

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 602**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 1/38 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2008 E 12187764 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016 EP 2574681**

54 Título: **Sistema y método de análisis de alta resolución de ácidos nucleicos para detectar variaciones de secuencia**

30 Prioridad:

28.03.2007 US 908604 P

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

14.09.2016

73 Titular/es:

**SIGNAL DIAGNOSTICS (100.0%)
2238 Coronet Drive
San Jose, CA 95124, US**

72 Inventor/es:

CAPLIN, BRIAN ERICH

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 582 602 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).

Sistema y método de análisis de alta resolución de ácidos nucleicos para detectar variaciones de secuencia**DESCRIPCIÓN****5 CAMPO**

La presente divulgación se refiere generalmente a sistemas y métodos de preparación y análisis de muestras biológicas para detectar variaciones de secuencias de ácidos nucleicos asociadas a fenotipos de interés. En ciertas realizaciones, los métodos se proporcionan para amplificar ácidos nucleicos de microorganismos de una muestra biológica, y detectar variaciones de secuencias asociadas a resistencia y/o sensibilidad a fármacos.

ANTECEDENTES

Muy pocos desarrollos en la historia de la ciencia han tenido un impacto tan profundo en la vida humana como los avances en controlar los microorganismos patógenos. No fue hasta finales del siglo XIX y principios del XX que el trabajo de Pasteur y Koch estableció a los microorganismos como la causa de enfermedades infecciosas y proporcionó estrategias que condujeron a la prevención racional y estrategias de control. Las sulfonamidas estuvieron entre los primeros grupos de compuestos descubiertos para suprimir infecciones por microorganismos, y aunque se sabía poco sobre su mecanismo de acción, el descubrimiento estimuló una enorme búsqueda de compuestos antibióticos más eficaces. El aislamiento de una preparación impura, pero altamente activa, de penicilina por Florey y Chain en 1940, y el posterior éxito de la penicilina, desvió el esfuerzo científico adicional hacia la búsqueda de antibióticos, que condujo al descubrimiento de aproximadamente 3.000 antibióticos identificados. Sin embargo, a pesar del rápido progreso en el descubrimiento de nuevos compuestos, solo 50 de los antibióticos identificados han cumplido el uso clínico, e incluso menos se usan comúnmente en el tratamiento de enfermedades por microorganismos.

La eficacia inicial de los antibióticos contra infecciones por microorganismos se ha compensado parcialmente por la emergencia de cepas de microorganismos que son resistentes a diversos antibióticos. La resistencia a antibióticos ha demostrado ser difícil de vencer debido a la acelerada adaptabilidad evolutiva de los microorganismos, el uso excesivo cada vez mayor de antibióticos en la clínica, y la ausencia de cumplimiento del paciente en completar las pautas de dosificación prescritas. Los problemas de resistencia han hecho que muchas enfermedades de otro modo curables, tales como la gonorrea y la tifoidea, sean difíciles de tratar. Además, los microorganismos resistentes a la vancomicina, uno de los últimos antibióticos ampliamente eficaces, están siendo cada vez más predominantes en los hospitales.

Constantemente están siendo desarrollados nuevos compuestos antibióticos para mantener a los microorganismos infecciosos a raya, y un entendimiento de los mecanismos de resistencia a antibióticos ha demostrado ser valioso en el proceso de desarrollo. Los avances en la genómica permiten que los investigadores identifiquen vías bioquímicas que son susceptibles a la inhibición o modificación, y a diseñar racionalmente fármacos dirigidos hacia esas vías. Muchos fármacos ejercen un efecto terapéutico uniéndose a una proteína de microorganismo y modificando su estructura y/o función. En tales casos, los microorganismos pueden desarrollar inmunidad por modificación física de la proteína diana de un modo que interfiere con la unión del fármaco o actividad. Por ejemplo, la resistencia al antibiótico eritromicina en varios microorganismos resulta de una variación de la subunidad ribosómica 50S que produce una afinidad reducida de los ribosomas por la eritromicina. Como la estructura/función de la proteína se determina por su secuencia primaria, que a su vez se determina por la secuencia del ácido nucleico que codifica la proteína, variaciones de las secuencias de ácidos nucleicos asociadas a fenotipos resistentes a fármacos son indicadores de diagnóstico útiles de resistencia al fármaco.

Masny et al. (Nucl. Acids Res. (2003) 31 (18): e114) describen que el uso de bajas temperaturas de desnaturalización (80-88 °C) durante la PCR mediada por ligación (LM PCR) de ADN bacteriano conduce a la amplificación de conjuntos limitados de los fragmentos de ADN menos estables. Un conjunto de patrones electroforéticos de tales fragmentos obtenidos a diferentes temperaturas de desnaturalización forma el perfil de fusión de PCR (PCR MP). Un único patrón obtenido para una temperatura dada y un conjunto de patrones que surgen después de la aplicación de varias temperaturas de desnaturalización (PCR MP) son muy específicos para el genoma bacteriano dado y pueden usarse para la caracterización y la diferenciación de cepas. El método también puede usarse para la amplificación y el aislamiento de los fragmentos de ADN menos estables en un genoma.

El documento WO-A-2006/074334 describe composiciones y métodos para identificar una molécula de ARN por transcripción inversa y síntesis de ADN y que incluyen una helicasa termoestable en la mezcla de reacción.

El documento US 20040058378 proporciona métodos y un kit para amplificar selectivamente y exponencialmente ácidos nucleicos e incluyen el uso de una preparación de helicasa y una ADN polimerasa de forma que la amplificación pueda realizarse isotérmicamente.

Notomi et al. (Nucleic Acids Res. 2000 Jun 15;28(12):E63) describen un método, llamado la amplificación isoterma mediada por lazo (LAMP), que amplifica ADN con alta especificidad, eficiencia y rapidez bajo condiciones isotermas.

Este método emplea una ADN polimerasa y un conjunto de cuatro cebadores especialmente diseñados que reconocen un total de seis secuencias distintas en el ADN diana. Debido a que LAMP reconoce la diana por seis secuencias distintas inicialmente y por cuatro secuencias distintas después, se espera que amplifique la secuencia diana con alta selectividad.

5 El documento WO-A-98/45474 describe una amplificación por PCR alternativa que no recurre al uso de ADN polimerasas termoestables. Proporciona medios para la manipulación controlada de condiciones desnaturizantes que no requieren el uso de alta temperatura desnaturizante.

10 Aunque los métodos se han establecido para identificar variaciones de secuencias de ácidos nucleicos en microorganismos, las técnicas existentes están limitadas por el requisito del conocimiento previo de mutaciones particulares u otras variaciones que se usan como indicadores de diagnóstico. Como resultado, los procedimientos de cribado conocidos frecuentemente pasan por alto las variaciones de secuencias recientemente desarrolladas y/o sin caracterizar asociadas a resistencia a fármacos u otras características de interés.

15 Por consiguiente, existe una necesidad en la materia de métodos rápidos, asequibles y fiables para detectar tanto variaciones de secuencias de ácidos nucleicos conocidas como desconocidas que tengan utilidad diagnóstica, que incluyen mutaciones asociadas a patrones de sensibilidad a fármacos y/o resistencia a fármacos en una amplia variedad de organismos, tales como levaduras, virus, hongos, bacterias, parásitos e incluso seres humanos.

20 **SUMARIO**

La invención proporciona un método de amplificación de un ácido nucleico diana, que comprende:

- 25 a. desnaturizar el ácido nucleico diana;
- b. hibridar cebadores de oligonucleótidos con el ácido nucleico diana; y
- 30 c. extender los cebadores de oligonucleótidos hibridados;

en el que las etapas de desnaturizar, hibridar y extender se llevan a cabo por ciclos térmicos dentro de 10 °C de la temperatura de fusión del ácido nucleico diana, y dentro del solapamiento entre las temperaturas de fusión de los cebadores de oligonucleótidos y la temperatura de fusión del ácido nucleico diana; y en el que los cebadores de oligonucleótidos se diseñan para tener una temperatura de fusión que está dentro de aproximadamente 10 °C de la temperatura de fusión del ácido nucleico diana. Se describen métodos para determinar la reactividad de un microorganismo a un fármaco, comprendiendo los métodos obtener una muestra biológica de un paciente, conteniendo la muestra un microorganismo infeccioso; amplificar uno o más segmentos de ADN del microorganismo, incluyendo el uno o más segmentos al menos un polimorfismo asociado a reactividad del microorganismo a un fármaco de interés; y ensayar el uno o más fragmentos de ADN amplificados para variaciones de secuencias con respecto a una secuencia de referencia, en el que una variación en uno o más de los fragmentos de ADN amplificados indica reactividad del microorganismo al fármaco.

En algunas realizaciones preferidas, el ADN amplificado se ensaya para variaciones de secuencias usando análisis de las curvas de fusión de alta resolución. En diversas realizaciones, el análisis de las curvas de fusión implica incubar el ADN amplificado (ADN diana) con una secuencia de referencia complementaria, tal como una secuencia no mutante, en presencia de un colorante fluorescente que se une a ADN que emite un nivel de fluorescencia sustancialmente diferente en presencia de ADN bicatenario (ADNbc) con respecto a ADN monocatenario (ADNmc). En algunas realizaciones preferidas, el colorante que se une al ADN es un colorantes específico de ADNbc, tal como SYBR Green I o SYBR Green II, y el análisis de las curvas de fusión implica monitorizar el nivel de fluorescencia como una función del tiempo a medida que la disolución de ensayo se calienta lentamente a una velocidad constante. Ventajosamente, el análisis de las curvas de fusión según los métodos proporcionados en el presente documento puede detectar con exactitud desapareamientos de pares de bases individuales entre una secuencia de ADN diana y una secuencia de referencia, y/o los desapareamientos en dos, tres, cuatro, cinco, o más bases.

55 En algunas realizaciones, la secuencia de referencia usada en los análisis de las curvas de fusión de los métodos proporcionados en el presente documento incluye al menos un polimorfismo asociado a reactividad a fármacos, tal como resistencia a fármacos o sensibilidad a fármacos, y el análisis detecta uno o más polimorfismos adicionales en el segmento de ADN que incluye el polimorfismo asociado a la reactividad a fármacos.

60 Se describen métodos para determinar si un paciente es susceptible a tratamiento con un fármaco, comprendiendo los métodos obtener una muestra biológica de un paciente, en los que la muestra contiene *Mycobacterium tuberculosis* (MTb); amplificar uno o más segmentos de ADN de MTb de SEQ ID NOS: 142-204, incluyendo cada uno del uno o más segmentos al menos un polimorfismo asociado a sensibilidad de MTb a un fármaco antibiótico; y ensayar el uno o más fragmentos de ADN amplificados para variaciones de secuencias con respecto a la secuencia correspondiente entre SEQ ID NOS: 142-204, en los que una variación en uno o más de los fragmentos de ADN amplificados indica sensibilidad de MTb al fármaco antibiótico. En algunos de los métodos descritos, variaciones en

dos o más de los fragmentos de ADN amplificados indica sensibilidad de MTb al fármaco antibiótico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 5 Figura 1: Una representación gráfica de un diseño para solapar las temperaturas de hibridación de cebadores y las temperaturas de desnaturalización de moldes.
 Figura 2: Una ilustración de productos de amplificación convencionales por PCR en tiempo real.
 Figura 3: Una gráfica que muestra la amplificación por PCR a alta temperatura del mismo molde usado en la Figura 2.
- 10 Figura 4: Gráfico que muestra la amplificación por HTPCR del mismo material de molde usando diferentes concentraciones de material de partida
 Figura 5: A - Comparación de productos de HTPCR del gen CFP32 de *M. tuberculosis* en agua y MycoBuffer. B - Comparación de productos de HTPCR de la región del gen IS6110 de *M. tuberculosis* en agua y MycoBuffer. C - Comparación de productos de HTPCR de la región del gen bMTb de *M. tuberculosis* en agua y MycoBuffer. D - Comparación de productos de HTPCR de la región del gen diana IS6110 de transposasa de *M. tuberculosis* en agua y MycoBuffer. E - Comparación de productos de HTPCR de la región del gen BTTb de *M. tuberculosis* en agua y MycoBuffer.
- 15 Figura 6: Representaciones gráficas de los productos de amplificación de un cribado de resistencia a rifampicina. A - Productos de amplificación de homodúplex y heterodúplex. B - Curvas de fusión de los productos de homo- y heterodúplex. C - Representación de diferencias entre las curvas de fusión en B.
 Figura 7: Representación gráfica del análisis de las curvas y curvas de diferencias de muestras de control y sensibles.
 Figura 8: Representación gráfica que muestran diferentes curvas fluorescentes para diferentes ácidos nucleicos.
- 20 Figura 9: Representación gráfica del análisis de las curvas de diferencias entre muestras de control, resistentes y sensibles.
 Figura 10A: Análisis de curvas de diferencias de muestras sensibles y resistentes a rifampicina de *M. tuberculosis*. B. Análisis de curvas de diferencias de muestras sensibles y resistentes a estreptomycinina de *M. tuberculosis*.
- 30 Figura 11: Análisis de curvas de diferencias de muestras resistentes a terbinafina de *S. cerevisiae*.
 Figura 12: Análisis de curvas de diferencias de muestras sensibles y resistentes a taxano de seres humanos.
 Figura 13: Análisis de curvas de diferencias de muestras resistentes a cloroquina de infecciones de malaria.
 Figura 14: Análisis de curvas de diferencias de muestras sensibles y resistentes a zidovudina del VIH.
 Figura 15: Análisis de curvas de diferencias de muestras sensibles y resistentes a vancomicina de *S. aureus*.
- 35 Figura 16: Análisis en gel de agarosa de productos ADN de *M. tuberculosis* amplificados por simulación por amplificación de flujo dinámico.
 Figura 17: Análisis en tiempo real de productos de amplificación de ADN de *S. typhimurium* por amplificación de flujo dinámico.

40 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE ASPECTOS ILUSTRATIVOS

En el presente documento se describen métodos fiables de bajo coste para detectar variaciones de secuencias de ácidos nucleicos asociadas a una o más características fenotípicas que tienen utilidad de diagnóstico en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección. En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento son útiles para detectar variaciones de secuencias de ácidos nucleicos asociadas a la reactividad de un microorganismo a uno o más fármacos. En el presente documento también se describen composiciones, sistemas y kits relacionados con los presentes métodos. Aunque varios aspectos y ventajas de la presente invención se describen en el presente documento con respecto a diversos métodos, los expertos en la materia reconocerán que tales aspectos y ventajas también son aplicables a composiciones relacionadas, sistemas, kits y similares.

50 El término "microorganismo", como se usa en el presente documento, puede referirse a bacterias, hongos, protozoos, parásitos y/o virus. En diversas realizaciones preferidas, el microorganismo es un patógeno bacteriano. En algunas realizaciones preferidas, el microorganismo es *Mycobacterium tuberculosis*. Sin embargo, aunque varios aspectos y ventajas de la presente invención se describen en el presente documento en relación a *Mycobacterium tuberculosis*, los expertos en la materia reconocerán que tales aspectos y ventajas también son aplicables a otros microorganismos, y para una variedad de enfermedades y afecciones. Ejemplos no limitantes de microorganismos útiles en los métodos de diagnóstico proporcionados en el presente documento se exponen en la Tabla I, junto con elementos de secuencias variables relacionados con la reactividad a fármacos de tales microorganismos.

60 El "sujeto" al que se hace referencia en el presente documento puede ser cualquier organismo capaz de alojar un microorganismo, que incluye, pero no se limita a, animales experimentales (por ejemplo, ratones, ratas, conejos y similares) y seres humanos. En diversas realizaciones preferidas, el sujeto es un paciente humano que padece una enfermedad infecciosa. En algunas realizaciones preferidas, el paciente padece tuberculosis.

65 Una "muestra biológica" descrita en el presente documento puede incluir cualquier material biológico tomado de un sujeto, que incluye, pero no se limita a, expectoraciones (por ejemplo, esputo), sangre, glóbulos sanguíneos (por

ejemplo, linfocitos), tejido, biopsias, células cultivadas, líquido pleural, peritoneal, o cefalorraquídeo, sudor, heces y orina. En algunas realizaciones, una muestra biológica de un sujeto se trata, por ejemplo, para cultivar un microorganismo infeccioso y/o amplificar su material genético, antes de ser ensayada según métodos proporcionados en el presente documento.

5 Como se usa en el presente documento, el término “fármaco” puede referirse a cualquier compuesto, agente, modalidad de tratamiento, o combinación de los mismos. En algunos aspectos preferidos, el fármaco es un compuesto antibiótico.

10 El término “diana(s) de ácido nucleico”, como se usa en el presente documento, se refiere a ácidos nucleicos derivados de un microorganismo infeccioso, como se distingue de ácidos nucleicos del sujeto y/o ácidos nucleicos extraños no relacionados con la enfermedad, trastorno o afección prevista para el tratamiento. En algunos aspectos, un ácido nucleico diana es un ácido nucleico de un microorganismo que se ensaya según un método proporcionado en el presente documento.

15 El término “ácido nucleico de referencia”, como se usa en el presente documento, se refiere a un ácido nucleico correspondiente a un ácido nucleico diana (por ejemplo, que representa la misma porción de ADN genómico), que se diferencia del ácido nucleico diana por una o más variaciones de secuencias. Por ejemplo, en algunos aspectos, un ácido nucleico de referencia tiene la secuencia de un microorganismo no mutante (por ejemplo, con respecto a reactividad a un fármaco de interés). En otros aspectos, un ácido nucleico de referencia tiene la secuencia de una célula humana no mutante, tal como una célula enferma, que incluye, por ejemplo, una célula cancerosa humana.

20 El término “variación de secuencia”, como se usa en el presente documento en relación con ácidos nucleicos, se refiere a una diferencia en la secuencia de un ácido nucleico con respecto a la secuencia de un ácido nucleico correspondiente (por ejemplo, una secuencia que representa el mismo gen u otra porción de ADN genómico). En algunas realizaciones preferidas, las variaciones de secuencias detectadas según diversos métodos en el presente documento proporcionan “polimorfismos de un solo nucleótido” (“SNP”), resultantes de una diferencia en la identidad de un único nucleótido entre un ácido nucleico diana y un ácido nucleico de referencia. En realizaciones adicionales, las variaciones de secuencias detectadas según diversos métodos proporcionados en el presente documento incluyen “polimorfismos de múltiples nucleótidos” (“MNP”). En algunas realizaciones, el ácido nucleico de referencia se corresponde con un fenotipo no resistente a fármacos y se detecta un fenotipo resistente a fármacos según un método proporcionado en el presente documento identificando una variación de secuencia entre el ácido nucleico de referencia y un ácido nucleico diana de una muestra biológica de un sujeto infectado con el microorganismo o célula enferma, tal como una célula cancerosa resistente a fármacos.

25 El término “reactividad” y “reactividad a fármacos”, como se usan en el presente documento, pueden referirse a resistencia, sensibilidad, susceptibilidad, tolerancia y/u otras características fenotípicas de un microorganismo o célula enferma, tal como una célula cancerosa, relacionadas con el efecto terapéutico de un fármaco, que incluye no reactividad. La reactividad a fármacos puede evaluarse directamente, según el efecto del fármaco sobre un microorganismo o célula enferma elegido como diana, tal como una célula cancerosa (por ejemplo, una mortalidad bacteriana o una mortalidad celular), y/o indirectamente, según el efecto del fármaco sobre uno o más aspectos de una enfermedad infecciosa producida por el microorganismo (por ejemplo, prevención, mejora, alivio y/o eliminación de la enfermedad o uno o más síntomas de la enfermedad). En algunos aspectos preferidos, en el presente documento se proporcionan sistemas y métodos para detectar resistencia a uno o más fármacos, en los que la resistencia se refiere a resistencia heredable (genética).

30 Los términos “reactividad” y “reactividad a fármacos”, como se usan en el presente documento, pueden referirse a resistencia, sensibilidad, susceptibilidad, tolerancia y/u otras características fenotípicas de un microorganismo o célula enferma, tal como una célula cancerosa, relacionadas con el efecto terapéutico de un fármaco, que incluye no reactividad. La reactividad a fármacos puede evaluarse directamente, según el efecto del fármaco sobre un microorganismo o célula enferma elegido como diana, tal como una célula cancerosa (por ejemplo, una mortalidad bacteriana o una mortalidad celular), y/o indirectamente, según el efecto del fármaco sobre uno o más aspectos de una enfermedad infecciosa producida por el microorganismo (por ejemplo, prevención, mejora, alivio y/o eliminación de la enfermedad o uno o más síntomas de la enfermedad). En algunos aspectos preferidos, en el presente documento se proporcionan sistemas y métodos para detectar resistencia a uno o más fármacos, en los que la resistencia se refiere a resistencia heredable (genética).

35 El término “elemento de secuencia variable” se refiere a una región de un ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN) comprendida de una serie de nucleótidos adyacentes - por ejemplo, 2, 3, 5, 10, 15, 25, 50, 75, 100 o más bases consecutivas - que incluye al menos una variación de secuencia conocida por estar asociada a una característica fenotípica de interés, tal como resistencia, sensibilidad y/u otros aspectos de reactividad a fármacos. Sin quedar ligado a teoría particular, se cree que es probable que las variaciones de secuencias asociadas a reactividad a fármacos, tales como resistencia y/o sensibilidad a fármacos, se produzcan en regiones del ácido nucleico que son importantes en la determinación del fenotipo receptivo, de forma que es sustancialmente más probable que un elemento de secuencia variable que incluye la variación (y nucleótidos de alrededor) contenga variaciones no caracterizadas adicionales asociadas al fenotipo receptivo (por ejemplo, resistente o sensible). Por ejemplo, una variación de secuencia asociada a resistencia a fármacos se producirá frecuentemente en una región de un ácido nucleico que codifica un sitio de la proteína correspondiente que es un determinante estructural y/o funcional de reactividad a fármacos, tal como un sitio de unión a fármaco. Un elemento de secuencia variable que incluye la variación conocida (y nucleótidos de alrededor) probablemente codificará porciones estructuralmente y/o funcionalmente relacionadas de la proteína (por ejemplo, un bolsillo, pliegue u otra estructura que comprende el sitio de unión a fármaco), y variaciones no caracterizadas adicionales dentro del elemento de secuencia variable probablemente se asociarán al mismo fenotipo que la variación conocida.

40 Los términos “reactividad” y “reactividad a fármacos”, como se usan en el presente documento, pueden referirse a resistencia, sensibilidad, susceptibilidad, tolerancia y/u otras características fenotípicas de un microorganismo o célula enferma, tal como una célula cancerosa, relacionadas con el efecto terapéutico de un fármaco, que incluye no reactividad. La reactividad a fármacos puede evaluarse directamente, según el efecto del fármaco sobre un microorganismo o célula enferma elegido como diana, tal como una célula cancerosa (por ejemplo, una mortalidad bacteriana o una mortalidad celular), y/o indirectamente, según el efecto del fármaco sobre uno o más aspectos de una enfermedad infecciosa producida por el microorganismo (por ejemplo, prevención, mejora, alivio y/o eliminación de la enfermedad o uno o más síntomas de la enfermedad). En algunos aspectos preferidos, en el presente documento se proporcionan sistemas y métodos para detectar resistencia a uno o más fármacos, en los que la resistencia se refiere a resistencia heredable (genética).

45 Así, en el presente documento se proporcionan métodos de ensayo de fenotipos receptivos a fármaco asociados a variaciones de secuencias conocidas y/o desconocidas. Ventajosamente, tales métodos son capaces de detectar reactividad a fármacos sin conocimiento previo de variaciones de secuencias de ácidos nucleicos específicas,

permitiendo la rápida identificación de nuevas mutaciones genéticas asociadas a resistencia a fármacos, sensibilidad a fármacos y/u otros fenotipos receptivos a fármacos. Como tales, los métodos proporcionados en el presente documento pueden lograr mayor sensibilidad y utilidad de diagnóstico que los métodos existentes basados en mutaciones caracterizadas.

