;

10 o

- un primer oligonucleótido que tiene 40 o menos nucleótidos, que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las Id. de Sec. N°: 8, 12 y 14 a 16, o la cadena complementaria de los mismos; y

15 - un segundo oligonucleótido que tiene 40 o menos nucleótidos, que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las Id. de Sec. N°: 9 y 21 a 24, o la cadena complementaria de los mismos.

20 2. El conjunto de oligonucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende además un tercer oligonucleótido marcado de forma detectable, que tiene 40 nucleótidos o menos y que comprende

- una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las Id. de Sec. N°: 4, 27 a 29 y 32 a 34, o la cadena complementaria de los mismos, si dicho primer oligonucleótido comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las Id. de Sec. N°: 2 y 17-20, o la cadena complementaria de los mismos, y dicho segundo oligonucleótido comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las Id. de Sec. N°: 3, 6 y 25 a 26, o la cadena complementaria de los mismos;

25 o

30 - una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las Id. de Sec. N°: 10, 30 y 31, o la cadena complementaria de los mismos, si dicho primer oligonucleótido comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las Id. de Sec. N°: 8, 12 y 14 a 16, o la cadena complementaria de los mismos, y dicho segundo oligonucleótido comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste los Id. de Sec. N°: 9 y 21 a 24, o la cadena complementaria de los mismos.

35 3. Un método de detección de Staphylococcus aureus (SA) en una muestra, que comprende el procedimiento:

- la realización de un paso de amplificación que comprende poner en contacto la muestra con un conjunto de cebadores de SA para producir un producto de amplificación si el SA está presente en la muestra;

40 - la realización de un paso de hibridación que comprende poner en contacto el producto de amplificación con una o más sondas de SA detectables; y

45 - detectar la presencia o ausencia del producto amplificado, de forma que la presencia del producto amplificado es indicativa de la presencia de SA en la muestra y la ausencia del producto amplificado es indicativa de la ausencia de SA en la muestra;

50 en el que el conjunto de cebadores de SA comprende un primer cebador oligonucleótido que tiene 40 nucleótidos o menos y que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las Id. de Sec. N°: 2 y de 17-20, o la cadena complementaria de los mismos, y un segundo cebador oligonucleótido que tiene 40 nucleótidos o menos y que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste los Id. de Sec. N°: 3, 6 y de 25 a 26, o la cadena complementaria de los mismos, y en el que las sondas detectables de SA que tienen 40 nucleótidos o menos comprenden una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las Id. de Sec. N°: 4, de 27 a 29 y de 32 a 34, o la cadena complementaria de los mismos; o

55 en el que el conjunto de cebadores de SA comprende un primer cebador oligonucleótido que tiene 40 o menos nucleótidos, que comprenden una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las Id. de Sec. N°: 8, 12 y de 14 a 16, o la cadena complementaria de los mismos y un segundo cebador oligonucleótido que tiene 40 nucleótidos o menos y que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las Id. de Sec. N°: 9 y de 21 a 24, o la cadena complementaria de los mismos, y en el que las sondas detectables de SA comprenden una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las Id. de Sec. N°: 10, 30 y 31, o la cadena complementaria de los mismos.

60 4. El método de la reivindicación 3, en el que:

65

- el paso de hibridación comprende poner en contacto el producto de amplificación con una sonda que está marcada con una porción donadora fluorescente y la correspondiente porción aceptora fluorescente; y
 - el paso de detección comprende detectar la presencia o ausencia de transferencia de energía por resonancia de la fluorescencia (FRET) entre la porción donadora fluorescente y la porción aceptora fluorescente de la sonda, y en el que la presencia o ausencia de fluorescencia es indicativa de la presencia o ausencia de SA en la muestra.
- 5
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, en el que dicha amplificación emplea una enzima polimerasa con actividad exonucleasa 5'a 3'.
- 10
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, en el que dichas primera y segunda porciones fluorescentes se encuentran a no más de 5 nucleótidos la una de la otra en dicha sonda.
- 15
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que dicha sonda de SA comprende una secuencia de ácido nucleico que permite la formación de estructura secundaria, y en el que la formación de la estructura secundaria resulta en una proximidad espacial entre la primera y la segunda porción fluorescente.
8. Un equipo para detectar un ácido nucleico de *Staphylococcus aureus* que comprende:
- un primer oligonucleótido que tiene 40 nucleótidos o menos y que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las Id. de Sec. N°: 2 y de 17-20, o la cadena complementaria de los mismos;
 - un segundo oligonucleótido que tiene 40 o menos nucleótidos, que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las Id. de Sec. N°: 3, 6, y de 25 a 26, o la cadena complementaria de los mismos; y
 - un tercer oligonucleótido marcado de forma detectable que tiene 40 nucleótidos o menos y que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las Id. de Sec. N°: 4, 27-29, y 32-34, o la cadena complementaria de los mismos;
- 20
- o
- un primer oligonucleótido que tiene 40 o menos nucleótidos, que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las Id. de Sec. N°: 8, 12, y 14 a 16, o la cadena complementaria de los mismos;
 - un segundo oligonucleótido que tiene 40 nucleótidos o menos que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las Id. de Sec. N°: 9 y de 21 a 24, o la cadena complementaria de los mismos; y
 - un tercer oligonucleótido marcado de forma detectable que tiene 40 nucleótidos o menos y que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las Id. de Sec. N°: 10, 30, y 31, o la cadena complementaria de los mismos.
- 25
- 30
- 35
- 40
9. El equipo de la reivindicación 8, en el que el tercer oligonucleótido marcado de forma detectable comprende una porción donadora fluorescente y su correspondiente porción aceptora fluorescente.
- 45
10. El equipo de cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, que comprende además al menos un componente adicional seleccionado de entre el grupo que consiste de nucleósidos trifosfato, una polimerasa de ácidos nucleicos y los tampones necesarios para el funcionamiento de la polimerasa de ácidos nucleicos.

atgagaaaaa atattttaat tacaggcgta catggatata tchgtaatgc tttaaaagat	60
aagcttattg aacaaggaca tcaagtagat caaattaatg ttaggaatca attatggaag	120
tcgacctcgt tcaaagatta tgatgtttta attcatacag cagctttggt tcacaacaat	180
tcacctcaag caaggctatc tgattatatg caagtgaata tgttgctgac gaaacaattg	240
gcacaaaagg ctaaagctga agacgttaaa caatttattt ttatgagtac tatggcagtt	300
tatggaaaag aaggctatgt tggtaaataca gatcaagttg atacacaaac accaatgaac	360
cctacgacca actatggtat ttcaaaaag ttcgctgaac aagcattaca agaattgatt	420
agtgattcgt ttaaagtagc aattgtgaga ccaccaatga tttatggtgc acattgccca	480
ggaaatttcc aacggttaat gcaattgtca aagcgattgc caatcattcc caatattaac	540
aatcagcgca gtgcattata tattaaacat ctgacagcat ttattgatca attaatatca	600
ttagaagtga caggtgtgta ccatcctcaa gatagttttt actttgatac atcgtcagta	660
atgtatgaaa tacgtcgcca atcacatcgt aaaacggtat tgatcaacat gccttcaatg	720
ctaaataagt attttaataa gttgtcggtc ttagaaaat tattcggcaa ttaatatatac	780
agcaatacgt tatatgaaaa taataatgca cttgaaatta ttctggaaa aatgtcactt	840
gttattgctgg acatcatgga tgaaacgaca accaaagata aggcataa	888

(Id. De Sec. N°:1)

FIGURA 1

ACACCAATGAACCCTACGACCAACTATGGTATTTCCAAAAAGTTCGCTGAA
CAAGCATTACAAGAATTGATTAGTGATTCGTTTAAAGTAGCAATTGTGAGA
CCACCAATGATTTATGGTGACATTGCCCAGGAAATTTCCAACGGTTAATG
CAATTGTCAAAGCGATTGCCAATCATTCCCAATATTAACAATCAGCGCAGT
GCATTATATATTAACATCTGACAGCATTATTGATCAATTA (Id. de Sec. N°: 5)