5 Por consiguiente, en el presente documento se proporcionan elementos de secuencia variable que incluyen una o más variaciones de secuencias conocidas por asociarse a un fenotipo resistente a fármacos, y ensayar tales elementos de secuencias variables como se describe en el presente documento permite la detección del fenotipo resistente a fármacos debido a variaciones conocidas y/o una variación no caracterizada adicional. Ventajosamente, 10 en el presente documento se proporcionan elementos de secuencias variables de un tamaño que permite un alto grado de sensibilidad junto con un bajo nivel de positivos falsos (por ejemplo, un tamaño suficiente para codificar la porción de la proteína alterada por la(s) variación (variaciones) conocida(s) y regiones estructuralmente y/o funcionalmente relacionadas sin que incluya porciones no relacionadas significativas de la proteína). En algunas realizaciones, la detección de una variación de secuencia dentro de un elemento de secuencia variable 15 proporcionada en el presente documento es indicativa de resistencia a fármacos con una tasa de positivos falsos inferior a aproximadamente el 25 %, inferior a aproximadamente el 20 %, inferior a aproximadamente el 15 %, o más preferentemente inferior a aproximadamente el 10 %, 5 %, o el 1 %.

20 Se describen métodos de diagnóstico para determinar si un sujeto infectado por un microorganismo es susceptible a tratamiento con un fármaco midiendo la reactividad del microorganismo al fármaco. En algunos métodos, la reactividad se mide obteniendo una muestra biológica de un sujeto, y ensayando la muestra para una o más variaciones de secuencias dentro de un elemento de secuencia variable asociado a reactividad al fármaco. En algunos métodos preferidos, el elemento de secuencia variable está asociado a resistencia al fármaco. En métodos preferidos adicionales, el elemento de secuencia variable está asociado a sensibilidad al fármaco.

25 Se describen métodos para detectar si un sujeto se infecta por Tb resistente a fármacos, en los que el método comprende obtener una muestra biológica del sujeto y ensayar la muestra para una o más variaciones de secuencias de ácidos nucleicos dentro de un elemento de secuencia variable de ADN elegido como diana seleccionado de los elementos de secuencias variables expuestos en la Tabla 1. Algunos métodos comprenden 30 además amplificar elementos de secuencias variables elegidos como diana usando los cebadores expuestos en la Tabla 3.

35 Algunos métodos descritos en el presente documento implican una etapa de preparación de una muestra biológica para facilitar la detección y/o el análisis de ácidos nucleicos diana. Se describen sistemas y métodos para preparar una muestra biológica para análisis de secuencias de alta resolución. En algunas realizaciones preferidas, las muestras biológicas se tratan para amplificar elementos de secuencias variables de ADN elegido como diana por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o por otros métodos conocidos en la técnica.

40 La amplificación por PCR generalmente comprende las etapas de desnaturalización inicial, hibridación, polimerización y extensión final. La amplificación por PCR se realiza generalmente en una cámara de reacción, que está provista de reactivos de PCR necesarios, que incluyen la muestra biológica que contiene el ADN diana, una ADN polimerasa (por ejemplo, Taq polimerasa), trifosfatos de nucleósido, un primer y segundo cebador (que comprende un par de cebadores) que se hibridan con el ADN diana y flanquean la secuencia del producto de ADN amplificado (el "amplión"). Un aparato de PCR normalmente incluirá medios para el ciclo de temperatura de la 45 cámara de reacción según se requiera para cada etapa del ciclo de amplificación, que incluye, por ejemplo, "fundir" el ADN bicatenario para producir ADN monocatenario; hibridar los cebadores con moldes de ADN monocatenario; y extensión del ADN amplificado mediante polimerasa.

50 Las condiciones precisas usadas para amplificar una secuencia de ADN diana específica pueden variar según varios factores que están dentro del conocimiento de los expertos en la materia. En algunas realizaciones, la desnaturalización se realiza a entre aproximadamente 90-95 °C durante aproximadamente 10-30 segundos, la hibridación se realiza a aproximadamente 45-65 °C durante aproximadamente 10-30 segundos; la extensión se realiza a aproximadamente 70-75 °C durante aproximadamente 10-90 segundos; y una extensión final se realiza a 72 °C durante aproximadamente 5 minutos. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende ADN 55 genómico, MgCl₂ y otras sales fisiológicas (por ejemplo, MnCl₂), tampón de PCR, dNTP 0,1-1,0 mM, 0,04-1,5 μM de cada cebador y 0,5-5,0 unidades de polimerasa termoestable (por ejemplo, Taq polimerasa).

60 También pueden utilizarse otros métodos de amplificación conocidos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, replicación de secuencia autosostenida (3SR), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA); amplificación de ADN de "cadena ramificada" (Chiron Corp.); reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación por QB replicasa (QBR), transcripción activada por ligación (LAT), amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), reacción de reparación en cadena (RCR) y reacción de ciclado con sonda (CPR) (revisado, por ejemplo, en The Genesis Report, DX; Vol. 3(4), pp. 2-7 (Febrero de 1994)).

65 Se describen cebadores novedosos para su uso en amplificar ácidos nucleicos diana para el análisis según métodos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, en diversas realizaciones, los pares de cebadores

expuestos en la Tabla 2 pueden usarse para amplificar los amplicones correspondientes expuestos en la Tabla 3, que pueden usarse en diversos métodos descritos en el presente documento para detectar variaciones de secuencias indicativas de resistencia a fármacos.

5 En diversos aspectos, las variaciones de secuencias se detectan dentro de ácidos nucleicos diana según métodos proporcionados en el presente documento usando el análisis de las curvas de fusión (MCA). En diversas realizaciones, el MCA implica calentar lentamente fragmentos de ADN en presencia de un colorante que permite la medición de las cantidades relativas de ADN bicatenario (ADNbc) y ADN monocatenario (ADNmc) en función del tiempo y la temperatura, como se describe, por ejemplo, en Morrison y Stols, *Biochemistry*, 32: 3095-3104 (1993).
 10 Colorantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, colorantes específicos de ADNbc tales como bromuro de etidio, SYBR Green I y SYBR Green II (Molecular Probes, Eugene, Oreg.), Eva Green (GENTAUR EUROPE) y colorantes específicos de ADNmc. En algunas realizaciones preferidas, el colorante es un colorante fluorescente, tal como SYBR Green I, SYBR Green II, Eva Green, LC Green I y LC Green Plus. En diversas realizaciones, los colorantes pueden ser de saturación o no de saturación.

15 En diversos aspectos, el MCA usado para detectar las variaciones de secuencias en métodos proporcionados en el presente documento implica incubar una muestra que contiene un ácido nucleico diana con una sonda de nucleótido en presencia de un colorante de unión a ADN fluorescente, y monitorizar el grado de hibridación (indicado por el nivel de fluorescencia) en función del tiempo y la temperatura. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un elemento de secuencia variable de la Tabla 3 se amplifica en una muestra biológica, y la muestra amplificada se incuba con una sonda de nucleótido complementaria a la secuencia no mutante expuesta en la Tabla 3 en presencia de un colorante de unión a ADNbc. La muestra se calienta entonces lentamente a una velocidad constante (por ejemplo, aproximadamente 0,05 a 10,0 °C por minuto) mientras que se mide el nivel de fluorescencia con el tiempo. En diversas realizaciones preferidas se realiza un MCA de control paralelo, en el que se sabe que el ADN diana tiene la secuencia no mutante expuesta en la Tabla 3. El ADN diana se hibrida con las sondas de nucleótido complementarias para formar ADNbc a las bajas temperaturas iniciales, mientras que el ADNbc se desnaturaliza a medida que aumenta la temperatura, convirtiendo el ADNbc en ADNmc. La conversión de ADNbc a ADNmc va acompañada de cambios en la fluorescencia que son característicos del colorante particular usado. Ventajosamente, pueden detectarse variaciones de secuencias en la muestra biológica analizando el cambio en la fluorescencia con el tiempo con respecto al de la muestra de control.

En diversas realizaciones preferidas, el MCA usado en los métodos proporcionados en el presente documento permite detección de "alta resolución" de variaciones de secuencias dentro de una secuencia diana, que se detectan como cambios en uno o más aspectos de los datos de fluorescencia. En algunos aspectos preferidos, el MCA de alta resolución según los métodos proporcionados en el presente documento puede distinguir entre especies de muestra-sonda y control-ADNbc de sonda que difieren por una única base, y/o por 2, 3, 4, 5, o más bases.

En algunos aspectos, los datos de fluorescencia pueden representarse en función del tiempo para determinar fluorescencia máxima, fluorescencia mínima, el tiempo a fluorescencia mínima, y una constante de velocidad de segundo orden para la concentración conocida de producto amplificado usando la siguiente ecuación:

$$F = F_{\max} - \frac{F_{\max} - F_{\min}}{k(t-t_0)[DNA] + 1}$$

en la que F es la fluorescencia, F_{\max} es la máxima fluorescencia, F_{\min} es la mínima fluorescencia, k es la constante de velocidad de segundo orden, t_0 es el tiempo a F_{\min} y [ADN] es la concentración conocida del producto amplificado. En algunas realizaciones se usan múltiples variables de los datos de fluorescencia frente al tiempo para definir un grupo de criterios que sirve de "huella de MCA" que identifica inequívocamente una o más secuencias asociadas a un fenotipo de interés, tal como resistencia a fármacos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un fenotipo resistente a fármacos puede ensayarse realizando MCA usando ADN amplificado de una muestra biológica, y comparando los datos de fluorescencia frente al tiempo con una huella de MCA establecida.

55 En algunos aspectos preferidos se proporcionan métodos de ensayo de una muestra biológica para tuberculosis resistente a fármacos, en los que los métodos comprenden amplificar uno o más elementos de secuencias variables seleccionados de la Tabla 3 usando uno o más de los pares de cebadores correspondientes expuestos en la Tabla 2, y ensayar la muestra para variaciones de secuencias dentro del uno o más elementos de secuencias variables amplificados usando MCA. En diversas realizaciones, la detección de una o más variaciones dentro de un elemento de secuencia variable en la muestra biológica con respecto al elemento de secuencia variable correspondiente en una muestra de control o un patrón conocido es indicativa de resistencia a fármacos.

En diversos métodos descritos, el ADN de MTb amplificado comprende una o más de SEQ ID NOS: 142-145, y una variación en uno o más de los fragmentos de ADN amplificados indica sensibilidad de MTb a rifampicina; el ADN de MTb amplificado comprende una o más de SEQ ID NOS: 146-151, y una variación en uno o más de los fragmentos de ADN amplificados indica sensibilidad de MTb a pirazinamida; el ADN de MTb amplificado comprende una o más

- de SEQ ID NOS: 152-154, y una variación en uno o más de los fragmentos de ADN amplificados indica sensibilidad de MTb a estreptomycin; el ADN de MTb amplificado comprende una o más de SEQ ID NOS: 155-176, y una variación en uno o más de los fragmentos de ADN amplificados indica sensibilidad de MTb a isoniazida; el ADN de MTb amplificado comprende una o más de SEQ ID NOS: 177-198, y una variación en uno o más de los fragmentos de ADN amplificados indica sensibilidad de MTb a etambutol; el ADN de MTb amplificado comprende una o más de SEQ ID NOS: 199-203, y una variación en uno o más de los fragmentos de ADN amplificados indica sensibilidad de MTb a uno o ambos de capreomicina y viomicina; y/o el ADN de MTb amplificado comprende SEQ ID NO: 204; y una variación en el segmento de ADN amplificado indica sensibilidad de MTb a uno o más de oxifloxacino, moxifloxacino, gatifloxacino, sitafloxacino, ofloxacino, levofloxacino y esparfloxacino.
- Se describen métodos para ensayar una muestra biológica para VIH resistente a fármacos, en los que los métodos comprenden amplificar el elemento de secuencia variable de SEQ ID NO: 1 usando el par de cebadores correspondiente de SEQ ID NOS: 1 y 2, y ensayar la muestra para variaciones de secuencias dentro de la secuencia amplificada usando MCA, y en los que la detección de una o más variaciones dentro del amplicón de la muestra biológica con respecto a una muestra de control o un patrón conocido es indicativa de VIH resistente a fármacos. En algunos métodos, la detección de una o más variaciones dentro del amplicón es indicativa de VIH resistente a zidovudina y/o nevirapina.
- Se describen métodos para ensayar una muestra biológica para malaria resistente a fármacos, en los que los métodos comprenden amplificar el elemento de secuencia variable de SEQ ID NO: 2 usando el par de cebadores correspondiente de SEQ ID NOS: 1 y 2, y ensayar la muestra para variaciones de secuencias dentro de la secuencia amplificada usando MCA, y en los que la detección de una o más variaciones dentro del amplicón de la muestra biológica con respecto a una muestra de control o un patrón conocido es indicativa de malaria resistente a fármacos. En algunos métodos, la detección de una o más variaciones dentro del amplicón es indicativa de malaria resistente a cloroquina.
- Se describen métodos para ensayar una muestra biológica para células cancerosas resistentes a fármacos, en los que los métodos comprenden amplificar el elemento de secuencia variable de SEQ ID NO: 1 usando el par de cebadores correspondiente de SEQ ID NOS: 1 y 2 y/o el elemento de secuencia variable de SEQ ID NO: 2 usando el par de cebadores de SEQ ID NOS: 3 y 4, y ensayar la muestra para variaciones de secuencias dentro de una o ambas de las secuencias amplificadas usando MCA, y en los que la detección de una o más variaciones dentro de uno o ambos de los amplicones de la muestra biológica con respecto a una muestra de control o un patrón conocido es indicativa de células cancerosas resistentes a fármacos. En algunos métodos, la detección de una o más variaciones dentro de los amplicones de SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 2 es indicativa de células cancerosas resistentes a epitolona y/o taxano.
- Se describen métodos para ensayar una muestra biológica para *S. cerevisiae* resistente a fármacos, en los que los métodos comprenden amplificar el elemento de secuencia variable de SEQ ID NO: 1 usando el par de cebadores correspondiente de SEQ ID NOS: 1 y 2, y ensayar la muestra para variaciones de secuencias dentro de la secuencia amplificada usando MCA, y en los que la detección de una o más variaciones dentro del amplicón de la muestra biológica con respecto a una muestra de control o un patrón conocido es indicativa de *S. cerevisiae* resistente a fármacos. En algunos métodos, la detección de una o más variaciones dentro del amplicón es indicativa de *S. cerevisiae* resistente a terbinafina.
- Se describen métodos para ensayar una muestra biológica para *S. aureus* resistente a fármacos, en los que los métodos comprenden amplificar el elemento de secuencia variable de SEQ ID NO: 1 usando el par de cebadores correspondiente de SEQ ID NOS: 1 y 2, y ensayar la muestra para variaciones de secuencias dentro de la secuencia amplificada usando MCA, y en los que la detección de una o más variaciones dentro del amplicón de la muestra biológica con respecto a una muestra de control o un patrón conocido es indicativa de *S. aureus* resistente a fármacos. En algunos métodos, la detección de una o más variaciones dentro del amplicón es indicativa de *S. aureus* resistente a vancomicina y/o β -lactama.

Tabla 1A: Regiones de ácido nucleico de MTb asociadas a resistencia a fármacos

Organismos/células	Región de destino (Gen o región)	Resistencia a fármacos/propósito
VIH	Conector RT N348I	Zidovudina / Nevirapina
Malaria	resistencia a la cloroquina transportador K76T	Cloriquina
Cancer de células humano	tubulina Beta T274I	epitolona / taxanos
Cancer de células humano	tubulina Beta R282N	epitolona / taxanos
<i>S. cerevisiae</i>	ERG1 F420L	terbinafina
Estafilococo aureus	SA1702 H164R	vancomicina / Beta-lactama
MTb v 176F	ARN polimerasa B V176F	rifampicina
MTb 80bp area caliente	ARN Polimerasa B 80bp area caliente	rifampicina rifampicina

	Organismos/células	Región de destino (Gen o región)	Resistencia a fármacos/propósito
5	MTb CIII a	ARN polimerasa B CIIIa	rifampicina
	MTb CIIIb	ARN polimerasa B CIIIb	rifampicina
10	MTb	pncA -11 hasta el codón 105	pirazinamida
	MTb	codones pncA 254-359	Pirazinamida
	MTb	codones pncA 537-545	Pirazinamida
	MTb	codones pncA 128-254	Pirazinamida
	MTb	pncA codones 374-446	pirazinamida
	MTb	pncA codones 464-519	Pirazinamida
	MTb	codones RPSL 43-88	Estreptomicina
15	MTb	Rrs	Estreptomicina
	MTb	Rrs	Estreptomicina
	MTb	fura detecta condón 5 evita condón 115	Isoniazida
20	MTb	ahpC -67 hasta el codón 5	Isoniazida
	MTb	ahpC codón 19 y 32	Isoniazida
	MTb	ahpC codón 73	Isoniazida
	MTb	ahpC codón 191	Isoniazida
	MTb	inhA codón 16-95	Isoniazida
	MTb	inhA codón 194	Isoniazida
	MTb	iniA codón 3	Isoniazida
25	MTb	iniA condones 481 y 537	Isoniazida
	MTb	mabA – 147 hasta condón 63	Isoniazida
	MTb	Rv0340 condón 163	Isoniazida
	MTb	Rv1592c codón 42	Isoniazida
	MTb	Rv1592c codones 321 y 322	Isoniazida
30	MTb	Rv1592c codón 430	Isoniazida
	MTb	katG -17 hasta codón 38	Isoniazida
	MTb	katG codones 63-128	Isoniazida
	MTb	katG codones 132-302	Isoniazida
	MTb	katG codones 313-350	Isoniazida
	MTb	katG codones 381-494	Isoniazida
	MTb	katG codones 515-595	Isoniazida
35	MTb	katG codones 617-658	Isoniazida
	MTb	katG condón	Isoniazida
	MTb	embC condón 394	Etambutol
	MTb	embC condón 733	Etambutol
	MTb	embA-43 hasta condón 14	Etambutol
40	MTb	embA condón 210	Etambutol
	MTb	embA condones 321 y 350	Etambutol
	MTb	embA condón 462	Etambutol
	MTb	embA condones 833 a 913	Etambutol
	MTb	embB condones 297 a 332	Etambutol
	MTb	embB condón 406	Etambutol
	MTb	embB condón 497	Etambutol
45	MTb	embB condón 745	Etambutol
	MTb	embB condones 955 a 1024	Etambutol
	MTb	m1A2 condón 152	Etambutol
	MTb	iniC condones 245 a 251	Etambutol
	MTb	iniA condón 308	Etambutol
50	MTb	iniA codón 501	Etambutol
	MTb	iniB -89 hasta codón 47	Etambutol
	MTb	Rv3124 -16 hasta codón 54	Etambutol
	MTb	RmlD – hasta 71	Etambutol
	MTb	RmlD condón 284	Etambutol
	MTb	embR - hasta 136	Etambutol
	MTb	embR condón 379	Etambutol
55	MTb	thyA nt7 a 64	Capreomicina / viomicina
	MTb	thyA nt 200 a 310	Capreomicina / viomicina
	MTb	thyA nt353 a 400	Capreomicina / viomicina
	MTb	thyA nt477 a 586	Capreomicina / viomicina

Organismos/células	Región de destino (Gen o región)	Resistencia a fármacos/propósito
MTb	thyA nt 653 a 758	Capreomicina / viomicina
MTb	gyrA condones 90 y 94	moxifloxacino (moxifloxacino / gatifloxacina / gatifloxacina / Ofloxacina / levofloxacina / Sparfloxacina)

MTb - Tuberculosis micobacteriana

El aislamiento de cantidades adecuadas de *Mycobacterium tuberculosis* de muestras de esputo plantea un reto significativo a la comunidad de diagnóstico molecular. Las muestras de esputo frecuentemente contienen cantidades tan bajas de MTb vivo que deben cultivarse cepas aisladas durante hasta 2 meses para garantizar cantidades suficientes de material genético para su uso en aplicaciones de diagnóstico molecular. Aunque muchas técnicas de diagnóstico molecular pueden permitir la detección de cantidades muy pequeñas de materiales de partida, de tan solo una única copia, frecuentemente es difícil garantizar que una muestra particular contenga de hecho la cantidad deseada de material de partida.

Para permitir el uso de muestras muy raras o preciadas en los procedimientos de diagnóstico molecular, se ha empleado una técnica conocida como amplificación del genoma completo para enriquecer el material de partida para su uso en los procedimientos de diagnóstico molecular aguas abajo. Como tales, algunas realizaciones de métodos descritos en el presente documento aplican métodos de amplificación del genoma completo al problema de cribar muestras de esputo que contienen MTb. También pueden usarse diversos métodos proporcionados en el presente documento para detectar la presencia o ausencia de una o más secuencias de ácidos nucleicos en una muestra que contiene un ácido nucleico o mezcla de ácidos nucleicos, o para distinguir entre dos secuencias diferentes en una muestra tal.

Se describen métodos para mejorar la detección de secuencias de ácidos nucleicos en muestras biológicas usando PCR en tiempo real, colorantes de unión a ADNbc y enfoques basados en sonda fluorescente.

Se describen métodos para preparar ácidos nucleicos de microorganismo para la amplificación y el análisis de alta resolución. Pueden aislarse microorganismos, tales como *Mycobacterium tuberculosis* (MTb), usando protocolos de fraccionamiento de muestras convencionales, y los ácidos nucleicos del microorganismo pueden extraerse y amplificarse usando métodos bien conocidos, novedosos o aún por establecer.

Tras el enriquecimiento y la amplificación molecular, los ácidos nucleicos se criban en diversos aspectos para la presencia de cualquiera de una variedad de marcadores genéticos usando un método cuantitativo tal como PCR. También pueden cuantificarse ácidos nucleicos para análisis aguas abajo. Puede usarse cualquier método de cuantificación, que incluye, pero no se limita a, análisis por qPCR, análisis UV, análisis en gel y kits de cuantificación de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones se realiza una amplificación final de los ácidos nucleicos para amplificar ácidos nucleicos y segmentos de los mismos de interés, tales como dianas de susceptibilidad a fármacos (por ejemplo, antibiótico). Pueden usarse colorantes de saturación para seguir la amplificación, hibridación y desnaturalización de ácidos nucleicos.

En algunos métodos, los ácidos nucleicos diana amplificados pueden monitorizarse durante la hibridación y/o la desnaturalización usando técnicas de monitorización de alta resolución, tales como aquellas que miden cambios en la fluorescencia asociados a cambios en la estructura y/o la conformación de los ácidos nucleicos, tales como aquellos que acompañan a la hibridación y fusión. Similarmente pueden monitorizarse en paralelo ácidos nucleicos diana de control. Las variaciones detectadas entre los ácidos nucleicos diana (por ejemplo, región de susceptibilidad a fármacos) y los ácidos nucleicos de control pueden ser indicativas de susceptibilidad reducida (por ejemplo, resistencia) a fármacos que se dirigen a regiones particulares de los productos génicos formados a partir de los ácidos nucleicos diana.

Se describen métodos de aislamiento, amplificación y análisis de ácidos nucleicos diana de un microorganismo, tal como MTb, como se describen más adelante y en toda la memoria descriptiva. En otras realizaciones pueden aislarse ácidos nucleicos diana, tales como aquellos expuestos en la Tabla 1, de muestras celulares o clínicas por métodos establecidos en la materia.

En algunos métodos, MTb aislado se fracciona de una muestra de esputo usando un método de preparación de organismos vivos convencional, tal como el método de Petroff, que deja pequeñas cantidades del organismo MTb en una suspensión acuosa. Los ácidos nucleicos de MTb se aíslan de la muestra usando el kit comercialmente disponible MycoBuffer (RAOGene; Milford, PA) según instrucciones del fabricante, de forma que al menos pequeñas cantidades de ADN de MTb se aíslan en el material residual del producto de MycoBuffer. Pueden aislarse cantidades mayores de ADN.

Las muestras de ADN obtenidas del uso de la disolución de lisis se someten a un cribado primario para ADN de MTb

usando cualquier método de amplificación de ADN que inhiba o elimine la formación de productos de ácido nucleico no específicos. Por tanto, el método de amplificación puede realizarse durante periodos de tiempo prolongados para explicar la baja cantidad de ADN normalmente presente en los lisados primarios. Cebadores a modo de ejemplo que cubren estas regiones de interés se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2: Cebadores a modo de ejemplo para la amplificación de regiones diana

Organismo	Objetivo	Seq. No.	Adelante	Atrás	Adhesión#
VIH	RT Conector N3481	1	AAGGCCAATGGACATATC AAA	GGGCACCCCT CATTCTT	NP_705927
Malaria	resistencia a la cloroquina transportador K76T	3	TATTTATTTAAGTGTATGT GTAATG	CAATTTTGT AAAGTCTTT TAGC	MAL7P1.27
Cancer de células humano	tubulina Beta T274I	5	TCCACGTCCTCAATT	TGAGTTCCGG CACTGT	NP_821133
Cancer de células humano	tubulina Beta R282N	6	TCCACGTCCTCAATT	TGAGTTCCGG CACTGT	NM_178014
S. cerevisiae	ERG1 F420L	7	TTCAATGCTAAGAATCCTG CTC	AGATTGGCAT ATGATCACTA CC	MB4984
estafilococo aureus	SA1702 H164R	9	AAAGCTGCAAATATTAAG GA	GGCAATATAA CCTGCAC	NC_002745
MTb v176F	ARN polimerasa B V176F	11	GAGCGTGTGGTGGTCAG	CGTCTTGTCG GTGGACT	BX842579
MTb 80bp Area caliente	ARN Polimerasa B 80bp area caliente	13	CAAAGGAGTCTTCGGCAC C	GGACCTCCAG CCCGGCA	
MTb CIIa	ARN polimerasa B CIIa	15	GGTGGCACAGGCCAAT	GAAAGCACC TCCGCA	
MTb CIIIb	ARN polimerasa B CIIIb	17	CGCGCGTGTGGTC	TCCATGTAGT CCACCTCAG	
MTb	pncA -11 a 105	19	CAGTCGCCCGAACGTA	TGGTAGTCCG CCGCT	NC_000962
MTb	pncA 254-359	21	CAATCGAGGCGGTGTCT	CGACGCCCGG TTG	
MTb	pncA 537-545	23	GATGGCACCAGCCA	GCGGTGCCAT CAGGAG	
MTb	pncA 128-254	25	GCGGGGACTACCAT	GATTGCCGAC GTGTCCAG	
MTb	pncA 374-446	27	GCAACGGCGCGTC	CCCCTGGTGGC CAAAGC	

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

(continua)

Organismo	Objetivo	Seq. No.	Adelante	Atrás	Adhesión#
MTb	prnCA 484 a 519	29	GCTTGGCCACCAGGG	CTGGCGGTGC GCATC	
MTb	rpsL	31	CCGGCGGTGTACACCACCA	AGGCACACC AGGCAG	AF367438
MTb	rfs	33	GGATTGACGGTAGGTGGA GA	ACGCTCGCAC CCTACGTATT A	cp000717.1
MTb	rfs	35	CCCGCCTGGGGAGT	CATGCTCCGC CGCTT	L15307.1
MTb	fura detecta condón 5 evita condón 115	39	TAGCCAAAGTCTTGACTG AT	GGCATTACAC TGCTTC	Rv1909c
MTb	ahpC -67 hasta el condón 5	39	TGTGATATATCACCTTTGC CT	CGGGGAATTG ATCGCC	Rv2428
MTb	ahpC condón 19 y 32	41	ACCAGCTCACCGGTC	GGTGATAGTG GTGAAGTAGT	
MTb	ahpC condón 73	43	GCGTTCAGCAAGCTCA	CGCGAATTGG CTGTCA	
MTb	ahpC condón 181	45	CTGTGCGCATGCAAC	TCCCGGTTAG GCCGA	
MTb	inhA condón 16-95	47	CAAACGGATTCTGGTTAG CG	GGTTGATGCC CATCCCG	Rv 1484
MTb	inhA condón 194	49	CAAGTACGGTGTGCGTT	GCCGACGATC GCACTC	Rv1484
MTb	inhA condón 3	51	GAGCCGATTTCACGAACC	CTCGTTTACG CCTCAGA	
MTb	iniA condones 481 y 537	53	TGGGCCGGATGGAATC	GACGACGAAC GAAATGT	Rv0342
MTb	mabA - 147 hasta condón 63	55	CTGCTGCGCAATTGTA	GATCCCCCGG TTTTCTT	Rv1483
MTb	Rv0340 condón 163	57	GCCGACAGACCA TCC	GTCGTAGCCG TGATGA	Rv0340

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

(continua)

Organismo	Objetivo	Seq. No.	Adelante	Atrás	Adhesión#
MTb	Rv1592c aa42	59	TCCGACGATCCGTTCTAC	GAGCGCAACA CCGTTCC	Rv1592c
MTb	Rv1592c aa321-322	61	GACTTCTCGACGAACC	GCCTGCACGA TCAATACC	Rv1592c
MTb	Rv1592c aa430	63	TTC AACCCGATGACCTAC G	GGTGATCACC TTGGCCG	Rv1592c
MTb	katG -17 hasta codón 38	65	TGGGGTCTATGTCCCTGA	GCAGTACCTT CAGATTGAG	Rv1908c
MTb	katG codones 63-128	67	GGCTCAA TCTGAAAGGTAC T	GGGCCAGCTG TTAAG	Rv1908c
MTb	katG codones 132-302	69	TTGGGGGGCGTTAAC	GGTTCCGGTG CCATAC	Rv1908c
Mtb	katG codones 313-350	71	GTATGGCACCGGAACC	TCCTTGGGG TGTATTG	Rv1908c
Mtb	katG codones 381-494	73	CGCTCCCCGACGATG	GACTTGTGGC TGCAGG	Rv1908c
MTb	katG codones 515-595	75	CCTGCAGCCACAAGT	GCAGGTTCCG CTTGTC	Rv1908c
Mtb	katG codones 617-658	77	CGGCCGAGTACATGC	GGCTCCCAAG TGATAC	Rv1908c
Mtb	katG codón	79	GGCAAGGATGGCAGT	GCACGTCGAA CCTGT	Rv1908c
MTb	embC394	81	GGGGGCATGTTTCT	GGCGATGATC GGCTC	embC
MTb	embC733	83	GGCGATGATTTCCAGT	GCCAAAGCCT GTAGGT	embC
MTb	embA-4314	85	T CGGGGACAACCTCC	GCCCCGGATA CCAGAG	embA
MTb	embA 210	87	ACTCGGTTTATCACGAGC	CCATGGCTAC CAGGAC	embA

(continua)

Organismo	Objetivo	Seq. No.	Adelante	Atrás	Adhesión#
MTb	embA321350	89	GTATACATCGGTGCTTGC	GCACCAGCGG TGAACA	embA
MTb	embA462 FOR	91	GCGACCGATGGACTG	CCACCACGGT GATCAG	embA
MMTb	embA633913	93	CGCCATCACOGACTC	TTGCGGTCCG ATGTC	embA
MMTb	embB 297 & 332	95	TTCGGCTTCTGCTCT	GGTTTGTGG CCTCC	embB
MTb	emb 406	97	TCAACAACGGCCTGC	ATGGACCGCT CGATCA	embB
MMTb	emb 497	99	CACCGTCATCCTGACC	TTTTGGGCG AACCC	embB
MTb	embB 745	101	GGCTGGTCCAACGTG	GCATTGGTAT CAGGCTCG	embB
Mb	embB 9551024	103	TTGCCCCGAGCAAG	CCGTTAGTGC CGTCT	embB
MTb	rm1A2 152	105	ATGTCACGCTGCAAC	GATCCTCCGT CTTCTCCA	rm1A2
MTb	iniC 245 251	107	CGGAACTGAACCAGA	GCGGTATGCG CCTTA	iniC
MTb	iniA 308	109	GAGCAGGTGCTTTCCC	CTCTGTTGCC GAACG	iniA
MTb	iniA 501	111	GGGTTCCCTATGGCGG	GGTTGAACAA CCCAAGTC	iniA
MTb	iniB -89 47	113	CGATCCCAGATAGGTGTTT	GGCACCCAGA TTCAGAC	iniB
MTb	Rv3124 -16 54	115	ATCACAGGAGTGAGATT	AAGATGTTGC GCGAAT	Rv3124
MTb	RmID -71	117	TACGAACCCACACGTTGC	GTTGGCTACC CGACAG	RmID

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

(continua)

Organismo	Objetivo	Seq. No.	Adelante	Atrás	Adhesión#
MTb	RmlD 284	119	GCTTGACGCCGCTAC	GAAAGTTGAGT TCGCAGGT	rmlD
MTb	embR -136	121	CAGCCGATGCCGCTG	CGCCGATGCCG GTAAGAA	embR
MTb	embR 379	123	ACAGCGCCAAAGTCA	GACGATCCGA GGTCGT	embR
MTb	thyA nt7 a 64	125	TCGCCGCTAGGCTGA	ATCTGCTGGC CGAAC	thyA
MTb	nt120010310	127	CGGGTACGCCCAAAT	CCAGATGGTG ACTCCG	thyA
MTb	thyA nt353 a 400	129	ATCCAAATATCGGTTGGC	CCACGATCCG CATTGT	thyA
MTb	thyA nt477 a 566	131	GGTGAGCACATCGACC	ATAGCTGGCG ATGTTGA	thyA
MTb	thyA nt 653 a 750	133	CGCCGACCTGTTTCT	CGGCTAGAAG TAGTTTCG	thyA
MTb	gyrA 9094	135	GCAACTACCACCCGCA	GTAGCGCAGC GACCA	gyrA

MTb- tuberculosis micobacteriana

En partes adicionales de la divulgación, las muestras de ADN obtenidas del uso de la disolución de lisis se combinan, tanto tras los resultados del cribado primario como simultáneamente al cribado, con componentes de reacción similares a aquellos usados en los procedimientos de amplificación del genoma completo.

Sin embargo, pueden utilizarse otros procedimientos de amplificación adecuados que permitan que las muestras de ADN se amplifiquen a una cantidad adecuada de ácido nucleico genómico. Los procedimientos de amplificación del genoma completo pueden proporcionar el enriquecimiento molecular de las muestras de ADN con aumentos en las cantidades del genoma de MTb superiores a 30 veces en menos de 16 horas de tiempo de incubación. La amplificación del genoma completo solo necesita usarse si no hay molde suficiente para obtener una amplificación primaria.

El ADN enriquecido se purifica posteriormente usando cualquiera de una variedad de métodos para purificar ADN. Por ejemplo, puede usarse un sistema de placa filtrante capaz de acomodar 96 o más muestras simultáneas para purificar una matriz de muestras de ADN enriquecido. El ADN enriquecido y purificado se somete a un protocolo de amplificación por PCR de MTb o específico de *Mycobacterium* general, y se determina la cantidad o concentración de ADN. Por ejemplo, puede usarse PCR cuantitativa en tiempo real para amplificar y determinar la cantidad de ADN de MTb en la muestra. La purificación no es necesaria si no se usa amplificación del genoma completo.

La concentración de la muestra se ajusta con el fin de hacer coincidir la concentración del ADN de MTb enriquecido con el ADN de MTb de control para lograr una relación de aproximadamente 1:1 u otra relación predeterminada y fija. Esto permite una relación casi equivalente del ADN de MTb enriquecido con la del ADN de control que va a usarse en etapas de detección posteriores. El ADN de MTb enriquecido que se ha normalizado para la concentración se co-amplifica con el ADN de MTb de control que contiene la secuencia de genes de referencia para la región del ácido nucleico diana. Es decir, el ADN de MTb de control contiene una región de gen (por ejemplo, secuencia) que si es variante, es indicativa de una susceptibilidad reducida (por ejemplo, resistencia) del organismo MTb a fármacos (por ejemplo, fármacos antibióticos o antimicóticos) que se dirigen a la región del gen. Regiones del gen a modo de ejemplo y sensibilidades a fármacos correspondientes amplificadas por los pares de cebadores presentados en la Tabla 2 se proporcionan en la Tabla 3. Estas regiones permitieron la determinación de resistencia a fármacos o sensibilidad en infección por *Mycobacterium tuberculosis*, además de para ejemplos de sensibilidad a zidovudina en VIH, sensibilidad a taxano en cánceres humanos, sensibilidad a cloroquina en malaria, sensibilidad a terbinafina en *S. cerevisiae* y sensibilidad a vancomicina en *S. aureus*.

Tabla 3: Regiones a modo de ejemplo para la prueba de sensibilidad a fármacos de MTb

Organismo	Fármaco	Amplicón-sensibilidad	SEQ ID NO	Diseño Tm	Referencia
VIH	Zidovudina/Nevirapine	AAGGCCAATGGACAT	137	75.1	www.plosmedicine.org 1690 December 2007 volume 4, Issue 12
		ATCAAAATTTATCAAGA			
		GCCATTTAAAAAATCTIG AAAACAGGAAAAATAT GCAAGAATGAGGGGT GCCC			
Malaria	Cloroquina	TATTTAATTTAAAGTGTA	138	64.5	The Journal of Infectious Diseases 2001; 183:14 13-6
		TGIGTAAATGAATAAA			
		ATTTTGTCTAAAAGAA CTTTAAACAAAATTG TCCCACGTCCTCCATTC TTTATGCTGGCTTTGC CCCTCTCACCCAGCCGT GGAAGCCAGCAGTATC GAGCTCTCACAGTGCC GGAACTCA			
Cancer de células humano	epotilona / taxanos	TCCCACGTCCTCCATTC	139	84.4	PNAS March 14, 2000 vol. 97 no. 6, páginas 2904-2909
		TTTATGCTGGCTTTGC			
		CCCTCTCACCCAGCCGT GGAAGCCAGCAGTATC GAGCTCTCACAGTGCC GGAACTCA			
Cancer de células humano	epotilona / taxanos	TCCAATGCTAAGAATC	140	84.4	PNAS March 14, 2000 vol. 97 no. 6, páginas 2904-2909
		CTGCTCCATGCAACGG			
		TCAACGTTAATCTTTGGTA GTGATCATATGCCAAT CT			
S. cerevisiae	terbinafina			75.3	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Dec. 2003, p. 3890-3900 Vol. 47, No. 12

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

(continua)

Organismo	Fármaco	Amplicón-sensibilidad	Seq ID NO	Diseño Tm	Referencia
S. aureus	vancomicina / Beta-lactama	AAAGCTGCAAATATT	141	71.4	PNAS _ May 29, 2007 _ vol. 104 no. 22 _ 9451-9456
		AAGGAAAATAATACC			
		ATTGTTGTTAGACACA			
		TTTTAGGTAAAGTGCA			
		GGTTATAATTGCC			
		GAGCGTGTGGTGGTC	142		
		AGCCAGCTGGTGGGT		85.7	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, JUNI 2005, p. 2200-2209 Vol. 49, No. 6
		CGCCCGGGGTACTT			
		CGACGAGACCAATTGAC			
		AAGTCCACCCGACAAGA			
		CG			
		CAAGGAGTCTTCGG	143		
		CACCAGCCAGCTGAGC			
		CAATTCATGGACCAGA			
		ACAACCCGCTGTCCGG		90.8	JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, May 2003, p. 2209-2212 Vol. 41, No. 5 ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Oct. 1994, p. 2360-2366 Vol. 38, No. 10
		GTTGACCCACAAGCCG			
		CGACTGTCCGGCGTGG			
		GGCCCGCGGTCTGTCTC			
		ACGTGAGCGTGCCCGGG			
		CTGGAGGTCC			
		GGTGGCACAGGCCAA	144	90.9	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, JUNI 2005, p. 2200-2209 Vol. 49, No. 6
		TTCGCCGATCGATGCG			
		GACGGTCCGCTTC			
		CCCGCGGTGCTGGTC	145	87.8	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, JUNI 2005, p. 2200-2209 Vol. 49, No. 6
		CGCCGCAAGCGGGCG			
		AGGTGGAGTACGTGCC			
		CTCGTCTGAGGTGGAC			
		TACATGGA			

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

(continua)

Organismo	Fármaco	Amplicón-sensibilidad	SEQ ID NO	Diseño T _m	Referencia
MTb	Piracinamida	CAGTCGCCGAAACGT ATGGTGGACGTATGCG GGCGTTGATCATCGTC GACGTGCAGAACGACT TCTGCCAGGGTGGCTC GCTGGCGGTAACCGGT GGCCCGCGCTGGCCC GGCCATCAGCGACTA CCTGGCCGAAGCGGCG GACTACCA	146	91.2	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Aug 2004, p. 3209-3210 Vol. 48, No. 6, Microbiology (1997), 143, 3367-3373, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Feb 2007, p. 595-599 Vol. 45, No. 2
MTb	Piracinamida	CAATCGAGGGGTGT TCTACAAGGGTGCCTA CACCGAGCGTACAGC GGCTTCGAAGGAGTGG ACGAGAACGGCACGCC ACTGCTGAATTGGCTG CGGCAAGCGGGCGTGG GATGGCACCCGCCAG CGTCGAGTTGGTTTGC AGCTCCTGATGGCACC GC	147	87.0	Como arriba
MTb	Piracinamida	GGGGGGACTACCAT CACGTGTTGGCAACCA AGGACTTCCACATCGA CCCGGGTGACCACTTC TCCGGCACACCCGGACT ATTCTCGTCGTGGCC ACCGCAATTGGTCAAGC GGTACTCCCGGCGCGG ACTTCCATCCCAGTCT GGACACGTCGGCAATC	148	83.1	Como arriba
MTb	Piracinamida		149	89.5	Como arriba

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

(continua)

Organismo	Fármaco	Amplicón-sensibilidad	SEQ ID NO	Diseño Tm	Referencia
MTb	Piracinamida	GCAACGGGGCGTCCA	150	84.3	Como arriba
		TGAGGTCGATGTGGTC			
		GGTATTGCCACCCGATC			
		ATTGTGTGCCCCAGAC			
		GGCCGAGGACCCGGTA			
		CGCAATGGCTTGCCCA			
		CCAGGG			
		GCTTGGCCACCAGGG			
		TGCTGGTGGACCTGAC			
		AGCGGTGTGTGGGCC			
MTb	Piracinamida	GATACCACCGTCGCCG	151	90.1	Como arriba
		CGCTGGAGGAGATGCC			
		CACCGCCAG			
		CCGCGTGTACACCAC			
		CACTCCGAAGAAGCCG			
		AACTCGCGCTTCGGA			
		AGGTTGCCCGCGTGAA			
		GTTGACGAGTCAGGTC			
		GAGGTCACGGCGTACA			
		TTCCCGCGAGGGCCA			
MTb	Estreptomicina	CAACCTGCAGGAGCAC	152	91.5	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 1994, p. 228-233 Vol. 38, No. 2; ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Oct. 2001, p. 2877-2884 Vol. 45, No. 10; JOURNAL OF BACTERIOLOGY, May 2005, p. 3548-3550 Vol 187, No. 10;
		TCGATGGTGTCTGGTGC			
		GCGGGCGCCGGGTGAA			
		GGACCTGCCTGGTGTG			
		CGCT			
		GGATTGACGGTAGGT			
		GGAGAAGAAGCACCCG			
		GCCAACTACGTGCCAG			
		CAGCCGCGTAATACG			
		TAGGGTCCGAGCGT			
MTb	Estreptomicina	GGATTGACGGTAGGT	153	84.5	Como arriba
		GGAGAAGAAGCACCCG			
		GCCAACTACGTGCCAG			
		CAGCCGCGTAATACG			

(continua)

Organismo	Fármaco	Amplicón-sensibilidad	SEQ ID NO	Diseño T _m	Referencia
MTb	Estreptomicina	<p>154</p> <p>CCCGCTGGGGAGTA CGGCCGCAAGGCTAAA ACTCAAAGGAATTGAC GGGGCCCGCACAAAGC GGCGGAGCATG</p>	154	86.7	Como arriba
MTb	Isoniacida	<p>155</p> <p>TAGCCAAAGTCTTGA CTGATCCAGAAAAG GGAGTCATAATTGTCTA GTGTCTCCTCTATACC GGACTACGCCGACACAG CTCCGGACGGCCGACC TGCCGGTGACCCCGACC GGCCGTCGCCCGTCCCTG GAAGCAGTGAATGCCG</p>	155	86.82	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Apr. 2003, p. 1241-1250 Vol. 47, No. 4,
MTb	Isoniacida	<p>156</p> <p>TGTGATATATCACCT TTGCCCTGACAGCGACT TCACGGCACGATGGAA TGTCGCAACCAAATGC ATTGTCGGCTTTGATG ATGAGGAGAGTCAATGC CACTGCTAACCAATTGG CGATCAAAATCCCCCG</p>	156	83	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Mar. 1997, p. 600-606 Vol. 41, No. 3; ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Aug. 2006, p. 2640-2649 Vol. 50, No. 8;
MTb	Isoniacida	<p>157</p> <p>ACCAGCTCACCGCTC TCATCGCGGTGACCT GTCCAAGGTCGACGCC AAGCAGCCCGGGACT ACTTCACCACTATCAC</p>	157	85.7	Como arriba

C.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

(continua)

Organismo	Fármaco	Amplicón-sensibilidad	SEQ ID NO	Diseño Tm	Referencia
MTb	isoniacida	GCGTTCAGCAAGCTC	156	84	Como arriba
		AATGACGAGTTCGAGG			
		ACCCGACGCCAGAT			
		CCTGGGGTTTCGATT			
		GACAGCGAATTCGGG			
		CTGTGGCATGCAAC			
		TGGGCAAGGGCGACC			
		CGACGCTAGACGCTGG			
		CGAATCCTCAAAGGCT			
		TCGGCCTAACCGGA			
MTb	isoniacida	CAACGGATTCTGGT	159	87.4	Como arriba
		TAGCGGAATCATCACC			
		GACTCGTCGATCGCGT			
		TTCACATCGCACGGGT			
		AGCCAGGAGCAGGG			
		CGCCAGCTGGTGTCTC			
		ACCGGTTTCGACCGGC			
		TGCGGCTGATTCAGCG			
		CATCACCGACCGGCTG			
		CCGGCAAAGGCCCCGC			
MTb	isoniacida	TGCTCGAACTCGACGT	160	92.6	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Vol. 40 2006, p. 2840-2849 Vol. 50, No. 8
		GCAAACGAGGAGCA			
		CCTGGCCAGCTTGGCC			
		GGCCGGGTGACCCGAGG			
		CGATCGGGCGGGCAA			
		CAAGCTCGACGGGGTG			
		GTGCATTCGATTGGGT			
		TCATGCCCGACGCCGG			
		GATGGCATCAACC			

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

(continua)

Organismo	Fármaco	Amplicón-sensibilidad	SEQ ID NO	Diseño Tm	Referencia
Mtb	isoniacida	AAGTACGGTGTCGGT TCGAATCTCGTTGCCG CAGGCCCTATCCGGAC GCTGGCGATGATGCG ATCGTCGGCGGTGCCG TCGGCGAGGAGGCCGG CGCCAGATCCAGCTG CTCGAGGAG	161	90.4	Como arriba
Mtb	isoniacida	GAGCCGATTCACCGA ACCGTGGGGACGTTG ATGGTCCCGCCGGTT TGTCCGATACCCGTGA TCTGAGCGTAAACGA G	162	84.5	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Apr 2003, p. 1241-1250 Vol. 47, No. 4
Mtb	isoniacida	TGGCCCGATGGAAT CGAAACCGCTGCCCG GGCCATAAAATGATT ATCGGCATGCCGGGTT CCTATGGCGCGGTGGT CATGATTGGCATGCTG TCGTCCGTGGTCCGGAC TTGGGTGTTC AACCC GCTATCGGTGGGGGCC GGGTTGATCCTCGGCC GGATGGCATATAAAGA GGACAACAAAACCCG GTTGTCGGGTGGCGC AGCGAGGCCAAAGGCC AATGTGGCGCGCTTCG TCGACGACATTCGTT CGTCGTC	163	90.2	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Apr 2003, p. 1241-1250 Vol. 47, No. 4