Figura 2A

ACACCAATGAACCCTACGACCAACTATGGTATTTCCAAAAAGTTCGCTGAA
CAAGCATTACAAGAATTGATTAGTGATTCGTTTAAAGTAGCAATTGTGAGA
CCACCAATGATTTATGGTGACATTGCCCAGGAAATTTCCAACGGTTAATG
CAATTGTCAAAGCGATTGCCAATCATTCCCAATATTAACAATCAGCGCAGT
GCATTATATATTAACATCTGACAGCATTATTGATCAATTA (Id. de Sec. N°: 7)

Figura 2B

GATAAGCTTATTGAACAAGGACATCAAGTAGATCAAATTAATGTTAGGAAT
CAATTATGGAAGTCGACCTCGTTCAAAGATTATGATGTTTTAATTCATACAG
CAGCTTTGGTTCACAACAATTCACCTCAAG (Id. de Sec. N°: 11)

Figura 2C

AAGATAAGCTTATTGAACAAGGACATCAAGTAGATCAAATTAATGTTAGGA
ATCAATTATGGAAGTCGACCTCGTTCAAAGATTATGATGTTTTAATTCATAC
AGCAGCTTTGGTTCACAACAATTCACCTCAAG (Id. de Sec. N°:13)

Figura 2D

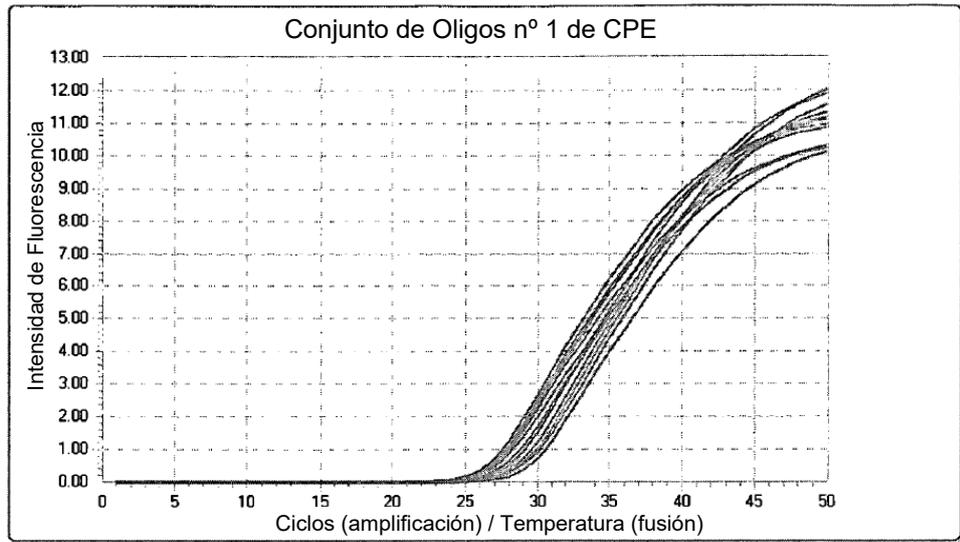


Figura 3A

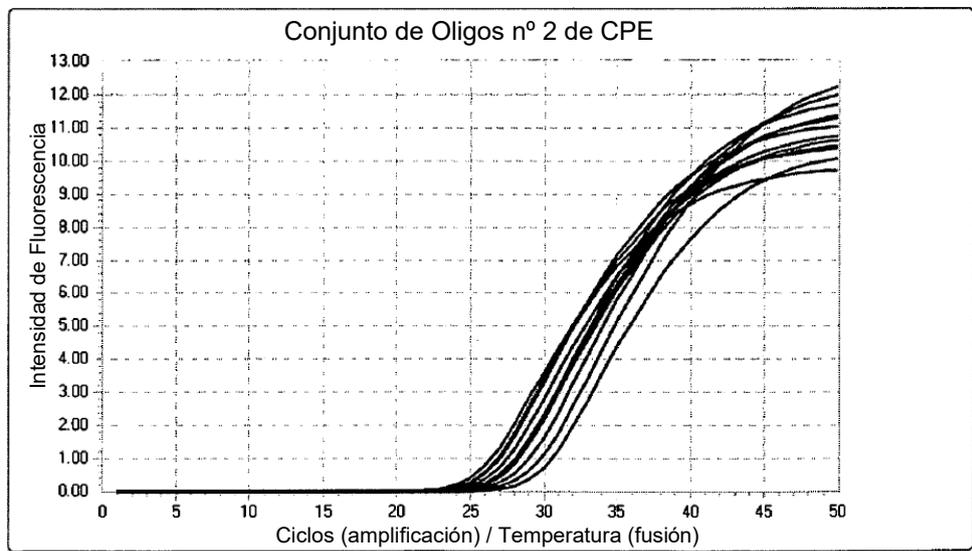


Figura 3B

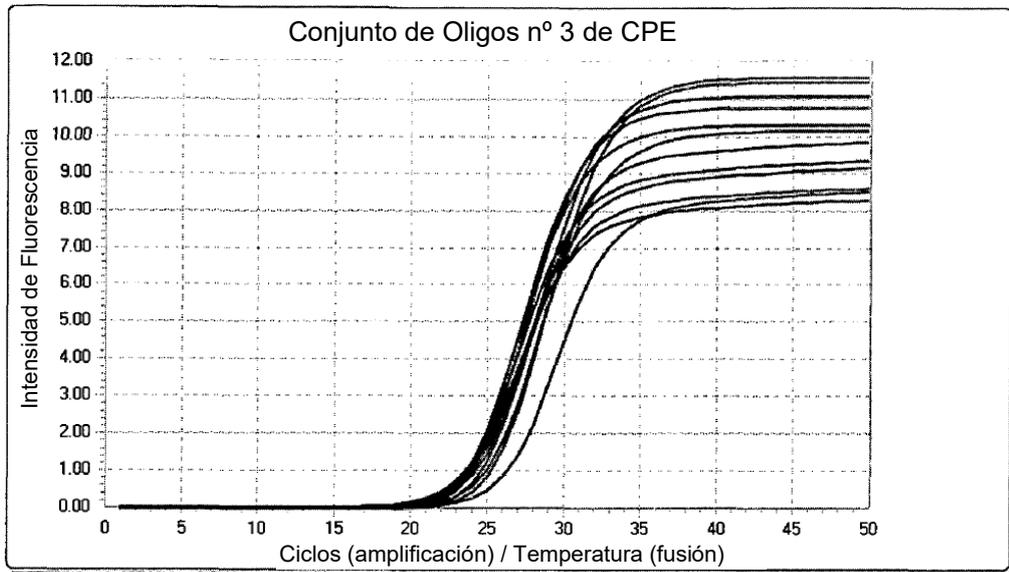


Figura 3C

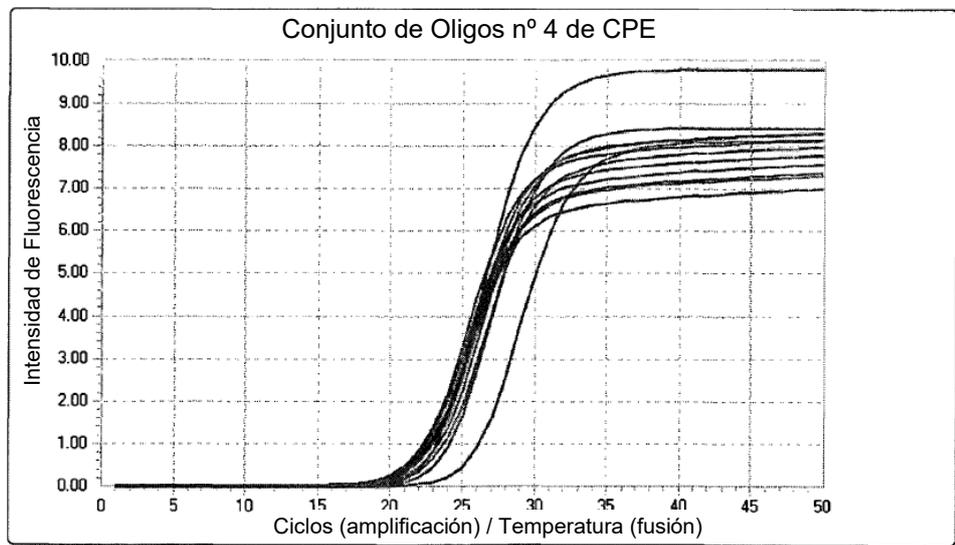


Figura 3D