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

(continua)

Organismo	Fármaco	Amplicón-sensibilidad	SEQ ID NO 164	Diseño Tm	Referencia
MTb	Isoniacida	CTGCTGCGCAATTTCG TAGGGGTCAATACAC CCGCAGCCAGGGCCTC GCTGCCAGAAAGGA TCCGTGATGGTCGAAG TGTGCTGATCACACC GACAAAAGTCACGAGC GTAACCCAGTCCGAA AGTTCCCGCCGAAAT CGCAGCCACGTTACGC TCGTGGACATAACCGAT TTCCGCCCGCCCGCGG CGAGACGATAGGTTGT CGGGTGA CTGCCACA GCCACTGAAGGGGCA AACCCCAATTCGTATC CCGTTGAGTCTGTT ACCGGAGGAAACCGG GGGATC	90.5	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Apr. 2003, p. 1241-1250 Vol. 47, No. 4	
MTb	Isoniacida	GCCGACAGACCATCC GGCTGTCTGGAACCCAC CCGGTCGTTGACCCAC ATACCGTCGAGCCCGA TCATCACGGCTACGAC	165	85.3 ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Apr. 2003, p. 1241-1250 Vol. 47, No. 4	
MTb	Isoniacida	TCCGACGATCCGTTTC TACTTCCCACTGCGCG GCTACCAGCATGCCGT GCCCGGAACGGTGTTC CGCTC	166	85.8 ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Apr. 2003, p. 1241-1250 Vol. 47, No. 4	

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

(continua)

Organismo	Fármaco	Amplicón-sensibilidad	Seq ID NO	Diseño T _m	Referencia
Mtb	Isoniacida	GACTTCCTCGACGAA CCCCITGAGGACATTC TGTCGACGCCGGAAT TTCCCATGTCTTCGGC GACACCAAGCTGGGTA GCGCGGTGCCACCC GCCGGTATTGATCGTG CAGGC	167	87.4	Como arriba
Mtb	Isoniacida	TTCAACCCGATGACC TAGCCGGCATGGCGA GACTGGCCGTGATCGC GGCCAAGGTGATCACC	168	84.7	Como arriba
Mtb	Isoniacida	TGGGTTAIGTCCCT GATTGTCGATATCCG ACACTTCGGATCACA TCCGTGATCACAGCCC GATAACACCAACTCCT GGAAGGAA TGCTGTGC CCGAGCAACACCCACC CATTACAGAAACCACC ACCGGAGCCGCTAGCA ACGGCTGTCCCCTCGT GGTCAATGAAATAC CCCGTCGAGGGCGGCG GAACCAAGGACTGGTG GCCCAACCGGCTCAA GTATACITTTATGGGGC AGCTCCCGCCGCCITTT GGTCCCTGACCACCGGG TTGGCCGAGTTTCTGA AGGTACTGC	169	88.9	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Aug. 2005, p. 2640-2649 Vol. 50, No. 8, ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Oct. 2005, p. 4068-4074 Vol. 49, No. 10; JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Oct. 2003, p. 4630-4635 Vol. 41, No. 10

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

(continua)

Organismo	Fármaco	Amplicón-sensibilidad	SEQ ID NO	Diseño Tm	Referencia
Mycobacterium tuberculosis	Isoniacida	GGCTCAATCTGAAGG TACTGCACCAAACCC GGCCGTGGCTGACCCG ATGGGTGCGCGTTTCG ACTATGCCCGCGGAGGT CGCGACCATCGACGTT GACGCCCTGACCGGGG ACATCGAGGAAAGTGAT GACCACCTCGCAGCCG TGGTGGCCCGCCGACT ACGGCCACTACGGGCC GCTGTTTATCCGGATG GCGTGGCACGCTGCCG GCACCTACCGCATCCA CGACGGCCGCGGCGGC GCCGGGGGGGGCATGC AGCGGTTCCGCGCCGCT TAACAGCTGGCCC	174	94,7	Como arriba

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

(continua)

Organismo	Fármaco	Amplicón-sensibilidad	Seq ID NO 171	Diseño Tm	Referencia
MITO	isoniacida	TTGGCGCGCTTAAC AGTGGCCCGACAACG CCAGCTTGGACAAGGC GCGCCGGCTGCTGTGG CCGGTCAAGAAGAAGT ACGGCAAGAAGCTCTC ATGGCGGACCTGATT GTTTCGCCGGCAACT GCCGCTGGAAATCGAT GGCCTCAAGACGTTG GGGTCGGCTTCGGCC GGGTCGACCAGTGGGA GCCCGATGAGGTCTAT TGGGGCAAGGAAGCC ACCTGGCTCGCGGATG AGCGTTACAGCGGTAA GCCGGATCTGGAGAAC CCGCTGGCCCGCGGTGC AGATGGGCTGATCTA CGTGAACECGGAGGGG CCGAACGGCAACCCGG ACCCCATGGCCCGCGGC GGTCGACATTCGCGAG ACGTTTCGGCGCATGG CCATGAACGACGTCGA AACAGCGGCCCGCCAG			Como arriba

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Organismo	Fármaco	Amplicón-sensibilidad	SEQ ID NO	Diseño Tm	Referencia
Mito	Isoniacida	(continua) CTGTAAGCGCTCTGCA AAGCCGCTACCGGTA CTTGCTGCAGCTTTGTC GCCGGCTGATCGTCGG CGGTCACACTTTCGGT AAGACCCATGGCGCCG GCCGGCCGATCTGGT CGGCCCGAACCCGAG GCTGCTCCGCTGGAGC AGATGGGCTTGGGCTG GAAGAGCTCGTAGCCG GGGCTTGGGCTCCGAC GAGGGACCTCGTCTA CCCGAACCCGACCTTC TCGAGCA TTGCCACCG GAACC GTATGGCACCCGGAAC CGGTAAGGAGCGCGATC ACCAGCGGCATCGAGG TCGTATGGACGAAACAC CCCGACGAAATGGGAC AACAGTTTCCTCGAGA TCCTGTACGGCTACGA GTGGGAGCTGACGGAAG AGCCCTGCTGGGCGCT GGCAATACACCCGCCAA GGA	177	87.8	

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

(continua)

Organismo	Fármaco	Amplicón-sensibilidad	SEQ ID NO	Diseño Tm	Referencia
Mm	Isoniacida	CGCTCCCCGACGATG CTGGCCACTGACCTCT CGCTGCGGGTGGATCC GATCTATGAGCGGATC ACGGTCCGCTGGCTGG AACACCCCGAGGAATT GGCCGACGAGTTCCGC AAGCCCTGGTACAAGC TGATCCACCGAGACAT GGGTCCCGTTGCGAGA TACCTTGGGCCCGCTGG TCCCAAGCAGACCCCT GCTGTGGCAGGATCCG GTCCCTGCCGTCAGCC ACGACCTCGTCGGCGA AGCCGAGATTGCCAGC CTTAAGAGCCAGATCC GGGCATCGGGATTGAC TGTCTCACAGCTAGTT TCGACCCGATGGGCGG CGGCGTCGTCGTTCCG TGGTAGCGACAAGCGC GGCGGCGCCAAGGGTG GTCGCATCCCGCCTGCA GCCACAAGTC	173	92.5	Como arriba
MTb	Isoniacida	CCTGCAGCCACAAGT CGGGTGGGAGGTCAAC GACCCCGACGGGGATC TCCGCAAGGTCAATTCG	174	81.7	Como arriba

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

(continua)

Organismo	Fármaco	Amplicón-sensibilidad	Seq ID NO.	Diseño T _m	Referencia
M10	isoniacida	CACCCTGGAAGAGATC CAGGAGTCATTCAACT CCGCGGCCCGGGGAA CATCAAAGTGTCTTC GCCGACCTCGTCGTGC TCGGTGGCTGTGCCGC CATAGAGAAGCAGC AAAGGCGGCTGGCCAC AACATCACGGTGCCCT TCACCCCGGGCCGCAC GGATGCGTCCAGGAA CAAACCGACGTGGAAT CCTTTGCCGTGTGGA GCCC AAGGCAGATGGC TTCCGAAACTACCFCG GAAGGGCAACCCGTT GCCGGCCGAGTACATG CTGCTCGACAAGGCGA ACCTGC	175	89.4	Como arriba
		CGGCCGAGTACATGC TGCTCGACAAGGCGAA CGTGTACGCTCAGT GCCCTGAGATGACGG TGCTGTAGGTGGCCT GCCGTCCTCGGGCCA AACTACAAGCGCTTAC CGCTGGCCGTGTTCAC CGAGGCCCTCCGAGTCA CTGACCCAACGACTTCT TCGTGAACCTGCTCGA CATGGGTATCACCTGG GAGCC			

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

(continua)

Organismo	Fármaco	Amplicón-sensibilidad	SEQ ID NO	Diseño Tm	Referencia
Mtb	isoniacida	GGCAAGGATGGCAGT GGCAAGGTGAAGTGG ACCGCAGCCCGTGG ACCTGGTCTTCGGGTC CAACTCGGAGTTGCCG GGCTTGTCCGAGGTCT ATGGCCCGATGACCG GCAGCCGAAGTTCGTG CAGGACTTCGTCCGCTG CCTGGACAAGGTGAT GAACCTCGACAGGTTT GACGTGC	176	90.3	Como arriba
Mtb	etambutol	GGCGGATGTTTCT GGCTGTCTGGCTGCCG CTGGACAACGGCCCTTC GGCCCGAGCCGATCAT CGCC	177	87.6	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2
Mtb	etambutol	GGCGATGATTTCCCA GTACCCGGCGTGGTCCG GTTGGCCGGTCTAACCC TACAGGCTTTGG	178	82.2	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2
Mtb	etambutol	TCGGCGACACCTTCC GCGGCCCGCATCCTC	179	92.9	ANTIMICROBIAL AGENTS AND

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

(continua)

Organismo	Fármaco	Amplicón-sensibilidad	seq ID NO.	Diseño Tm	Referencia
Mtb	etambutol	ACGGCCCTTAACGGCG	100	87.5	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2
		TCCCTAACCATCGAGC			
		CTCGTGCCCCACGACG			
		GTAATGAGCGGATCTCA			
		CCGGATCGCACGGCTA			
		GCAGCCGTCTGTCGG			
		GAATCGGGGTCTGCT			
		GCTGTGCGGCATCGTT			
		CCGTGCTTCCGGTGA			
		ACCAAACCCACCGCGAC			
CATCTTCTGGCCGCGAG					
GGCAGCACGGCGGACG					
GCAACATCACCCAGAT					
CACCGCCCTCTGTA					
TCCGGGGC					
ACTCGGTTTATCAGG	101	94.7	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2		
ACGCCCGGGCGCTCA					
AGAAGGCCGTGATGCT					
CCTCGCGGTGCTGGCG					
GTCCTGGTAGCCATGG					
GTATACATCGGTGCT					
TGCCCAGCTGGCGCG					
GTGAGCACCCCGCGG					
TCTGGATGGGCTGCC					
CGCCACCCCTGGCCGGA					
ATCGCTGTGGCTGA					
TCGTACCCGTTTCGT					
GCTGGGGGCTGGGA					
CCGGGCCCGGGCGGGC					
TGGGTCCAAACCGGGT					
CGCTGTGTTACCGGCT					
GGTGC					

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

(continua)

Organismo	Fármaco	Amplicón-sensibilidad	SEQ ID NO	Diseño Tm	Referencia
Mtb	etambutol	<p>CGGACCGATGGACTG CTGGCCCGCTGGCGG TGCTGGCCGGCGGTT GTCGCTGATCACCGTG GTGG</p>	182	89.6	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2
MbMb	etambutol	<p>CGCCATCACCGACTC CCGGGCACCCCGGA GGGAAGGCCCGGTCG GGATCAACGGGTCGCA CGGGCGCTGCCGTTT GGATTGGACCCGGCAC GTACCCCGGTGATGGG CAGCTACGGGGAGAAC AACTGCCCCGCCACGG CCACCTCGCCCTGGTA CCAGTTACCCGCCCGC AGCCCCGACCGGCCGC TGGTGGTGGTTCCCGC GGCCGGCCCATCTGG TCCTACAAGGAGGAGG GCGATTTCATCTACGG CCAGTCCCTGAAACTG CAGTGGGGCGTCACCG GCCCCGACGGCCGCAT CCAGCCACTGGGGCAG GTATTCCGGATCGACA TCGGACCGCAA</p>	183	94.6	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2

(continua)

Organismo	Fármaco	Amplificación-sensibilidad	SEQ ID NO	Diseño T _m	Referencia
MMTb	etambutol	TTGGGCTTCCITGCTC	184	92.9	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2;
		TGGCATGTCATCGGCG			
		CGAATTCGTGGACGA			
		CGGCTACATCCTGGGC			
		ATGGCCCGAGTCGCCG			
		ACCACGCCGGCTACAT			
		GTCCAAACTATTTCCGC			
		TGGTTCGGCAGCCCGG			
		AGGATCCCTTCGGCTG			
		GTATTACAACCTGCTG			
		GCGCTGATGACCCATG			
		TCAGCGACGCCAGTCT			
		GTGGATGCGCCTGCCA			
		GACCTGGCCGCCCGGGC			
		TAGTGTGCTGGCTGCT			
GCTGTCCCGTGAGGTG					
CTGCCCGCCCTCGGGC					
CGGGGTTGGAAGGCCAG					
CAAACC					
MTb	etambutol	TCAACAACGGCCTGC	185	87.5	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2;
		GGCCGGAGGGCATCAT			
		CGCGCTCGGCTCGCTG			
MMTb	etambutol	GTCACCTATGTGCTGA	186	85.4	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2;
		TCGAGCGGTCCAT			
		CACCGTCAICCTGAC			
		CGTGGTTCGCCCGAC			
		CAGACCCCTGTCAACGG			
		TGTTGGAAGCCACCAG			
		GGTTCGCCGCGAAA			

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

(continua)

Organismo	Fármaco	Amplicón-sensibilidad	SEQ ID NO	Diseño Tm	Referencia	
MTb	etambutol	GGCTGGTCCAACGTG	167	87.1	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 325-336 Vol. 44, No. 2;	
		CGGGCGTTTGTCGGG				
		GCTGCGGACTGGCCGA				
		CGACGTACTCGTCGAG				
		CCTGATACCAATGC				
		TTCGCCCGAGCAAAG				168
		ATGCCCCGCCGATGCCG				
		TCGGGTCCGGGTGGT				
		GGCCGAGGATCTGTCC				
		CTGACACCGGAGGACT				
		GGATCGGGTGAACCC				
		GCCGGGTACCGGAC				
		CTGGCTCACTGCAGG				
		AATATGTGGGCTCGAC				
		GCAGCCGGTCTGCTG				
GACTGGGGGTCCGGTT						
TGGCCTCCCGTGCCA						
GCAGCCGATGCTGCAC						
GCCAAATGGCATCGCCG						
AAATCCCGAAGTTCCG	169					
CATCACACCCGGACTAC						
TCGGCTAAGAAGCTGG						
ACACCGACACGTGGGA						
AGACGGCACTAACGG						
ATGTACCGCTGCAAC						
TGGTCCGGGTGGCGGA						
CCCCGGGCAATTCGGC						
TGCGTACCCACCGACG						
AGGAGGACCCCGTAGT						
CGCCTTCTGGAGAAG						
ACGGAGGATC						
MTb		etambutol	GGCTGGTCCAACGTG	167	87.1	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 325-336 Vol. 44, No. 2;
			CGGGCGTTTGTCGGG			
			GCTGCGGACTGGCCGA			
	CGACGTACTCGTCGAG					
	CCTGATACCAATGC					
	TTCGCCCGAGCAAAG		168			
	ATGCCCCGCCGATGCCG					
	TCGGGTCCGGGTGGT					
	GGCCGAGGATCTGTCC					
	CTGACACCGGAGGACT					
	GGATCGGGTGAACCC					
	GCCGGGTACCGGAC					
	CTGGCTCACTGCAGG					
	AATATGTGGGCTCGAC					
	GCAGCCGGTCTGCTG					
GACTGGGGGTCCGGTT						
TGGCCTCCCGTGCCA						
GCAGCCGATGCTGCAC						
GCCAAATGGCATCGCCG						
AAATCCCGAAGTTCCG	169					
CATCACACCCGGACTAC						
TCGGCTAAGAAGCTGG						
ACACCGACACGTGGGA						
AGACGGCACTAACGG						
ATGTACCGCTGCAAC						
TGGTCCGGGTGGCGGA						
CCCCGGGCAATTCGGC						
TGCGTACCCACCGACG						
AGGAGGACCCCGTAGT						
CGCCTTCTGGAGAAG						
ACGGAGGATC						

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Organismo	Fármaco	Amplicón-sensibilidad	SEQ ID NO	Diseño Tm	Referencia
MTb	etambutol	(continua)	190	93.0	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2;
		CGCGAACTGAACCAG ATGGCATTTGCCAGG CGGTGGTCCCGGTATC CGGACTTCTTGGGCTG ACCGCGGCACACTGC GCCAGACCGAGTTTCAI CGCGTGGCAAGCTG GCCGGTGGCAGCGCA CCGAGCTCAATAGGGC CCTGCTGAGCGTGGAC CGTTTGTGGCCGGG ACAGTCCGCTACCGGT GGACGGGGCATCCGT GGCAATTGCTCGAGC GGTTCGGCATGTTCCG CATCCGGATGTCGATT GCCGTGCTGGCGGCCG GCCGTGACCGATTGAC CGGCTGGCCGCCGAA CTGCTGGAGCGCAGCG GGCTGGTGGCGTGGC CAATGTGATAGACCAG CAGTTCGGCAGCGCT CCGACATGCTTAAGGC GCATACCCG			
MTb	etambutol	GAGCAGGTGCTTCC CGCGGACGGAGCGA GTGCGTGTGGGGTAC TCGGCGAAATACGTTT GGCAACAGAG	191	85.5	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2;

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

(continua)

Organismo	Fármaco	Amplicón-sensibilidad	seq ID NO	Diseño Tm	Referencia
Mtb	etambutol	GGGTTCCCTATGGCGG CGTGGTCATGATTGGC ATGCTGTCGTCGGTGG TCGGACTTGGGTTGTT CAACC	192	82.9	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-335 Vol. 44, No. 2;
Mtb	etambutol	CGATCCCCGATAGGTG TTTGGCCGGCTTGCCG ATCAGACCCCGATTTC GGGGTGAGCCGGAATC CATAGCGTCGATGGCA CAGCGCCGGTCACGCC GGCGAACAGCTTCTC GATTGAGGGAAATGA AGATGACCTCGCTTAT CGATTACATCCTGAGC CTGTTCCCGCAGCGAAG ACGCCGCCCGGTCGTT CGTTGCCGCTCCGGGA CGGGCCATGACCCAGTG CCGGGCTGATCGATAT CGCGCCGCACCAAATC TCATCGGTGGCGGCCA ATGTGGTGCCGGGTCT GAATCTGGGTGCC	193	93.2	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-335 Vol. 44, No. 2;

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

(continua)

Organismo	Fármaco	Amplicón-sensibilidad	Seq ID NO	Diseño Tm	Referencia
MTb	etambutol	ATCACAGGGAGTGGAG TTTTGAACGCAACGAC GGCAGGTGCTGTGCAA TTCAACGTCTTAGGAC CACTGGAACATAAACCT CCGGGGACCCAAACTG CCATTGGGAACGCCGA AACAAAGTGCCTGCT CGCCATGCTGTTGCTA TCCCGGAACCAAGTCG TAGCGGGCCGACGCACT GGTCCAGGC AATCTGG GAGAAGTGGCCACCTG CAGGAGCCCGACGCAC CGTCCACACGTACATT TGCAACCTTCGCCCGA CCCTGAGCGATGCAGG CGTTGATTCGGCCAAC ATCTT	194	92	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2.
MTb	etambutol	TACGAAACCACACGTT GGCAGACATCACACT AGACTACTTGTGTAAC GGCGCCTGTCCGGTA GCCAA	195	83.6	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2.
MTb	etambutol	GCTTGACGGCCGCTAC GGCACTGGCCAGCCG ACTGGCCACGGCGCTG GCAGCACCTGCGAACT CAACTTC	196	90.5	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

(continua)

Organismo	Fármaco	Amplicón-sensibilidad	SEQ ID NO	Diseño Tm	Referencia
MTb	etambutol	CAGCCGATGCCGCTG TCAAGGGCCACCGACC CGGTACATCGCACGGC GTGCCGAGATCCTGGG TTCTTACCCGCATCGGC G	197	90.2	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2;
MTb	etambutol	ACAGCGCCAAACGTCA GCCGCCACACGGCCGT CATCGTCGACACGGGC ACCAACTACGTCA ACGACCTCCGATCGTC	198	88.5	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2;
MTb	capreomicina / viomicina	TCGCCGCTAGGCTGA CCGCGTGTCAATCGTG ACGCCATACGAGGACC TGCTGCCGCTTCGTGCT CGAAACGGGTACGCC AAATCCGACCCGACCG GCACCGGAACCCGCGAG CCTGTTCCGGCCAGCAG AT	199	90.3	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Aug. 2005, p. 3192-3197 Vol. 49, No. 8

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

(continua)

Organismo	Fármaco	Amplicón -sensibilidad	SEQ ID NO	Diseño Tm	Referencia
MTb	capreomicina / viomicina	<p>CGGGTACGCCCAAAAT CCGACCGCACCCGGCAC CGGAACCCGCAGCCTG TTCGGCCAGCAGATGC GCTATGATTTGTCCGC CGGTTTCCCGCTGCTC ACTACCAAGAAAGTCC ATTTCAAATCGGTAGC CTACGAGCTGCTGTGG TTTTGGCGGGCGATT CCAATATCGGTTGGCT GCACGAGCACGGAGTC ACCATCTGG</p>	200	98.8	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Aug 2005, p. 3192-3197 Vol. 49, No. 8
MTb	capreomicina niomicina	<p>ATTCCAATATCGGTT GGCTGCACGAGCCACG GAGTCAACCATCTGGGA CGAATGGGCAAGTGAT ACAGGCGAACTCGGGC CGATCTACGGGTGTACA ATGGCGATCGTGG</p>	201	64.7	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Aug 2005, p. 3192-3197 Vol. 49, No. 8

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

(continua)

Organismo	Fármaco	Amplicón-sensibilidad	SEQ ID NO	Diseño Tm	Referencia
Mtb	capreomicina / Viomicina	GGTGAGCACATCGAC	202	90.9	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Aug. 2005, p. 3192-3197 Vol. 49, No. 8
		CAGATCAGCGGGCGC			
		TGGATTGCTGGCCAC			
		CGATCCCGATTCCCGG			
		CGCATCATCGTGTGG			
		CCTGGAACGTCGGCGA			
		AATCGAGCGGATGGCG			
		CTGCCGCCCTGTCAATG			
		CGTTCTTCCAGTTCTAC			
		GTCCCGGATGGCCGGC			
		TGAGCTGTCAGCTCTA			
		CCAAACGACGCCCGAC			
		CTGTTTCTGGGTGTGC			
		CGTTCAACATCGCCAG			
		CTAT			
		CGCCGACCCTGTTTCT	203		
		GGGTGTGCCGTTCAA			
		CATGCCAGCTATGC			
		GTGCTCACCCACAT			
		GATGGCCGCCCAGGC			
		CGGCTTGTCCGGTCGG			
		CGAGTTCACTCTGGAC			
		CGGTGGCGGACTGCCA			
		CATCTACGACAATCA			
		CGTCGAGCAAGTACG			
		GCTGCAGCTCAGCCG			
		CGAGCCGCGGCCATA			
		TCCGAAACTACTTCT			
		AGCCG			
Mtb	capreomicina niomicina			89.9	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Aug. 2005, p. 3192-3197 Vol. 49, No. 8

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

(continua)

Organismo	Fármaco	Amplicón-sensibilidad	SEQ ID NO	Diseño T _m	Referencia
MTb	moxifloxacino /gatifloxacina /Sitarfloxacina/ ofloxacina/ levofloxacino/ esparfloxacina)	GCAACTACCAACCCGC ACGGCGACGGTTCGAT CTACGACAGCCTGGTG CGCATGGCCCCAGCCCT GGTCGCTGCCGCTAC	204	88,3	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, 2005, p. 3192-3197 Vol. 49, No. 5
MTb - tuberculosis micobacteriana					

Las secuencias co-amplificadas de ADN de MTb enriquecido y ADN de MTb de control se desnaturalizan simultáneamente, y a continuación se hibridan para producir homodúplex de ADN de MTb de control amplificado y ADN de MTb enriquecido, y también producen heterodúplex de ADN de MTb de control y enriquecido. Un colorante de saturación de unión a ADN bicatenario, tal como un colorante que fluoresce cuando interacciona con un ácido nucleico del dúplex, se incluye en la mezcla de amplificación para permitir la generación de datos de curvas de fusión de alta resolución de estos homodúplex y heterodúplex. Como tales, las muestras hibridadas de homodúplex y heterodúplex, además del ADN de MTb de control, se someten a análisis de las curvas de fusión de alta resolución que se monitoriza usando fluorescencia u otros métodos de detección del colorante de unión.

Los datos obtenidos de la monitorización de la fusión de alta resolución de los homodúplex, heterodúplex y ADN de MTb de control se introducen en un sistema de cálculo para analizar los datos. Entonces se calcula una comparación matemática de los datos de la muestra de ADN de MTb de control sin ADN de muestra enriquecido añadido con la muestra que contiene los homodúplex y heterodúplex co-amplificados. La comparación matemática, después de la normalización de las curvas por temperatura y puntos iniciales y finales, permite la resta de cada punto de datos a lo largo de la curva de fusión de la muestra que contiene el producto co-amplificado de los datos de la muestra de ADN de MTb de control. El gráfico resultante para muestras invariables que tienen secuencias que no son sustancialmente diferentes del ADN de MTb de control es esencialmente una línea recta con variación menor de aproximadamente cero. Una gráfica para muestras que tienen ADN de heterodúplex (por ejemplo, ADN de control con ADN de muestra enriquecido) que contiene apareamientos erróneos del apareamiento de bases mostrará un cambio en la curva de fusión, y cuando se someta al algoritmo de resta producirá un gráfico claramente diferente del gráfico plano de secuencias de control e invariables.

Las muestras que contienen gráficos variables de los gráficos de muestra de control se puntúan como variables en la región diana de fármaco (por ejemplo, diana de ácido nucleico), y es probable que los microorganismos sean menos susceptibles (por ejemplo, resistentes) a la acción del fármaco para esta región genética. Por tanto, varias regiones del ácido nucleico diana de fármaco pueden amplificarse simultáneamente en diferentes cámaras de reacción para un único paciente o para múltiples pacientes.

Los sistemas y métodos desvelados permiten el rápido cribado para fármacos adecuados para el tratamiento de casos individuales de MTb. Usando un enfoque tal puede prescribirse una pauta farmacéutica personalizada rápida a un paciente con MTb, que puede conllevar a menos fármacos por paciente, mayores tasas de cumplimiento de las pautas de tratamiento, y/o una reducción definitiva en la tasa de generación de MDR-MTb.

II. Cebadores novedosos

En algunas realizaciones se proporcionan métodos para mejorar la detección de secuencias de ácidos nucleicos utilizando diseños de cebadores de oligonucleótidos racionales y diseños de secuencias diana racionales en combinación para producir estrechos intervalos de temperatura para tanto la hibridación de cebadores con el ácido nucleico diana, amplificación del ácido nucleico diana, como la desnaturalización del producto de ácido nucleico diana amplificado. Como tales, intervalos de temperatura estrechos en comparación con el intervalo de temperatura normalmente empleado pueden producir un producto de ácido nucleico diana amplificado que contiene menos productos no específicos. Así, los productos de ácidos nucleicos diana amplificados pueden ser en general más específicos y sensibles para aplicaciones de detección de dianas por PCR cuantitativa y genotipificación como se describe en el presente documento.

El diseño racional de cebadores de oligonucleótidos puede incluir la selección mediante cálculo, experimento o computación de cebadores que tienen la temperatura de fusión deseada (T_m). El diseño racional puede incluir la selección de secuencias de cebadores específicas con el % de CG apropiado para obtener la T_m deseada. Por tanto, el diseño racional puede incluir modificaciones a los cebadores que incluyen modificaciones internucleotídicas, modificaciones de bases y modificaciones de nucleótidos.

En algunas realizaciones se proporcionan métodos para seleccionar cebadores para PCR que flanquean un elemento de secuencia variable de interés en un ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, los cebadores se seleccionan para tener una T_m con el ácido nucleico diana (T_m de cebador:diana) que está dentro de un estrecho intervalo de T_m del ácido nucleico diana (T_m de diana:diana). El estrecho intervalo de temperatura específico usado para una amplificación tal de los ácidos nucleicos diana depende del perfil de fusión del ácido nucleico diana, y así la secuencia del ácido nucleico diana que se amplifica. Como tal, el estrecho intervalo de temperatura puede usarse como un intervalo de temperatura diana con el fin de identificar y/o generar cebadores específicos que tienen valores de T_m suficientemente altos cuando se hibridan con el ácido nucleico diana. Por consiguiente, los valores de T_m de los cebadores pueden estar solapándose dentro del intervalo de temperatura de hibridación y/o desnaturalización del ácido nucleico diana (véase la Figura 1).

La Figura 1 puede contrastarse con la Figura 2 para ilustrar el diseño de los cebadores que tienen la T_m dentro de un intervalo de la T_m del ácido nucleico diana. La Figura 2 muestra que la amplificación convencional con cebadores

y un ácido nucleico diana carecen de un solapamiento de temperatura (como se muestra en la Figura 1) y requiere variaciones de temperatura extremas durante la amplificación, correspondientes a los ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión, para producir un producto amplificado. Tales intervalos de temperatura extremos permiten la formación de productos no deseados.

5 En algunas realizaciones se proporciona un proceso de diseño iterativo para seleccionar y/u optimizar cebadores para las secuencias de ácidos nucleicos diana específicas que van a amplificarse y/o detectarse. Ventajosamente, el método iterativo permite la formación de un ácido nucleico diana específico usando un estrecho intervalo de condiciones térmicas en el que tanto el ácido nucleico diana como los cebadores de oligonucleótidos hibridados con el ácido nucleico diana están en un flujo dinámico de hibridación y desnaturalización. Un flujo dinámico tal de hibridación y desnaturalización puede producir una amplificación del ácido nucleico diana específico con una disminución proporcional en la formación de productos de amplificación no específicos.

15 Las implicaciones de tales métodos iterativos para seleccionar y/u optimizar cebadores proporciona el uso de colorantes de bajo coste en vez de sondas de oligonucleótidos personalizadas más caras, tales como aquellas que tienen marcas fluorescentes, pueden permitir PCR cuantitativa o desnaturalización de alta resolución que va a usarse en analizar la secuencia del ácido nucleico diana. Por tanto, el método iterativo puede proporcionar cebadores que funcionan en ausencia de instrumentos térmicamente controlados exquisitos para la formación de productos de amplificación. Es decir, los cebadores pueden operar dentro de un estrecho intervalo de temperatura con el fin de amplificar el ácido nucleico diana, permitiendo la amplificación del ácido nucleico que va a usarse en un intervalo de usos mucho más amplio.

25 Se han descrito varios métodos en la materia para calcular la T_m teórica del ADN de secuencia conocida, que incluyen, por ejemplo, los métodos descritos por Rychlik y Rhoads, *Nucleic Acids Res.* 17:8543-8551 (1989); Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); y Breslauer et al., *Proc Natl Acad Sci.* 83: 3746-3750 (1986).

30 En algunas realizaciones, los cebadores pueden configurarse para tener una T_m con el ácido nucleico diana que está dentro de un estrecho intervalo de la T_m del ácido nucleico diana modificando químicamente los oligonucleótidos. Pueden usarse químicas de síntesis de oligonucleótidos muy conocidas para aumentar los valores de T_m de los cebadores de manera que se correspondan con el intervalo de temperatura de la T_m del ácido nucleico diana. Tales químicas pueden usar bases modificadas (por ejemplo, Super G, A, T, C), LNA, o PNA, u otras químicas estabilizantes de oligonucleótidos tales. Por tanto, pueden desarrollarse químicas estabilizantes de la hibridación de oligonucleótidos adicionales que pueden usarse para la presente solicitud.

35 Por ejemplo, se han usado cebadores sintetizados con tanto química de enlace fosfodiéster convencional como químicas de LNA para proporcionar valores de T_m del cebador próximas a los valores de T_m de la secuencia de ácidos nucleicos diana. Sin embargo, es posible que ciertos ácidos nucleicos diana puedan tener valores de T_m más bajos que los de los cebadores, y puede necesitarse incluir una química desestabilizante de la hibridación para reducir los valores de T_m del cebador de manera que el valor de T_m del cebador esté dentro de un intervalo de los valores de T_m de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

45 En algunas realizaciones se proporcionan métodos para refinar el diseño de los cebadores para minimizar el intervalo de temperatura para la amplificación específica de la secuencia de ácidos nucleicos diana. Como tal, el ácido nucleico diana se amplifica con condiciones de ciclos térmicos de reacción estándar para garantizar que se amplifique la secuencia de ácidos nucleicos diana. La amplificación se monitoriza usando PCR en tiempo real con un colorante de unión a ADN bicatenario, tal como SYBR, LCGreen, LCGreen+, colorante Eva, o similares. El ácido nucleico diana amplificado se somete a un análisis de las curvas de fusión para determinar el valor de T_m real de la secuencia de ácidos nucleicos diana. El pico de fusión, que puede expresarse como $-dF/dT$, se genera a partir de la fusión del ácido nucleico diana amplificado y puede tener un intervalo similar a una curva de distribución a través de un intervalo de temperatura definido. En el extremo de temperatura baja, el molde de ácido nucleico diana amplificado está parcialmente desnaturalizado. A la temperatura más alta, la muestra completa de ácido nucleico diana amplificado está desnaturalizada. La temperatura necesaria para desnaturalizar el ácido nucleico diana durante el procedimiento de amplificación está dentro de esta distribución de temperatura. Inicialmente, se recomienda la temperatura más alta para garantizar la desnaturalización más completa. Posteriormente, puede usarse la temperatura más baja de la distribución como T_m inicial para un conjunto de cebadores diseñados para su uso en la amplificación antes de hacer cualquier cambio iterativo a los cebadores. La confirmación del estrecho intervalo de temperatura en el que pueden usarse los cebadores iniciales puede realizarse tanto en experimentos en serie como en paralelo de temperaturas de hibridación cada vez mayores. Alternativamente, los cebadores individuales pueden añadirse al molde amplificado y puede realizarse análisis de las curvas de fusión adicional en las curvas de fusión combinadas de cebador y molde. En cualquier caso, la T_m de los cebadores puede configurarse para solaparse con un estrecho intervalo de temperatura que contiene la T_m de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

65 La mayor temperatura de hibridación de estos experimentos en los que la secuencia de ácidos nucleicos diana se amplifica específicamente y eficazmente puede considerarse la temperatura que define la temperatura de hibridación

5 óptima para los cebadores existentes (por ejemplo, cebadores que se probaron). Estos mismos cebadores o cebadores ligeramente modificados pueden entonces volver a sintetizarse con químicas estabilizantes de la hibridación adicionales. Modificaciones a los cebadores para cambiar la T_m en la dirección deseada de manera que la T_m del cebador se solape con un estrecho intervalo de temperatura que contiene la T_m de la secuencia de ácidos nucleicos diana. Esto puede llevarse a cabo usando herramientas de diseño en línea, tales como la herramienta de diseño LNA disponible de Integrated DNA Technologies. Tales herramientas de diseño pueden usarse para estimar el número de modificaciones de LNA necesarias requeridas para aumentar la T_m del cebador para solaparse mejor con la curva de fusión de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

10 En el caso de que los valores de T_m del cebador sean mayores que la mayor temperatura de fusión de la secuencia de ácidos nucleicos diana, puede ser necesario rediseñar los cebadores para que tengan una T_m más baja. Alternativamente, la cantidad de sales de catión divalente y/o monovalente u otros agentes desestabilizantes (por ejemplo, AgCl, DMSO, etc.) que se usan en el protocolo de amplificación (por ejemplo, PCR) puede reducirse para desestabilizar la hibridación de estos oligonucleótidos con el molde. En cualquier caso, en algunos casos puede ser necesaria una reducción en la T_m del cebador.

15 En algunas realizaciones, los cebadores pueden prepararse de manera que los protocolos de amplificación o enriquecimiento de los ácidos nucleicos diana puedan realizarse a diferencias de temperatura minimizadas durante los ciclos térmicos. Esto permite hacer los ciclos térmicos dentro de un estrecho intervalo de temperatura para promover la formación de un producto específico. Un intervalo de ciclos térmicos puede estar dentro de 10 °C de la T_m del ácido nucleico diana, más preferentemente dentro de 5 °C, incluso más preferentemente dentro de 2,5 °C. Por ejemplo, las condiciones de los ciclos térmicos para la amplificación del ácido nucleico diana abarcan el intervalo del pico de T_m +/- aproximadamente 5 a 10 °C de la secuencia de ácidos nucleicos diana. Tales estrechos intervalos de temperatura hacen posible amplificar ácidos nucleicos diana específicos sin ciclos térmicos entre temperaturas correspondientes a las etapas normales de amplificación por PCR (desnaturalización, hibridación y extensión). Por tanto, hace posible realizar amplificaciones y enriquecimientos en instrumentos de temperatura controlada comerciales que pueden establecerse a temperaturas seleccionadas o variarse dentro de estrechos intervalos de temperatura, tales como un horno, bloque térmico, o similares. La Figura 3 ilustra el gráfico de una amplificación por PCR de estrecho intervalo de temperatura con la misma secuencia de ácidos nucleicos diana que se muestra en la Figura 2, que muestra formación de producto más específica y se forman menos productos no deseados.

20 En algunas realizaciones, las temperaturas del ciclado térmico pueden seleccionarse en un estrecho intervalo de temperatura para limitar sustancialmente la amplificación para amplificar la secuencia de ácidos nucleicos diana. Como tales, las condiciones de los ciclos térmicos pueden modificarse para amplificar la secuencia de ácidos nucleicos diana modificando la temperatura de hibridación para que sea sustancialmente la misma que la base de temperatura más baja del pico de fusión para el amplicón. Por tanto, las condiciones de los ciclos térmicos pueden modificarse para amplificar la secuencia de ácidos nucleicos diana modificando la temperatura de hibridación para que sea sustancialmente la misma que la base de temperatura más alta para el pico de fusión del amplicón.

25 En algunas realizaciones, la T_m del cebador puede seleccionarse de manera que la amplificación del ácido nucleico diana pueda realizarse a una temperatura que oscile entre aproximadamente 75 y aproximadamente 90 °C. Un intervalo de temperatura tal, o intervalo de 5 a 10 °C reducido en él, puede usarse para la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos diana de ADN y/o de ARN para reducir la formación de productos no específicos durante el proceso de amplificación (por ejemplo, PCR).

30 En algunas realizaciones, la T_m del cebador puede seleccionarse de manera que la amplificación se realice a condiciones de amplificación isoterma en el intervalo de T_m de la secuencia de ácidos nucleicos diana para garantizar la formación de productos apropiada.

35 En algunas realizaciones, la presente invención incluye un método de diseño de un conjunto de cebadores que tiene una T_m con un ácido nucleico diana que está dentro de un estrecho intervalo de la T_m de la secuencia de ácidos nucleicos diana. Como tal, el conjunto de cebadores se diseña de manera que la T_m del cebador se solape con la curva de distribución de la T_m de la secuencia de ácidos nucleicos diana. Por ejemplo, el conjunto de cebadores puede usarse en ensayos de PCR en tiempo real de manera que la T_m del cebador se solape con la curva de distribución de la T_m para la secuencia de ácidos nucleicos diana de manera que pueda usarse un estrecho intervalo de temperatura para amplificar la secuencia de ácidos nucleicos diana. El cebador se diseña de manera que tenga una T_m del cebador que esté dentro de aproximadamente 10 °C de la T_m del ácido nucleico diana, más preferentemente dentro de 5 °C, incluso más preferentemente dentro de 2,5 °C, y lo más preferentemente sustancialmente la misma T_m que la T_m del ácido nucleico diana. Por tanto, esto puede incluir valores de T_m del cebador que se solapan con la curva de T_m del amplicón.

40 En algunas realizaciones, la presente invención incluye un proceso iterativo para diseñar cebadores. Un proceso iterativo tal puede incluir identificar una secuencia de ácidos nucleicos diana inicial como el amplicón diana, en el que la secuencia de ácidos nucleicos diana puede asociarse a una actividad biológica particular, tal como posible resistencia a fármacos. La secuencia de ácidos nucleicos diana se amplifica entonces con el fin de producir un producto amplificado, y el valor de T_m del producto amplificado (por ejemplo, amplicón) se determina usando análisis

de las curvas de fusión convencional. El análisis de las curvas de fusión se utiliza entonces para determinar o calcular nuevos cebadores o conjuntos de cebadores para su uso en la amplificación del ácido nucleico diana. Los cebadores determinados o calculados se diseñan entonces con valores de T_m del cebador dentro del intervalo del pico de fusión generado por la fusión del producto amplificado. Los cebadores se preparan o sintetizan entonces para tener los valores de T_m del cebador diseñado.

En algunas realizaciones, las condiciones del protocolo para amplificar la secuencia de ácidos nucleicos diana pueden modificarse a un pH apropiado para aumentar la especificidad de amplificar selectivamente el ácido nucleico diana con respecto a otros ácidos nucleicos. Como tal, el uso de un pH apropiado puede aumentar la capacidad para amplificar selectivamente la secuencia de ácidos nucleicos diana. Esto puede incluir el uso de un tampón de amplificación que puede permitir la activación de ADN polimerasas estables térmicas químicamente inactivadas. Por tanto, el ajustar el pH con tampones de amplificación seleccionados puede permitir que el protocolo de amplificación se realice a temperaturas reducidas, tales como aquellos intervalos de temperaturas que se han citado en el presente documento.

En algunas realizaciones, el pH del tampón de amplificación puede ajustarse para permitir la conversión de una enzima químicamente inactivada en el estado activado. Como tal, una enzima puede activarse en una condición ligeramente ácida; sin embargo, pueden usarse valores de pH básico para algunas enzimas. Para las enzimas activadas con ácido, tampones de PCR basados en Tris estándar pueden tener una dependencia significativa de la temperatura (por ejemplo, reduciendo 0,028 unidades de pH por grado C). La activación completa de la enzima (por ejemplo, ADN polimerasas estables térmicas químicamente inactivadas) desde el estado inactivado puede requerir que el pH sea inferior a aproximadamente 7, más preferentemente inferior a aproximadamente 6,75, y lo más preferentemente inferior a 6,5.

En algunas realizaciones, el protocolo de amplificación incluye el uso de tampones de pH más bajo de manera que la amplificación pueda realizarse a temperaturas de activación más bajas. Por ejemplo, para cada 10 °C por debajo de 95 °C, la temperatura de activación de la enzima puede reducirse 0,3 unidades de pH. Sin embargo, los límites a este enfoque son completamente una función de la química del colorante usado para la detección en tiempo real del molde amplificado (por ejemplo, la detección basada en fluoresceína ha reducido significativamente la fluorescencia por debajo de pH 7,3).

En algunas realizaciones, la T_m del cebador puede modificarse alterando el % de GC de la secuencia del cebador. Cambiando el % de GC, la T_m del cebador puede cambiarse selectivamente. Normalmente, el aumentar el % de GC puede aumentar la T_m , y el disminuir el % de GC puede disminuir la T_m . Sin embargo, hay casos en los que se desea un alto % de GC % que aumentará excesivamente la T_m . En tales casos pueden usarse desestabilizadores para permitir la inclusión de cebadores de alto contenido de % de GC o para el uso de secuencias de ácidos nucleicos diana de alto % de GC. Los desestabilizadores pueden disminuir selectivamente la temperatura del procedimiento de amplificación. Ejemplos de desestabilizadores incluyen DMSO, AgCl, y otros.

En algunas realizaciones, el diseño de los cebadores y/o las condiciones de amplificación pueden modularse para modular el tamaño de la secuencia de ácidos nucleicos diana que se amplifica. Esto puede incluir modular el diseño de los cebadores y/o las condiciones de amplificación de manera que el tamaño del amplicón sea significativamente mayor que el de los cebadores combinados solos. Esto puede incluir el amplicón que es 1-3 nucleótidos más largo que los cebadores, o 2 veces más grande que los cebadores, o 5 veces más grande que los cebadores, y más preferentemente 10 veces más grande que los cebadores.

En algunas realizaciones, los cebadores diseñados como se describe en el presente documento pueden emplearse en una matriz de procedimientos de amplificación con diferentes concentraciones de material de partida. Es decir, el material de partida puede repartirse en una matriz a concentraciones variables, y los cebadores pueden usarse con ella para el protocolo de amplificación de estrecha temperatura como se describe en el presente documento. El uso de los cebadores y el protocolo de amplificación de estrecha temperatura con una matriz de concentraciones variables de material de partida pueden usarse para la cuantificación de la cantidad de ácido nucleico diana en el material de partida. La Figura 4 es una gráfica que muestra el uso de los cebadores y el protocolo con una matriz de concentraciones variables de material de partida de manera que pueda cuantificarse la cantidad de material diana.

III. Amplificación/enriquecimiento de ácidos nucleicos diana

Algunos métodos desvelados en el presente documento incluyen una etapa de amplificar o enriquecer el ácido nucleico diana. Un método tal puede incluir un procedimiento sustancialmente similar a los métodos muy conocidos de amplificación del genoma completo y amplificación del transcriptoma completo. Esto puede incluir amplificar un genoma con una etapa de generación de bibliotecas de genoma, que puede ir seguido de una etapa de amplificación de bibliotecas. Por tanto, la etapa de generación de bibliotecas puede utilizar los cebadores específicos o mezclas de los cebadores específicos descritos en el presente documento con una ADN polimerasa o transcriptasa inversa. Pueden diseñarse mezclas de cebadores específicos con los cebadores para eliminar la capacidad de auto-hibridación y/o hibridación con otros cebadores dentro de una mezcla, pero que permitan que los cebadores ceben eficaz y frecuentemente la secuencia de ácidos nucleicos diana, en los que los cebadores pueden diseñarse como

se describe en el presente documento.

Se desvelan métodos para determinar simultáneamente un perfil de expresión genética para un miembro individual de una especie con respecto a un genoma estándar entero para la especie. Los métodos pueden comprender distribuir una muestra de líquido de material genómico en una matriz de cámaras de reacción de un sustrato. La matriz puede comprender un conjunto de cebadores y una sonda para cada secuencia de ácidos nucleicos diana a lo largo del genoma estándar entero. La muestra de líquido puede comprender sustancialmente todo el material genético del miembro. Cada una de las cámaras de reacción puede comprender el conjunto de cebadores y la sonda para al menos una de las secuencias de ácidos nucleicos diana y una polimerasa. Los métodos pueden comprender además amplificar la muestra de líquido en la matriz, detectar una señal emitida por al menos una de las sondas, e identificar el perfil de expresión genética en respuesta a la señal.

Como el aislamiento de cantidades adecuadas de microorganismos, tales como MTb, de muestras de esputo puede ser un reto significativo, pueden usarse técnicas de amplificación del genoma descritas en el presente documento en lugar de protocolos de cultivo y purificación tradicionales. Aunque muchas técnicas de diagnóstico molecular permiten la detección de cantidades muy pequeñas de material de partida genético (por ejemplo, de tan solo una única copia de una secuencia de ácidos nucleicos diana), frecuentemente es difícil garantizar que una muestra particular contenga en realidad la copia única deseada de la secuencia de ácidos nucleicos diana. Para permitir probar con exactitud muestras muy raras o preciadas en procedimientos de diagnóstico molecular, se ha empleado una técnica conocida como amplificación del genoma completo para enriquecer el material de partida para su uso en los procedimientos de diagnóstico molecular aguas abajo. El método descrito aquí aplica el método de amplificación del genoma completo al problema del cribado de MTb de muestras de esputo que frecuentemente contienen tales bajas cantidades de organismo vivo. De otro modo, procedimientos convencionales pueden usar cepas aisladas de MTb, que deben cultivarse durante hasta 2 meses para garantizar que puedan obtenerse cantidades suficientes de material genético de la muestra para aplicaciones de diagnóstico molecular.

Usando técnicas de amplificación del genoma completo desarrolladas para el enriquecimiento *in vitro* de muestras de ADN y/o ARN raras y preciadas, se ha desarrollado un método de enriquecimiento de material genético novedoso para enriquecer muestras que contienen un ADN de microorganismo, tal como ADN de MTb. Esta técnica permite evitar métodos de cultivo convencionales que hasta la fecha han sido usados para aumentar concentraciones de microorganismos, que frecuentemente se requieren para diagnósticos moleculares aguas abajo. Una técnica de amplificación del genoma completo tal usa pequeñas cantidades de ADN genómico de muestras de microorganismo directamente lisadas. Las muestras que contienen microorganismo vivo que han sido aisladas usando el método de Petroff pueden lisarse directamente por un producto comercialmente disponible, y las pequeñas cantidades resultantes de ADN de microorganismo pueden someterse a técnicas de amplificación del genoma completo para proporcionar un amplión para su uso en aplicaciones de diagnóstico molecular aguas abajo. Aunque el procedimiento para emplear la técnica de amplificación del genoma completo se describe con respecto a MTb, se reconoce que una técnica tal puede aplicarse a cualquier microorganismo.

Usando un método de preparación de organismos vivos convencional, el método de Petroff, el MTb aislado se fracciona de la muestra de esputo dejando pequeñas cantidades del organismo en una suspensión de agua. Siguiendo el protocolo del fabricante de la disolución de lisis de *Mycobacterium*, MycoBuffer (RAOGene; Milford, PA), pequeñas cantidades de ADN de MTb se aíslan en el material residual del producto de MycoBuffer. El uso de esta muestra de ADN directamente lisada y combinándola con componentes de reacción similares a aquellos usados en procedimientos de amplificación del genoma completo permite el enriquecimiento molecular de la muestra ADN. Un procedimiento tal puede proporcionar elevadas cantidades del genoma de MTb, por ejemplo, superiores a 30 veces en menos de 16 horas de tiempo de incubación. Este nivel de enriquecimiento de muestras puede producir cantidades suficientes de material genómico de MTb para permitir el uso de este material enriquecido en procedimientos de diagnóstico molecular aguas abajo en menos de un día en comparación con los actuales métodos que pueden durar más de 2 meses de cultivo de MTb de las cepas aisladas de MTb antes de las pruebas de diagnóstico.

La técnica de amplificación del genoma completo puede usarse con una o muchas ADN polimerasas con el fin de mejorar los resultados de enriquecimiento tanto reduciendo el tiempo requerido para el enriquecimiento como aumentando la cantidad de material enriquecido resultante. Esto puede usarse para amplificar ARN y/o ADN. Por tanto, la técnica de amplificación puede usarse con enzimas transcriptasa inversa tanto solas como en combinación con enzimas ADN polimerasa para enriquecer muestras para componentes de ARN del material lisado. Adicionalmente, la técnica de amplificación puede usarse con uno o muchos parámetros de cebado de ácidos nucleicos diana diferentes. Ejemplos de los parámetros de cebado que pueden modularse incluyen los siguientes: los cebadores de tamaño; cebadores aleatorios; cantidad de cebadores aleatorios; cebadores diana específicos; cebadores específicos de región; y combinaciones de los mismos. La modulación de tales parámetros de cebado puede mejorar la amplificación del genoma completo o la amplificación específica de región dentro de las muestras. Además, la técnica de amplificación puede usarse con diversas mezclas de tampón para mejorar el enriquecimiento de la muestra. Además, la técnica de amplificación puede usarse con diversas concentraciones de elementos estructurales de ácido nucleico, que pueden proceder de fuentes naturales o sintéticas. Todavía más, la técnica de amplificación puede realizarse en cualquier instrumento capaz de mantener una temperatura constante o

temperatura variable durante un estrecho intervalo de temperatura (por ejemplo, un instrumento capaz de mantener una temperatura establecida, tanto establemente como con perfiles térmicos programables). Las condiciones de reacción pueden incluir alguna variación de temperatura dentro del intervalo de temperatura durante el proceso de enriquecimiento con el fin de mejorar la cantidad de material genético enriquecido o para especificar el enriquecimiento de regiones específicas del material genético, tal como la secuencia de ácidos nucleicos diana.

Por ejemplo, el material genómico de la muestra puede aislarse usando cualquier método que liberará los ácidos nucleicos de microorganismo (por ejemplo, MTb) en disolución o en un colector de fase sólida. El material genómico de la muestra puede aislarse de muestras distintas de esputo, tales como, pero no se limitan a, sangre, líquido cefalorraquídeo cerebral, lesiones de piel, lesiones de órgano, o de muestras ambientales. El material genómico de la muestra puede enriquecerse usando un método de enriquecimiento similar a la amplificación del genoma completo o amplificación por PCR anidada. Éste puede permitir que regiones que rodean la secuencia de ácidos nucleicos diana se amplifiquen usando un método de ciclos térmicos en combinación con cebadores específicos (por ejemplo, cebadores que tienen una T_m como se describe en el presente documento) para amplificar la secuencia de ácidos nucleicos diana. Por tanto, pueden usarse cebadores no específicos para amplificar el genoma en un tipo de PCR anidada de amplio genoma.

La muestra de ácido nucleico de *Mycobacterium tuberculosis* en la disolución de Mycobuffer puede prepararse a partir del protocolo de extracción de ácido nucleico proporcionado por el comerciante o por cualquier método convencional. El ácido nucleico puede ser tanto ADN como ARN de la muestra de microorganismo que va a enriquecerse, en la que el ácido nucleico puede estar intacto, fragmentado, o porciones del ácido nucleico de organismos enteros. La mezcla de enriquecimiento puede incluir tampones de ADN y/o ARN polimerasa adecuados, trifosfatos de desoxinucleótido, sales apropiadas para la enzima específica y sistema tampón, y cebadores de oligonucleótidos aleatorios. Ejemplos de la longitud del cebador pueden incluir cebadores de 6 bases, 11 bases y 22 bases (¿Deberían los presentes inventores ampliar esto?). Los cebadores pueden ser oligonucleótidos de fosfodiéster, oligonucleótidos de LNA, oligonucleótidos de PNA, o cualquier combinación de los mismos; sin embargo, también se espera que futuras químicas que pueden producir la amplificación o un enriquecimiento del ADN o ARN diana interrogado funcionen apropiadamente en esta técnica. También puede estar incluida en la mezcla una proteína de unión a ADN o ARN monocatenario para mejorar el rendimiento global de la etapa de enriquecimiento.

Puede realizarse una técnica de amplificación a modo de ejemplo del siguiente modo: los ácidos nucleicos diana de la muestra de prueba se combinan en un tampón de polimerización adecuado con sales apropiadas, con un cebador de oligonucleótidos aleatorio (por ejemplo, 6, 11 o 22 bases, o cualquiera de los cebadores o longitudes de cebadores presentados en la Tabla 2), y los ácidos nucleicos se desnaturalizan a una temperatura suficientemente alta para garantizar que la desnaturalización sea al menos sustancialmente completa, preferentemente completa; las muestras desnaturalizadas se mantienen a casi condiciones desnaturalizantes, o en un entorno de temperatura que permitirá que la secuencia de ácidos nucleicos diana de la muestra experimente condiciones de hibridación desestabilizadas; las muestras se enfrían entonces suficientemente para permitir que los cebadores se hibriden con la secuencia diana, en el que la secuencia diana está contenida dentro de cualquiera del genoma completo o fragmentos del mismo; elementos estructurales de ácido nucleico apropiados se añaden a la mezcla, que son tanto trifosfatos de desoxinucleótido, o trifosfatos de ribonucleótido, como bases de ácido nucleico posiblemente no naturales o artificiales que pueden incorporarse con los productos formados; enzimas apropiadas (por ejemplo, ADN polimerasa, ARN polimerasa, transcriptasa inversa, cualquier combinación de las mismas, o similares) para los objetivos de enriquecimiento se combinan entonces; y la amplificación se realiza a la estrecha temperatura con el fin de amplificar selectivamente la secuencia de ácidos nucleicos diana.

IV. Cribado de ácidos nucleicos diana para determinar la resistencia a fármacos

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos amplificados descritos en el presente documento pueden emplearse en un método para cribar la secuencia de ácidos nucleicos diana para la presencia y/o ausencia de secuencias de ácidos nucleicos o cambio en la secuencia de ácidos nucleicos indicativo de resistencia a fármacos. Es decir, los ácidos nucleicos amplificados pueden cribarse para una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada usando desnaturalización de alta resolución con el fin de determinar si el microorganismo puede ser resistente a fármacos a un fármaco seleccionado. Como tales, pueden usarse diagnósticos moleculares de ácidos nucleicos para detectar cambios genéticos en secuencias de ácidos nucleicos diana, en los que los cambios en la secuencia pueden ser una indicación de que el microorganismo es resistente a un fármaco. Por consiguiente, pueden analizarse secuencias genéticas conocidas que están alteradas en cepas resistentes a fármacos para determinar si hay alguna de tales alteraciones en las secuencias del gen. Tales alteraciones genéticas son frecuentemente indicativas de susceptibilidad alterada del patógeno al tratamiento por fármacos, que frecuentemente se manifiesta por ser resistente a fármacos.

Normalmente, las técnicas existentes requieren un conocimiento previo de las mutaciones específicas en los ácidos nucleicos genéticos que están relacionadas con las dianas de fármaco (por ejemplo, el ácido nucleico es tanto la diana de fármaco como produce un producto génico que es la diana de fármaco). Esta información se usa para cribar para resistencia a fármacos, y cualquier cambio en el material genético del patógeno que no esté siendo

probado puede omitirse específicamente durante el proceso de cribado. El método descrito en el presente documento no requiere ningún conocimiento previo de los cambios específicos. Como tal, se estudia una región general de los ácidos nucleicos genéticos del patógeno (por ejemplo, ADN, ARN, etc.) para ver si hay alguna variación en la secuencia que sea tanto la diana directa del fármaco como codifique la diana directa del fármaco. Por tanto, cambios en el material genético en una región tal de los ácidos nucleicos genéticos del patógeno puede hacer que los fármacos terapéuticos individuales sean ineficaces o reduzcan su eficacia. Esta técnica permite la rápida identificación de cualquier cambio genético a secuencias de ácidos nucleicos diana de fármaco, y puede proporcionar mayor sensibilidad a ser capaz de detectar cambios esperados, además de inesperados, en las secuencias de ácidos nucleicos diana del fármaco. Por consiguiente, los métodos de la presente invención pueden usarse para generar perfiles de sensibilidad a fármacos de cualquier cepa aislada de microorganismo particular de manera que pueda establecerse la verosimilitud de la resistencia a fármacos.

En algunas realizaciones, el método de cribado incluye determinar si un microorganismo específico está presente en una muestra. Por tanto, puede determinarse la cantidad de material genético del microorganismo. Cualquier muestra positiva se procesa entonces en el presente documento con el fin de amplificar la cantidad de material genético. Esto puede incluir combinar la muestra con cebadores o conjuntos de cebadores que se hibridan con un ácido nucleico diana en condiciones que amplifican la secuencia diana. Por tanto, el material genético de la muestra puede combinarse con una secuencia de ácidos nucleicos diana normal o un control de sonda de secuencia normal (por ejemplo, fluorescente o no fluorescente) que no tiene ninguna variación genética para preparar una relación de ~1:1, que es material genético de prueba y de control casi equivalente. Sin embargo, es posible variar esta relación sustancialmente, tal como de 1:10 a 10:1.

Se combinan la secuencia de ácidos nucleicos diana normal o secuencia de sonda normal (por ejemplo, ácido nucleico de control) con el material genético de la muestra (por ejemplo, ácido nucleico de muestra), y entonces se aplica en un único tubo de reacción. Alternativamente, el ácido nucleico de control y el ácido nucleico de muestra pueden mezclarse después de procedimientos de amplificación separados. Un ácido nucleico de control del ácido nucleico diana normal solo también se amplifica simultáneamente (sin embargo, con mejoras para distinguir hebras individuales de ácidos nucleicos, puede ser posible ejecutar el control dentro de la misma reacción como la muestra que está siendo interrogada). Los perfiles de desnaturalización del ácido nucleico de control y el ácido nucleico de muestra pueden entonces determinarse por análisis de las curvas de fusión de alta resolución de los ácidos nucleicos de control y de la muestra. Regiones de ácido nucleico normal, o no mutante, a modo de ejemplo con mutaciones conocidas que se corresponden con un cambio en la resistencia a fármacos se enumeran en la Tabla 3.

Los datos del perfil de desnaturalización para estas pruebas pueden almacenarse electrónicamente. Como tales, los datos de control o de la muestra pueden recuperarse de un análisis previo de manera que pueden usarse para una comparación de los resultados. La capacidad de guardar los datos del perfil de desnaturalización puede eliminar la necesidad de realizar siempre una reacción de control con cada serie de la muestra de prueba. Los datos para las muestras se comparan con los datos para el control de diana normal, y cualquier diferencia o variación entre los dos conjuntos de datos se puntúa como una variación en la región diana para la muestra desconocida. Cuando la muestra incluye una variación, la muestra (es decir, el microorganismo) se clasifica como que es posiblemente resistente al fármaco que se dirige a la región genética (por ejemplo, secuencia de ácidos nucleicos diana) que es el objeto de la prueba.

En algunas realizaciones, un ácido nucleico diana de la muestra (por ejemplo ADN o ARN) se prepara con ácido nucleico diana de control para obtener una mezcla de ácido nucleico diana de la muestra y de control a aproximadamente una relación 1:1. Esto puede lograrse mezclando los ácidos nucleicos de la muestra y de control, o co-amplificando los ácidos nucleicos de la muestra y de control (por ejemplo, por PCR) a aproximadamente una relación 1:1 de material de partida. Estos ácidos nucleicos de la muestra y de control se desnaturalizan inicialmente a una temperatura suficientemente alta para garantizar que los ácidos nucleicos diana de la muestra y los ácidos nucleicos diana de control normales estén todos desnaturalizados. Los ácidos nucleicos en la mezcla (por ejemplo, muestra y control) se hibridan entonces a alguna temperatura por debajo de la temperatura de fusión a la que empiezan a desnaturalizarse (por ejemplo, T_m). Por ejemplo, la temperatura de hibridación puede estar 10 °C o más por debajo de la T_m del ácido nucleico de control diana. La mezcla se somete entonces a calentamiento lento, y se monitoriza la cantidad de ácidos nucleicos de la muestra y de control hibridados presentes en el tubo. La monitorización puede realizarse por fluorescencia del producto de ácido nucleico bicatenario, en el que la fluorescencia se genera por la inclusión de un colorante que se une solo a ácidos nucleicos bicatenarios. El colorante puede incluirse en una cantidad que sature el molde. La señal fluorescente se pierde a medida que los ácidos nucleicos bicatenarios empiezan a desnaturalizarse, y están disponibles menos sitios para unirse al colorante de saturación. El procedimiento de desnaturalización continúa hasta que no está presente ácido nucleico bicatenario, y la fluorescencia es casi cero. Los datos fluorescentes obtenidos durante el procedimiento de desnaturalización se guardan entonces para el cálculo y se comparan con los datos de desnaturalización de control que se preparan con un protocolo similar usando solo el ácido nucleico de control diana. Como tal, puede realizarse un análisis de las curvas de fusión de alta resolución con la mezcla de los ácidos nucleicos de la muestra y de control y la composición que tiene solo los ácidos nucleicos de control, y puede hacerse una comparación entre las dos curvas de fusión. Una diferencia entre las curvas de fusión puede ser una indicación de que los ácidos nucleicos de la muestra son de un microorganismo que tiene resistencia a fármacos al fármaco que interacciona con el ácido nucleico diana o producto

génico del mismo.

En algunas realizaciones puede usarse cualquier protocolo o instrumento que pueda distinguir entre los ácidos nucleicos de la muestra y de control hibridados de los ácidos nucleicos de la muestra y de control desnaturalizados. Los datos de desnaturalización obtenidos de las curvas de desnaturalización de muestras que se generaron a partir de la mezcla que tiene los ácidos nucleicos de la muestra y de control se comparan con los datos de desnaturalización del ácido nucleico de control. Los datos de desnaturalización del ácido nucleico de control pueden ser tanto datos de desnaturalización de control guardados como el ácido nucleico de control puede desnaturalizarse y monitorizarse en una cámara de reacción separada junto con la muestra experimental. Los perfiles de fusión de la diana de control normal se comparan con la muestra experimental de manera que cualquier diferencia en estos perfiles de fusión pueda indicar la presencia de una variación en la región diana. Cuando el control es un ácido nucleico diana de control normal, las variaciones en las secuencias pueden indicar que el microorganismo es resistente al fármaco que interacciona con el ácido nucleico diana o producto génico del mismo.

En algunas realizaciones, las secuencias co-amplificadas de ADN de MTb enriquecido y ADN de MTb de control se desnaturalizan simultáneamente, y entonces se hibridan para producir homodúplex de ADN de MTb de control y ADN de MTb enriquecido amplificados, y también producen heterodúplex de ADN de Mtb de control y enriquecido. Un colorante de saturación de unión a ADN bicatenario, tal como un colorante que fluoresce cuando interacciona con un ácido nucleico de dúplex, se incluye en la mezcla de amplificación para permitir la generación de datos de curvas de fusión de alta resolución de estos homodúplex y heterodúplex. Como tales, las muestras hibridadas de homodúplex y heterodúplex, además del ADN de MTb de control, se someten a análisis de las curvas de fusión de alta resolución que se monitoriza usando fluorescencia u otro método de detección del colorante de unión.

Los datos obtenidos de la monitorización de la fusión de alta resolución de los homodúplex, heterodúplex y ADN de MTb de control se introducen en un sistema de cálculo de manera que puedan emplearse métodos de cálculo para analizar los datos. Entonces se calcula una comparación matemática de los datos de la muestra de ADN de MTb de control sin ADN de muestra enriquecido añadido con la muestra que contiene los homodúplex y heterodúplex co-amplificados. La comparación matemática, después de la normalización de las curvas por temperatura y puntos iniciales y finales, permite la resta de cada punto de datos a lo largo de la curva de fusión de la muestra que contiene el producto co-amplificado de los datos de la muestra de ADN de Mtb de control. El gráfico resultante para muestras invariables que tienen secuencias que no son sustancialmente diferentes del ADN de MTb de control es esencialmente una línea recta con variación menor de aproximadamente cero. Una gráfica para muestras que tienen ADN de heterodúplex (por ejemplo, ADN de control con ADN de muestra enriquecido) que contiene apareamientos erróneos del apareamiento de bases mostrará un cambio en la curva de fusión, y cuando se someta al algoritmo de resta producirá un gráfico claramente diferente del gráfico plano de secuencias de control e invariables.

Las muestras que contienen gráficos variables de los gráficos de muestra de control se puntúan como variables en la región diana de fármaco (por ejemplo, diana de ácido nucleico), y es probable que los microorganismos sean menos susceptibles (por ejemplo, resistentes) a la acción del fármaco para esta región genética. Por tanto, varias regiones del ácido nucleico diana de fármaco pueden amplificarse simultáneamente en diferentes cámaras de reacción para un único paciente o para múltiples pacientes.

Las Figuras 6A-6C proporcionan ilustraciones que muestran los resultados de métodos de perfiles de las curvas de fusión de alta resolución para determinar la presencia de una variación en una secuencia de ácidos nucleicos diana de muestra de una secuencia de ácidos nucleicos diana normales. La presencia de variación es una indicación de que el microorganismo es resistente a un fármaco, tal como rifampicina. Más particularmente, la Figura 6A representa los productos de hibridación, tanto por amplificación por PCR como por método de enriquecimiento de molde alternativo, de cepas normales (por ejemplo, ácidos nucleicos de cepas no resistentes) y resistentes. El molde normal (por ejemplo, ácido nucleico diana de control) se incluye en la mezcla con el ácido nucleico diana de la muestra para producir un apareamiento imperfecto entre los ácidos nucleicos que van a hibridarse. La Figura 6B muestra curvas de fusión que tienen ligeras diferencias entre las dos curvas de fusión, que son diferencias en los perfiles de fusión del ácido nucleico diana de control y la mezcla con el ácido nucleico diana de la muestra. La Figura 6C muestra una diferencia en las curvas de fusión entre el control y la muestra. El perfil de ácido nucleico diana de control normal se representa como la muestra en línea continua, que no tiene diferencia del ácido nucleico "normal" de microorganismos que son sensibles al fármaco. La línea discontinua muestra una diferencia distinta entre la muestra "normal" y la muestra erróneamente apareada, que indica que el microorganismo es una cepa resistente.

La Figura 7 es una representación gráfica del análisis de las curvas de fusión de alta resolución entre +/- ácido nucleico de control, ácidos nucleicos de una cepa resistente y ácidos nucleicos de una cepa que es sensible al fármaco. El gráfico se preparó usando un software de llamada de diferencias de curvas automatizadas (Idaho Technology, LightScanner), y muestra la capacidad para distinguir muestras resistentes de muestras sensibles. Cualquier muestra que se llame, por el software, como la misma que el control negativo es sensible al fármaco, y cualquier muestra llamada como diferente del control negativo se clasifica como resistente al fármaco. El paquete de análisis puede configurarse en cualquier disposición deseada. Alternativamente, cualquier método que pueda representar gráficamente la diferencia entre las formas de las curvas, especialmente en la región superior de la curva, puede usarse para diferenciar entre la secuencia 'normal' y la secuencia de prueba que posiblemente

contiene un apareamiento erróneo. Además, pueden observarse diferencias directamente de las curvas de fusión sin análisis adicional.

5 En algunas realizaciones, el análisis de las curvas de fusión de alta resolución puede usarse en cualquier prueba genética para la detección de variación o similitudes entre ácidos nucleicos de la muestra y ácidos nucleicos de control normales.

10 En algunas realizaciones, la amplificación y/o desnaturalización puede usarse para cribar muestras normales usando diversas sondas alteradas en lugar de sondas de una secuencia normal.

En algunas realizaciones, la amplificación y/o desnaturalización puede ser para cribar ácidos nucleicos mutados, no normales, diana usando sondas alteradas apropiadamente diseñadas.

15 En algunas realizaciones, la amplificación y/o desnaturalización puede usarse para detectar cosas en común entre muestras, tales como pruebas de identificación forense.

En algunas realizaciones, la amplificación y/o desnaturalización puede usarse para la inspección epidemiológica de diferentes muestras.

20 En algunas realizaciones, las sondas usadas en la amplificación pueden ser tanto ADN como ARN (por ejemplo, natural, o sintético, o de fuentes amplificadas).

25 En algunas realizaciones, la amplificación y/o desnaturalización puede usarse para confirmar la presencia de secuencias no mutantes.

En algunas realizaciones, la amplificación y/o desnaturalización puede usarse para confirmar la presencia de secuencias no mutantes para demostrar adicionalmente que la muestra de prueba procede de un organismo que será sensible al fármaco representado por esa región.

30 En algunas realizaciones, la amplificación puede realizarse con métodos de PCR en tiempo real o convencional. Por tanto, puede usarse cualquier método de amplificación que producirá cantidades suficientes de ácidos nucleicos de control normales y/o material genético de la región diana para permitir la detección por un instrumento con capacidades de detección adecuadas.

35 En algunas realizaciones, el sistema de detección de la desnaturalización o del análisis de las curvas de fusión puede ser cualquier instrumento de fusión de alta resolución o un instrumento apropiadamente adaptado capaz de generar resolución suficiente con capacidades de calentamiento y de detección de muestras básicas.

40 En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos normales y de la muestra pueden amplificarse por PCR en un único tubo. Alternativamente, los ácidos nucleicos normales y de la muestra pueden amplificarse en tubos separados y entonces mezclarse antes del análisis de las curvas de fusión de alta resolución.

45 En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos normales pueden recuperarse de disoluciones madre, y entonces mezclarse con los ácidos nucleicos de la muestra amplificados en relaciones apropiadas para generar resultados similares.

50 En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos normales que se usan como control pueden distinguirse de las mezclas con los ácidos nucleicos de la muestra usando una variedad de químicas con el fin de producir un control interno. Esto puede incluir el uso de diferentes químicas, tales como el uso de ácidos nucleicos de control normales fluorescentemente marcados. Como tales, solo dúplex que se forman a partir de los ácidos nucleicos de control marcados pueden generar una señal de fusión fluorescente, que es específica para el molde de control normal.

55 En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos de la muestra y los ácidos nucleicos de control pueden compararse después de que tanto la muestra como el control se amplifiquen y/o desnaturalicen en diferentes series, que podrían ser en diferentes días.

60 En algunas realizaciones, el análisis de las curvas de fusión de alta resolución puede realizarse en cualquier instrumento capaz de desnaturalizar y/o hibridar ácidos nucleicos, y capaz de detectar la cantidad de ácidos nucleicos hibridados en comparación con los ácidos nucleicos desnaturalizados.

65 En algunas realizaciones, sensibilidad del instrumento suficiente puede permitir el análisis de las muestras como se describe en el presente documento sin tener que amplificar los ácidos nucleicos de la muestra. Es decir, el instrumento tiene sensibilidad suficiente de manera que los ácidos nucleicos de la muestra sean detectables sin amplificación.

En algunas realizaciones, el análisis de los ácidos nucleicos de la muestra se realiza con hibridación de alta

resolución que monitoriza los ácidos nucleicos a medida que se hibridan. En parte, esto es posible debido a que la hibridación de los ácidos nucleicos diana de la muestra y el control pueden usarse como medio para identificar diferencias entre el molde de control y las muestras de prueba en vez de solo usando el análisis de las curvas de fusión o desnaturalización.

5 En algunas realizaciones, la presente invención puede estudiar ADN y/o ARN de una muestra microbiológica u otra muestra biológica para variaciones genéticas. Los ácidos nucleicos pueden ser intactos, fragmentados, o porciones del ácido nucleico del organismo entero o la región diana del ácido nucleico. Los cebadores pueden seleccionarse de una región de o adyacente a la porción del ácido nucleico diana que va a interrogarse. Los cebadores pueden ser 10 no fluorescentes, fluorescentes, o capaces de producir tanto una señal electrostática como electroquímica.

Las composiciones de amplificación pueden incluir las siguientes: componentes de reacción en cadena de la polimerasa, incluyen transcriptasa inversa, y/o ADN polimerasa; tampones apropiados, sales y trifosfatos de desoxinucleótido y/o desoxirribonucleótido para amplificar la secuencia diana; un colorante de unión a ADN bicatenario fluorescente, sonda fluorescente, sondas de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, o 15 puede usarse otra sonda similar para detectar la formación del ARN hibridado frente al desnaturalizado, o homodúplex y/o heterodúplex de ADN/ARN; cebadores de oligonucleótidos diseñados para amplificar específicamente la región diana del ácido nucleico de muestra y el ácido nucleico de control normal, en las que los cebadores pueden ser oligonucleótidos de fosfodiéster, oligonucleótidos LNA, oligonucleótidos PNA, o cualquier 20 combinación de estos.

Los instrumentos que pueden usarse para el análisis del ácido nucleico de muestra pueden ser cualquier instrumento capaz de detectar la formación y disolución del dúplex de ADN/ADN, ARN/ARN, o ADN/ARN, y en 25 realizaciones adicionales, dúplex de ADN/proteína o ARN/proteína, u homotríplex/homocúadruplex de ADN. Un instrumento tal debe ser capaz de generar fuertes señales fluorescentes cuando las dianas se hibridan y monitorizan el cambio en la fluorescencia a medida que se desnaturalizan los ácidos nucleicos diana. Los datos del instrumento pueden registrarse en un sistema de cálculo que tiene software configurado para realizar el análisis de datos. Por tanto, el instrumento puede configurarse para realizar tanto la amplificación como la hibridación/desnaturalización del 30 ácido nucleico. Sin embargo, es posible realizar estas funciones en varios instrumentos distintos sin ningún detrimento a los resultados. Una configuración alternativa sería un instrumento que pudiera monitorizar el estado hibridado y desnaturalizado de las secuencias diana por luz ultravioleta, generación de señales electroquímicas, viscosidad en disolución, u otras técnicas no desarrolladas hasta ahora.

Los datos obtenidos del análisis de amplificación y la hibridación/desnaturalización pueden analizarse con cualquier 35 paquete de software configurado para determinar las diferencias entre datos. Por ejemplo, puede usarse un paquete de software, actualmente disponible de Idaho Technology, o Corbett Research, y pronto de Roche Applied Science, que se diseña para comparar los perfiles de fusión de una diana normal de aquellas de las muestras en las que la diana normal se hibrida para identificar ningún cambio, o diferencias menores o mayores. El formato exacto del resultado del software no es importante, sin embargo, el software debe simplemente poder identificar aquellas 40 muestras que tienen variaciones de los perfiles de curvas de fusión normales en comparación con aquellas que son normales.

Los siguientes ejemplos se ofrecen para fines ilustrativos solo.

45 **EJEMPLO 1** - AMPLIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS REGIONES DE SENSIBILIDAD AL FÁRMACO DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

A. Amplificación del genoma completo de ADN genómico de *M. tuberculosis*

50 Si las cantidades de ADN de la muestra son insuficientes para obtener un producto amplificado de una región sensible al fármaco, entonces puede usarse enriquecimiento del genoma completo para amplificar el ADN de la muestra antes de la amplificación de regiones específicas, o amplicones. El enriquecimiento del genoma completo en la muestra de MycoBuffer se realizó en paralelo con un número de copias de partida idéntico de ADN molde que se suspendió en agua sola. Para monitorizar el enriquecimiento del genoma completo global de *Mycobacterium 55 tuberculosis*, se eligieron 3 regiones diana distintas del genoma de *Mycobacterium* para evaluar cada una para el enriquecimiento. Se usó un método de ensayo de PCR en tiempo real para cribar cada una de estas distintas regiones diana para el enriquecimiento en comparación con las muestras de control no enriquecidas. El punto sobre el eje x en el que la línea de muestra empieza a tender hacia arriba es indicativo de la cantidad de material de partida genético en la muestra, cuanto antes empiece a cambiar la señal en el eje x mayor es la cantidad de material de partida. 60

La Figura 5A es una gráfica que muestra los resultados obtenidos de la región diana CFP32 de *Mycobacterium tuberculosis*, que compara el cebador de aleatorio de 22 bases mezclado con muestras en agua o MycoBuffer. El gráfico muestra que la muestra enriquecida con MycoBuffer tiende hacia arriba antes e indica una mayor cantidad de 65 material de partida.

La Figura 5B es una gráfica que muestra los resultados obtenidos de la región diana IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis*, que compara el cebador de aleatorio de 22 bases mezclado con muestras en agua o MycoBuffer. De nuevo, el gráfico muestra que la muestra enriquecida con MycoBuffer tiende hacia arriba antes e indica una mayor cantidad de material de partida.

La Figura 5C es una gráfica que muestra los resultados obtenidos de la región diana btMTb de *Mycobacterium tuberculosis*, que compara el cebador de aleatorio de 22 bases mezclado con muestras en agua o MycoBuffer. Aún de nuevo, el gráfico muestra que la muestra enriquecida con MycoBuffer tiende hacia arriba antes e indica una mayor cantidad de material de partida.

B. Preparación de muestras

Usando el método de Petroff de esterilización de muestras de esputo, se separó MTb de material celular humano. Brevemente, el método de Petroff es del siguiente modo: el método de Petroff, se homogeneizó esputo durante 15 min en un agitador usando un volumen igual de 4 % de hidróxido sódico. Después de la centrifugación a 3.000 rpm durante 15 min en una Megafuge 1.0 (Heraeus), el depósito se neutralizó con aproximadamente 20 ml de agua destilada estéril. Las muestras se centrifugaron de nuevo. El 'depósito' o material sedimentado se transfiere a un tubo de microcentrífuga y se lisa con Mycobuffer (RAOGene, Inc, Milford, PA) según las instrucciones del fabricante. El material de sobrenadante del protocolo de lisis contiene el ADN micobacteriano, y se transfiere a un tubo de microcentrífuga nuevo.

C. Cribado primario para la presencia de ADN de *M. tuberculosis* en una muestra

Se realizó cribado no cuantitativo para ADN micobacteriano en muestra usando Fluorescentic MTb Screen (método HTPCR) combinando los siguientes componentes en una reacción de 20 ul, los productos pueden detectarse por PCR en tiempo real con sondas, o detección electroquímica, o por electroforesis en gel, o cualquier otro método adecuado. Aquí los presentes inventores describen el uso de PCR en tiempo real para detectar la formación de producto:

Combinar:

- 10x tampón FI15: (Tris-HCl 500 mM (pH 8,0); 5 mg/ml de albúmina de suero bovino (no acetilada); MgCl₂ 10 mM, 40 % de sulfóxido de dimetilo) usar a 1x concentración final.
- 10 x trifosfatos de desoxinucleótido (2 mM cada uno) usar a 1x.
- 10x LC Green I (Idaho Technology, Inc.) usar a 0,5x.

ADN polimerasa termoestable (Tfi (exonucleasa -) (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA) usar 2,5 U/reacción.

Los cebadores de oligonucleótido se diseñaron para tener solapamiento de temperatura con el gen que codifica la proteína de la familia PPE. Cebadores para el producto amplificado:

FI15-MTb FOR: CCGGAAACGTCGGCATCGCAAACCTC (SEQ ID NO. 205)
 FI15-MTb REV: TGCCCGTGTGTAGAACCCCGTGTGAA (SEQ ID NO. 206)
 Gen de la familia PPE

Añadir Mycobuffer/muestra de ADN a la reacción.
 Amplificar según el siguiente protocolo:

Desnaturalización a 95 °C: 1 min
 Activación a 75 °C: 10 minutos
 90 ciclos de:

85 °C durante 30 s
 75 °C durante 30 s con una adquisición fluorescente

1 ciclo de fusión:

95 °C durante 10 s
 60 °C durante 10 s

Aumento hasta 95 °C tomando adquisiciones de fluorescencia a lo largo de la rampa de temperatura para generar una curva de fusión del producto.

Los productos finales pueden demostrar perfiles de fusión variables, como se muestra en la Figura 8. Aquellas reacciones que amplifican un producto específico son indicativas de la presencia de ADN de MTb en una muestra de prueba.

D. Método de detección alternativo para el producto amplificado

Alternativa a la detección por PCR en tiempo real: detección electroquímica
Usando los mismos cebadores básicos con la siguiente adenda:

5
FI15-MTb FOR: Biotina- CCGGAAACGTCGGCATCGCAAACCTC (SEQ ID NO. 205)
FI15-MTb REV: Fluoresceína-TGCCCGTGTGTAGAAAGCCCGTGTGAA (SEQ ID NO. 206)

10 Realizar la amplificación como antes. Sacar la muestra y realizar la detección electroquímica según las indicaciones del fabricante (AnzenBio). Brevemente, disponer en el chip detector electroquímico (AnzenBio), incubar 20 minutos. El chip de neutravidina se une a la biotina sobre el cebador directo (o inverso..dependiendo del diseño definitivo) y el chip se lava con 1x solución salina tamponada con fosfato + 1 % de Tween 20 (PBST), 3 veces. Añadir anticuerpo anti-fluoresceína conjugado con peroxidasa de rábano picante, incubar 20 minutos. Lavar la placa 3x con 1x PBST, añadir TMB (tampón de detección electroquímica) e incubar 1 minuto. Medir la formación de señales con el detector PSD-8. Las señales superiores a 5 se puntúan como positivas, aquellas inferiores a 5 se puntúan como negativas. Debe incluirse una muestra negativa de referencia, y muestra positiva, para confirmar estos resultados.

20 Detección alternativa, los productos pueden visualizarse por electroforesis en gel, cualquier formación de producto distinta de aquella observada en la muestra de control negativo debe considerarse sospechosa de ser positiva para MTb.

Detección alternativa, usando electroforesis en gel capilar. Misma que la electroforesis en gel.

25 Detección alternativa, HPLC, espectroscopía de masas, espectroscopía, fluorimetría, y similares. La detección de la presencia de un producto de PCR amplificado en una muestra puede lograrse usando cualquier técnica disponible, preferentemente aquellas que pueden diferenciar productos amplificados por tamaño a diferencia de solo cantidad. La presencia de un producto amplificado, especialmente uno en el intervalo de tamaño esperado, es indicativa de la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* (MTb) en una muestra de prueba.

30 **E. Enriquecimiento molecular por amplificación del genoma completo**

Protocolo de enriquecimiento molecular:

35 Aunque la mayoría de las muestras probadas hasta la fecha ha tenido ADN suficiente para amplificaciones directas de regiones de sensibilidad a fármacos diana, algunas muestras de ADN de MTb contendrán cantidades muy pequeñas de ADN para su uso en el cribado de resistencia a fármacos de MTb. Para vencer este problema se ha empleado una técnica básica para enriquecer las muestras usando un procedimiento modificado de amplificación del genoma completo. Básicamente, las muestras se someten al siguiente protocolo:

40 Se añade disolución de ADN en Mycobuffer a oligonucleótidos aleatorios. La disolución se desnatura y se enfría hasta temperatura ambiente (permite la unión aleatoria de oligonucleótidos a lo largo de todo el genoma de MTb). La disolución se mezcla entonces con mezcla de amplificación del genoma completo y se incuba durante 8 horas para producir un enriquecimiento del genoma completo, en promedio el genoma se enriquece 100x con respecto a la muestra en bruto.

45 La disolución de incubación de ADN es:

1-5 ul de ADN
1x tampón Thermopol (New England Biolabs)

50 Cebadores 22-meros aleatorios 100 uM (concentración final).

En un volumen total de 15 ul

Desnaturalizar durante 2 minutos a 96 °C

Enfriar a temperatura ambiente durante 10 minutos

55 Disponer sobre hielo

Añadir 35 ul de mezcla de enriquecimiento molecular (mezcla de amplificación del genoma completo)

Las concentraciones finales de componentes son:

60 dNTPs 400 uM
1x tampón Thermopol

0,35 U/ul de polimerasa termoestable de BST (*Bacillus stearothermophilus*) fragmento grande (exonucleasa -)

65 4 % de sulfóxido de dimetilo
Proteína del gen 32 de T4 (30 ng/ul)

Incubar 8 h a 50 °C
Incubar 15 minutos a 80 °C
Mantener a 4 °C hasta uso.

5 Entonces se purifican muestras por un ensayo de unión a filtro modificado. Brevemente, este método puede emplearse en cualquier etapa en el proceso en el que el ADN vaya a separarse de la disolución..un método rápido para que el tampón y el cebador intercambien el ADN. Los presentes inventores han encontrado que la unión directa de la disolución de Mycobuffer + la mezcla de unión funciona bien para la purificación de etapa temprana cuando se necesita o desea.

10 El ADN de muestra en Mycobuffer se mezcla 1:1 con la mezcla de unión (HCl de guanidinio 4 M, Tris-HCl 12,5 mM, pH 6,8, 0,5 % de detergente NP40, 50 % de etanol)

15 Las muestras se cargan sobre una placa filtrante de goteo largo de 96 pocillos de filtro de fibra de vidrio de Whatman GF/F 1,0 um, y se incuban a temperatura ambiente durante 2 minutos. La placa filtrante se apila sobre un placa de recogida de residuos de 96 x 2 ml.

20 Las muestras se centrifugan (1800 rpm durante 10 minutos) o se filtran a vacío (lentamente), sacar las placas de la centrífuga o sistema de vacío.

Se añaden 200 ul de tampón de lavado I (HCl de guanidinio 1,6 M, Tris-HCl 10 mM, pH 6,8, y 0,1 % de NP40, 70 % de etanol) y se centrifugan o se filtran a vacío. Las placas se sacan de la centrífuga o sistema de vacío.

25 Se centrifugan 400 ul de tampón de lavado II (NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, 60 % de etanol) o se filtran a vacío. Seguido de un segundo lavado con 200 ul de tampón de lavado II.

Se vacía el recipiente de recogida, y el sistema entero tanto se seca a vacío como se seca al aire, a TA durante 2 h, o a 56 °C durante 20 minutos.

30 Se apila una placa de recogida nueva con placa filtrante, y se añaden 100 ul de tampón de elución (agua estéril libre de DNasa, RNasa) a los filtros. Las muestras se incuban a TA durante 2 minutos, y se centrifugan, o se filtran a vacío.

35 El sistema entero es una modificación de los métodos existentes usando estas placas filtrantes de 96 pocillos.

El ADN de la muestra está en el eluato. Alternativamente, los productos del genoma amplificados pueden usarse directamente sin purificación para procedimientos de amplificación adicionales si los contenidos de la reacción genómica y los cebadores aleatorios no interfieren con las posteriores amplificaciones específicas.

40 Este material se usa para procesos aguas abajo.

45 El ADN de la muestra se evalúa entonces con QPCR para confirmar la cantidad de ADN presente en la muestra. Esto sirve para tres fines: 1 es para realizar un cribado secundario para la presencia de MTb en la muestra; 2 es para verificar el enriquecimiento molecular; y 3 es para establecer una cuantificación global de la cantidad de ADN presente en la muestra. Este método como se ha desarrollado previamente ha demostrado una coherencia del enriquecimiento de no más de 3 veces de variación en el ADN de la muestra enriquecido. El método de los presentes inventores usa tres genes para confirmar el enriquecimiento. Un resultado de los genes se usa para el procesamiento adicional aguas abajo.

50 **F. Amplificación en tiempo real de muestras que contienen ADN de *M. tuberculosis***

Cada muestra se somete a cuantificación por PCR en tiempo real del ADN de la muestra enriquecido. Usando un sistema de sonda fluorogénica (ensayo de nucleasa 5', TaqMan) como resto que genera señal.

55 Los componentes de reacción son los siguientes:

Mezcla de reacción:

60 10x tampón de PCR (Tris-HCl 500 mM, pH 8,5, 5 mg/ml de BSA (no acetilado), MgCl₂ 40 mM)
10x dNTP 2mM cada uno (también puede usarse dUTP 4 mM para fines de limpieza de la contaminación)
Enzima (ADN polimerasa termostable) exonucleasa Tfi + (invitrogen, Carlsbad, CA)

Y cebadores de oligonucleótidos (tres posibles reacciones diferentes por muestra), usar cebadores a 0,5 uM final, y sondas fluorogénicas a 0,2 uM final.

65 Ensayo Pan de Mycobacterium: MTb27.3 (proteína conservada):

CFP32 FOR: TCGTTCATCACCGATCC (SEQ ID NO. 207)
 CFP32 REV: GTGAGCAGTTCGTTCCA (SEQ ID NO. 208)
 CFP32 TM: FLUORESCEÍNA-TCAACGAGACGGGCACGCT-BHQ1 (SEQ ID NO. 209)

5 IS6110 de transposasa:

IS6110 FOR; TGCGAGCGTAGGCGTC (SEQ ID NO. 210)
 IS6110 REV: GTCCAGCGCCGCTTC (SEQ ID NO. 211)
 10 IS6110 TM: FLUORESCEÍNA-CTGCTACCCACAGCCGGTTAGGT-BHQ1 (SEQ ID NO. 212)

Gen de la proteína de la familia PPE:

BTTb FOR; GCCAGCATTGAGGAT (SEQ ID NO. 213)
 BTTb REV; CAATTCGGGCACCAATAA (SEQ ID NO. 214)
 BTTb TM; FLUORESCEÍNA-TGCGATGCCGACGTTTCCG-BHQ1 (SEQ ID NO. 215)
 IS6110 es una diana que no es fiable para la cuantificación ya que está presente en el genoma de MTb > 1/genoma.

20 Los genes BTTb y cfp32 se usan para establecer el enriquecimiento en el ensayo, ambos tienen valores de cruce de señales similares en el ciclo 34, frente a las muestras no enriquecidas que son tanto 'planas' para BTTb como son 100x (>6 ciclos) después de la muestra enriquecida (cfp32).

25 Cada reacción tiene 1 – 5 ul de disolución de ADN purificada o preparada añadida a la mezcla de reacción final. La información de volumen debe observarse en el establecimiento de la reacción, ya que el volumen exacto se convertirá en un divisor numérico para el procesamiento en la dirección 3'. Es importante determinar la cantidad relativa de ADN de MTb en una muestra para las posteriores etapas de mezcla.

30 Análisis de la amplificación y fusión de muestra de ADN de MTb y controles

El ADN de la muestra enriquecida se analiza entonces con los ensayos de marcador de sensibilidad a fármacos. Este ensayo se basa en la siguiente información: el ADN hibridado que está perfectamente apareado por las reglas de apareamiento de bases de Watson/Crick generará una curva de fusión característica del ADN de fusión. Cuando la misma secuencia se hibrida con una secuencia de ADN similar que contiene 1 o más bases 'erróneamente apareadas' a lo largo de la longitud, la curva de fusión característica ya no se genera, sino que se genera una nueva curva que indica la diferencia en las características de fusión para las hebras erróneamente apareadas de ADN. Para generar las secuencias erróneamente desapareadas no es simplemente suficiente usar el ADN amplificado para la muestra en cuestión, sino que también es necesario incluir una muestra de ADN que contenga una secuencia de ADN que es el ADN 'no modificado'. De forma que, cuando los dos se mezclen en proporciones casi iguales antes de, durante, o al final de una reacción de amplificación, y se hibriden juntos un porcentaje significativo de los moldes hibridados estén en las hibridaciones 'erróneamente apareadas'. De forma que una curva de fusión pueda generarse que indicará la presencia de una 'mutación' en la secuencia de la muestra. Si estas secuencias de muestra que están siendo amplificadas se diseñan para rodear las secuencias de ácidos nucleicos de genes que tanto ellos mismos como sus productos génicos son la diana de fármacos antimicrobianos. Entonces cualquier comportamiento de fusión aberrante de las muestras hará sospechar del uso de un fármaco particular para el tratamiento de la infección microbiológica ya que el ADN de los organismos indicará, o al menos sugerirá, que el fármaco será ineficaz. Esto puede aplicarse posiblemente a quimioterapia para el cáncer, resistencia a fármacos virales y fármacos antimicrobianos.

50 El proceso para realizar este cribado es del siguiente modo. Usando los resultados de los tres cribados secundarios para MTb tras el enriquecimiento molecular de las muestras, los resultados de la muestra de Cfp32 se usan para calcular la cantidad de ADN presente en la muestra. Alternativamente, puede usarse cualquier amplicón de MTb para determinar la cantidad de ADN en la muestra de MTb con respecto al ADN de control en tanto que el amplicón esté presente en ambos. Además, podrían evaluarse amplicones de control y desconocidos separados para determinar las concentraciones de ADN relativas en muestras de control y de prueba. El fin de los presentes inventores para usar solo uno ha sido para facilitar el cálculo.

Se usa el umbral de cruce calculado del instrumento Roche LightCycler 480, o prácticamente cualquier máquina de PCR en tiempo real, para calcular la concentración de la diana del fármaco RPOB 'no mutante' (rifampicina) para añadir a la reacción de cribado. La disolución madre de control (dilución 1:1.000.000 de disolución maestra) se diluye 10x durante cada 4 ciclos que la muestra cruza el nivel inicial después del ciclo 18, en el caso del ejemplo anterior con un valor de CT de 32, es decir, 14 ciclos o 5000x dilución ($10^{3,69}$). Esto puede presentarse fácilmente como un diagrama para el usuario o como un simple trozo de software que calculará los volúmenes a mezclar antes de la amplificación y/o fusión.

65 El ADN de la muestra y una cantidad igual de 'ADN normal, no mutante, no mutado, no resistente' de RPOB se

añade a la reacción. La reacción consiste en los siguientes componentes:

10x tampón de PCR (Tris-HCl 500 mM, pH 8,5, 5 mg/ml de BSA, MgCl₂ 30 mM)
 10 x mezcla de dNTP (sin dUTP)
 5 Oligonucleótidos a 0,5 uM (final) cada uno
 LCGreen + o colorante LCGreen (Idaho Technology, Inc)
 Enzima (Tfi (exo +)) u otra polimerasa termostable con actividad de corrección de lectura.

Gen RpoB de *Mycobacterium*, diana de rifampicina (antibiótico):

10 RPOB FOR: CAAGGAGTTCTTCGGCACCC (SEQ ID NO. 13)
 RPOB REV: GGACCTCCAGCCCGGCA (SEQ ID NO. 14)

15 Puede y también debe realizarse simultáneamente una reacción de control con solo la muestra de RPOB, además de 1, 2 o más controles 'resistentes', en reacciones separadas. Los presentes inventores tienen dos reacciones de control en las que han mezclado en proporciones iguales el control normal de RPOB con uno de los siguientes: 1 una única mutación puntual en la región diana, o 2 una delección de 3 bases de la región diana. Estas tres muestras sirven para garantizar que el ensayo se está realizando como era de esperar, deben incluirse controles para cada diana de fármaco y esencialmente tendrían características similares.

20 Las muestras se amplifican por el siguiente protocolo, en un instrumento LightCycler 480.

95 °C durante 10 minutos

25 40 ciclos de:

95 °C durante 10 s
 57 °C durante 10 s
 72 °C durante 40 s

30 1 ciclo de fusión:

95 °C durante 10 s
 50 °C durante 10 s
 35 70 °C durante 30 s

95 °C durante 0 s con adquisiciones de fluorescencia establecidas a 25-35 adquisiciones/grado C (fusión de alta resolución). Los datos pueden entonces analizarse usando el módulo de curvas de fusión de alta resolución que pronto va a ser comercializado para el instrumento LC 480 o usando el software LightScanner de (Idaho Technology, Inc.). Ambos paquetes permiten establecer las muestras del nivel inicial (las muestras de control positivo, como patrones). Además, cualquier dispositivo que pueda medir la cantidad de ADN bicatenario (ADNbc) a temperaturas específicas durante la fusión puede usarse para generar curvas de fusión. Los parámetros de la curva por defecto son normalmente suficientes, aunque ocasionalmente los parámetros deben modificarse para estar seguros de que las muestras de control están siendo llamadas con exactitud. Si las muestras de control son llamadas con exactitud, entonces los resultados de la reacción pueden considerarse aceptables y puede hacerse la llamada de diagnóstico. Así, una diferencia entre la curva de fusión no mutante de control y una curva de fusión de una muestra desconocida es indicativa de una mutación puntual o polimorfismo entre las muestras. En este caso, con la región rpoB de MTb, la diferencia entre las curvas de fusión es indicativa de la presencia de ADN resistente a rifampicina en una muestra de prueba, y así puede usarse para diagnosticar la presencia de MTb resistente a rifampicina en una muestra. De una manera similar, esta técnica puede aplicarse a analizar cualquier región de ADN en la que haya mutaciones conocidas que se correlacionan con un cambio en un fenotipo, y es especialmente poderosa para la evaluación de resistencia o sensibilidad a fármacos.

55 EJEMPLO 2: DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA O SENSIBILIDAD A FÁRMACOS EN MUESTRAS DE MTb HUMANAS

El fin de estos experimentos era demostrar que muestras clínicas previamente probadas y confirmadas que contenían MTb podrían ser rápidamente evaluadas para la resistencia o sensibilidad a fármacos. Se obtuvieron muestras clínicas cegadas de pacientes con MTb que se habían preparado por el método de Petroff y se resuspendieron en tampón MGIT (Becton Dickinson). Las muestras se evaluaron para resistencia a rifampicina y estreptomycin usando pares de cebadores, amplicones y las temperaturas de fusión enumeradas en las Tablas 2 y 3.

65 Protocolo de prueba de MTb:

Ejecutar muestras contra la muestra patrón H37RV usando el ensayo Taqman de cfp32 para cuantificar las

ES 2 582 602 T3

muestras.

Mezcla madre: 1x tampón Kappa sin Sybr (mezcla madre de SYBRG1 de Kappa Biosystems sin SYBR), 1 ul de oligo cfp32, MgCl 1,75 mM, c.s.p. hasta 9 ul con agua

5 Poner 18 ul de mezcla madre por muestra en placa de 384 pocillos.

Añadir 2 ul de muestras.

Poner una tapa de la placa sobre la placa y centrifugar la placa

Ejecutar en LC480 bajo el protocolo de ejecución de cfp32.

Desnaturalizar 10 min a 95 °C

10 Amplificar: 95 °C durante 10 s, 59 °C durante 40 s (50 ciclos)

A partir del ensayo de cfp32 determinar el factor de dilución necesario para las muestras usando la ecuación $C=S \cdot E^N$

en la que C=10000000, E= eficiencia de la curva patrón, N= valor de Cp

15 Diluir las muestras a la muestra de concentración más baja en tampón Myco.

Ejecutar las muestras diluidas en ensayo de rpob de 80 pb para determinar la resistencia.

Mezcla madre: 1X Kappa sin Sybr, 0,5 ul de oligo de 80 pb, 1x colorante Eva green, c.s.p. hasta 9 ul con agua

20

Disponer 9 ul de mezcla madre por muestra en placa de 384 pocillos.

Añadir muestras de 0,5 ul de H37RV + 0,5 ul de muestras en pocillo.

Poner una tapa de la placa sobre la placa y centrifugar

25 Ejecutar en LC480 bajo el protocolo de ejecución de rpob.

Desnaturalizar: 10 min a 95 °C

Amplificar: 95 °C durante 10 s

57 °C durante 10 s

72 °C durante 40 s con adquisición individual

30 Ejecutar las muestras hasta que todas las muestras hayan alcanzado la meseta durante 2 o 3 ciclos (aprox. 30 ciclos). Protocolo de amplificación final y todas las muestras para completar el protocolo de fusión.

Sacar la placa de LC480 y centrifugar para recoger cualquier condensación de la parte superior. Rampa del protocolo de fusión hasta 95 °C durante 1 s

35 50 °C durante 1 s

70 °C durante 30 s Empezar a recoger los datos de fusión continuamente a 30 adquisiciones/grado C. Recogida de datos finales a 95 °C

Fundir las muestras en el instrumento HR-1.

40 Mover las muestras de la placa de 384 pocillos a tubos capilares de 20 ul.

Brevemente, centrifugar los capilares etiquetados en la centrifuga para recoger muestras en el fondo.

Usando el software de control del instrumento HR-1, fundir las muestras individualmente usando el protocolo de fusión FI LAB MTb Opt.

45

Tasa de la rampa 0,07

Inicio de la adquisición a 80 °C con fluorescencia diana del 90 %

Adquisición final a 96 °C

Enfriar a 40 °C

50 Nota: Ejecutar 2 muestras antes de la recogida de datos para permitir que el instrumento se caliente adecuadamente.

Análisis de datos

Abrir el software de la herramienta de análisis de fusión HR-1.

Abrir la carpeta que contiene los archivos de datos y hacer clic en "seleccionar el directorio actual"

55 Seleccionar las muestras a analizar y hacer clic en "continuar"

En "análisis" seleccionar normalizar

Ajustar los dos cursores de la izquierda a aproximadamente un grado antes de que empiece la fusión

Ajustar los dos cursores de la izquierda a aproximadamente un grado después de que termine la fusión

Hacer clic en OK

60 En "Análisis" seleccionar el desplazamiento de la temperatura

En muestras seleccionar una muestra no mutante a normalizar

Ajustar los cursores para ampliar la región de fusión

Seleccionar OK

65 En "Análisis" seleccionar gráfico de diferencias

Seleccionar muestra no mutante a normalizar.

Mover los cursores para seleccionar la región de interés
Hacer clic en OK

5 Las muestras que muestran picos en un gráfico de diferencias de la curva por encima o por debajo de un nivel de fluorescencia de 1,5 a 2 se consideran resistentes.

10 La Figura 10 muestra los resultados de este procedimiento en formatos de gráficos de diferencias de la curva usando cebadores de la Tabla 2 para la amplificación y el amplicón correspondiente de la Tabla 3 para el análisis de la hibridación y fusión. La Figura 10A muestra el análisis de 4 muestras para resistencia o sensibilidad a rifampicina junto con el control (wt1). La Figura 10B demuestra la capacidad para identificar resistencia a estreptomycin en muestras de MTb. Estos datos demuestran que esta técnica puede diferenciar satisfactoriamente entre regiones de ADN que se correlacionan con sensibilidad a fármacos y aquellas que contienen polimorfismos correlacionados con resistencia a fármacos. De una manera similar, los métodos y reactivos desvelados en el presente documento pueden usarse para evaluar la sensibilidad o resistencia a todos los antibióticos de primera línea usados para tratar infecciones por MTb.

EJEMPLO 3: DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A AGENTES ANTIFÚNGICOS

20 Infecciones fúngicas y de levadura son responsables de un gran número de enfermedades en seres humanos. Algunos ejemplos breves de hongos clínicamente significativos incluyen:

25 Malassezia furfur y Exophiala werneckii (piel superficial)
Piedraia hortae y Trichosporon beigelii (pelo)
Especies de Microsporum (piel y pelo)
Especies de Epidermophyton (piel y uñas)
Especies de Trichophyton (piel, pelo y uñas)
30 Sporothrix schenckii, especies de Cladosporium, especies de Phialophora y especies de Fonsecaea (tejidos subcutáneos/linfáticos - cromoblastomycosis)
Histoplasma capsulatum, Coccidioides immitis, especies de Fusarium, especies de Penicillium (respiratorio sistémico)
Blastomyces dermatitidis (subcutáneo/respiratorio)
Cryptococcus neoformans (respiratorio/SNC)
Especies de Aspergillus, especies de Mucor, especies de Candida y especies de Rhizopus (oportunistas que implican diversos sitios del cuerpo)

35 Además, los hongos son frecuentemente responsables de infecciones comunes tales como infecciones por levadura, tina inguinal, pie de atleta, y otros problemas dermatológicos. La resistencia a agentes antifúngicos hará el tratamiento ineficaz, por lo que la identificación de fármacos apropiados es útil.

40 Con el fin de determinar el patrón de resistencia a terbinafina, un agente antifúngico común usado para infecciones por *Saccharomyces* y *Candida*, se usaron los cebadores de la Tabla 2 para amplificar el amplicón correspondiente de la Tabla 3 usando el método presentado en el Ejemplo 2. Se usaron el ADN aislado de *S. cerevisiae* no mutante o un molde que contiene una mutación en el gen ERG1 que confiere resistencia a terbinafina como materiales de partida, y los resultados del análisis de diferencias de la curva de fusión se muestran en la Figura 11. La secuencia mutada se distingue fácilmente de la secuencia no mutante. Así, este método puede usarse para determinar la resistencia o sensibilidad a fármacos en infecciones fúngicas, además de otras infecciones patógenas.

EJEMPLO 4: DETERMINACIÓN DE LOS PATRONES DE RESISTENCIA Y SENSIBILIDAD PARA CÁNCERES HUMANOS A TAXANOS QUIMIOTERAPÉUTICOS

50 Taxanos tales como taxol, paclitaxel y docetaxel son potentes agentes quimioterapéuticos usados para tratar amplias variedades de cánceres. Su mecanismo de acción es compartido por epítolas y funcionan uniendo y estabilizando polímeros de tubulina en células. Se han descrito sitios de unión para estos fármacos sobre la tubulina (Rao, S., Orr, G.A., Chaudhary, A.G., Kingston, D.G., y Horwitz, S.B. (1995) J. Biol. Chem 270:20235-20238) y mutaciones en esta región o beta tubulina pueden producir resistencia a taxanos (Tabla 3). Se purificó el molde de ADN por medios estándar y se sometió al método presentado en el Ejemplo 2, usando cebadores de la Tabla 2 para amplificar las regiones correspondientes en la Tabla 3. Dos amplicones con mutaciones que causaron resistencia a taxanos (B-tub R282Q y B-tub T247I) fueron fácilmente distinguibles de dos reacciones independientes con ADN no mutante (wt1 y wt2; FIGURA 12) usando esta metodología. Así, este método podría usarse para diagnosticar sensibilidad o resistencia a agentes quimioterapéuticos para permitir a los médicos la oportunidad de entender mejor la naturaleza del cáncer y qué tratamientos es probable que sean eficaces o ineficaces.

EJEMPLO 5:

65 La malaria es una enfermedad infecciosa producida por el parásito llamado *Plasmodia*. Hay cuatro especies identificadas de este parásito que causan la malaria humana, concretamente, *Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, *P.*

ovale y *P. malariae*. 300-500 millones de personas se infectan cada año. El tratamiento más común es la cloroquina, pero la resistencia a la cloroquina ha sido cada vez mayor. Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) utiliza un método para detectar mutaciones resistentes a la cloroquina que dura 28 días.

5 El método descrito en el Ejemplo 2 se aplicó similarmente para determinar su capacidad para diferenciar entre ADN resistente a cloroquina y sensible a cloroquina. Los cebadores presentados en la Tabla 2 se usaron para amplificar el amplicón presentado en la Tabla 3. La Figura 13 muestra los resultados de este ensayo, que demuestran que el método puede identificar fácilmente una mutación en esta región que produce resistencia a la cloroquina frente a una región sensible a cloroquina normal. Así, este método podría usarse para evaluar la sensibilidad a fármacos de infecciones parasitarias y permitir mejores tratamientos. Además, este ensayo puede realizarse en menos de un día, que es significativamente más rápido que los actuales métodos (<http://www.malariasite.com/MALARIA/DrugResistance.htm>).

15 EJEMPLO 6: DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A FÁRMACOS EN INDIVIDUOS INFECTADOS POR EL VIH

Zidovudina (INN) o azidotimidina (AZT) (también llamada ZDV) es un fármaco antiretroviral, el primero autorizado para el tratamiento del VIH. Su mecanismo de acción es mediante el bloqueo de la transcriptasa inversa del VIH, que previene la replicación del material genético viral. Mutaciones en regiones de la transcriptasa inversa del VIH han convertido los virus en resistentes a estos fármacos de primera línea.

20 La Figura 14 muestra los gráficos de diferencia de las curvas de fusión de 2 series independientes usando el método presentado en el Ejemplo 2 para discriminar entre ADN no mutante y resistente a ZDV. Los cebadores presentados en la Tabla 2 se usaron para amplificar las regiones presentadas en la Tabla 3. Este ejemplo demuestra claramente que este método es aplicable a determinar resistencia a fármacos o también sensibilidad en patógenos virales.

25 EJEMPLO 7: DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A METICILINA EN INFECCIONES POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS

30 La infección por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) se produce por bacterias *Staphylococcus aureus* frecuentemente llamadas "staph." Hace décadas, en los hospitales apareció una cepa de staph que era resistente a los antibióticos de amplio espectro comúnmente usados para tratarla. El denominado *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) fue uno de los primeros gérmenes en aventajar a todos los fármacos, pero a los más poderosos. La infección por MRSA puede ser letal. Debido a esto, es importante determinar si una infección por staph dada es multirresistente a fármacos de manera que pueda administrarse el tratamiento apropiado. Generalmente, staph se recoge de tejidos o secreciones nasales, pero también puede aislarse de muestras de garganta o heridas abiertas. Se usan métodos convencionales para extraer el ADN de la muestra clínica.

40 La Figura 15 demuestra que este método puede discriminar entre infecciones por staph multirresistentes e infecciones por staph normales. Usando los cebadores presentados en la Tabla 2 para amplificar la región desvelada en la Tabla 3, con el método presentado en el Ejemplo 2, este método podría distinguir entre regiones no mutantes del ADN de staph y regiones con una única mutación puntual que produce multirresistencia.

45 EJEMPLO 8: EVALUACIÓN DE LA INFECCIÓN POR MTb POR AMPLIFICACIÓN DE FLUJO DINÁMICO

Se evaluaron muestras biológicas que se sospechaba que estaban infectadas con MTb para la presencia de ADN de MTb usando amplificación de flujo dinámico. Muestras humanas tanto positivas como negativas para infección por MTb se trataron usando el siguiente procedimiento:

50 Los oligos son los cebadores FI-15 MTb (Ejemplo 1)

Las condiciones de reacción son:

- 1: 10x tampón FI-15 (Tris-HCl 50 mM, 8,0; 0,25 mg/ml de BSA nativo (no acetilado); MgCl₂ 2 mM; 4 % de DMSO; 2 mM de cada dNTP)
- 2: Enzima Gene-Choice HS-Taq Polimerasa, aunque son aceptables otras ADN polimerasas termostables.
- 3: Cebadores a 0,5 uM final
- 4: Ciclos térmicos: 90 - 10 s

60 Cualquiera de 74, 76, 78 o 80 °C - 10 s (50+ ciclos) (actualmente hecho en <1,25 h)

La Figura 16 muestra los resultados de esta reacción a diferentes temperaturas para el ciclado térmico. Este experimento se realizó en una PCR para simular las condiciones de un bloque térmico en el laboratorio, que cuando se estableció a 80 °C presentó un ciclo de temperatura de +/- 5 °C. Cada par de pocillos realizado a una única temperatura contiene una primera reacción que usa un molde positivo para ADN de MTb, y la segunda un molde negativo para ADN de MTb preparado similarmente. El producto de amplificación de 150 pb esperado aparece a todas las condiciones del ciclo de temperatura probadas solo en muestras positivas para MTb, pero no se amplifica

en muestras de control. Así, la prueba de amplificación de ADN en el campo podría usarse para evaluar infecciones por MTb en muestras humanas, usando solo un protocolo estándar de recogida y preparación de muestras, un bloque de calentamiento para amplificar un producto específico, y un medio para detectar dicho producto. Esto tiene el potencial de permitir el diagnóstico en el campo de la infección por MTb sin la necesidad de enviar las muestras a un centro de prueba designado. Además, puede dar un resultado rápido, que solo requiere poco más de una hora de tiempo de ciclado térmico para amplificar el producto.

EJEMPLO 9: AMPLIFICACIÓN DE FLUJO DINÁMICO PARA IDENTIFICAR LA PRESENCIA DE SALMONELLA TYPHIMURIUM EN UNA MUESTRA DE PRUEBA

El fin de este ejemplo es demostrar que la amplificación de flujo dinámico puede usarse para amplificar una región específica de ADN de una muestra biológica. Así, en lugar de usar una costosa máquina de PCR, tales reacciones podrían tener lugar en un bloque de calentamiento o cualquier dispositivo que mantenga una temperatura. Si el mantenimiento no es altamente preciso y mantiene la temperatura mediante el ciclado entre fase de calentamiento y apagado, hay un flujo natural en la temperatura. Esto es cierto para calentar bloques, calentar hornos, e incluso refrigeradores o congeladores (aunque enfriamiento en lugar de calentamiento).

Se aisló ADN de *Salmonella typhimurium* de muestras biológicas por métodos convencionales. Se prepararon muestras o mezclas de ADN de control (sin molde o molde de *E. coli*) y se sometieron a las siguientes condiciones:

Cebador directo: caccacgctcaccgatgatgccctgctttg Tm 77C
 Cebador inverso: actgggagccattaaccgcatcggtgctg Tm 75C
 Molde:
 actgggagccattaaccgcatcggtgctgtccgcgccagggtgctgccagattggtgattttgctggcctccggttacggctggcg
 ctgaatgtgccagaggctgcatcccaagcagggcatcggtgagcgtggtg Tm = 92C

Reactivos:

10x tampón (mismo que antes)
 dNTPS (2 mM cada uno)
 MgCl 3 mM
 Cebadores a 0,5 uM cada uno
 Colorante: LC Green (Idaho Technology, Inc Sal Lake City, UT)
 Enzima: Tfi (exo -) Invitrogen

Condiciones de los ciclos térmicos: mantenimiento inicial a 79 °C durante 15 minutos (equivalente al uso de un bloque térmico establecido a 77-78 grados Celsius); 90 ciclos: 79 1 min; 76 1 min. La Figura 17 muestra que un producto específico se amplifica de forma detectable en el ciclo 62 y superiores. La amplificación solo se observa en la reacción que contiene ADN de *S. typhimurium* y no en muestras que no contienen ADN o ADN de *E. coli* (no mostrado). Así, esta tecnología podría usarse para identificar la presencia de *S. typhimurium* en una muestra biológica y la indicación de la presencia de infección bacteriana si la muestra es de origen no bacteriano, tal como una muestra de esputo humana o exudado faríngeo. Ventajosamente, el método anterior puede amplificar ADN sin el uso de un ciclador térmico. La detección de productos amplificados puede evaluarse por cualquier método tradicional, que incluye, pero no se limita a, análisis o electroforesis en gel, detección UV, detección fluorescente, detección de oro, captura de híbridos en un ensayo de diagnóstico de ELISA o *in vitro* rápido, captura de productos amplificados por flujo lateral, y similares. En algunas realizaciones, pueden marcarse cebadores, especialmente en el extremo 5' o con marcas internas, para permitir la detección de productos específicos amplificados.

Referencias

Se hace referencia a cada una de las siguientes patentes de EE.UU. y publicaciones pre-concedidas: 4.683.195; 4.965.188; 6.214.587; 6.692.918; 5.219.727; 5.476.774; 5.314.809; 6.040.166; 6.197.563; 6.001.611; 6.617.137; 7.074.600; 6.977.148; 6.740.745; 6.033.881; 7.160.998; 7.081.226; 20070054311; 20050233363; 20050181394; 20040248105; y 20070020672.

Aunque la anterior invención se ha descrito en algún detalle a modo de ilustración y ejemplo para fines de claridad de entendimiento, será rápidamente evidente para un experto habitual en la materia en vista de las enseñanzas de la presente invención que pueden hacerse ciertos cambios y modificaciones a la misma sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Signal Diagnostics Caplin, Brian Erich
 <120> SISTEMA Y METODO PARA ANÁLISIS DE ALTA RESOLUCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS PARA DETECTAR
 VARIACIONES DE SECUENCIA
 5 <130> SIDI-0003
 <150> US 60/908,604
 <151> 2007-03-28
 <160> 215
 10 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Virus de inmunodeficiencia humano
 15 <400> 1
 aaggccaatg gacatatcaa a 21
 <210> 2
 20 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Virus de inmunodeficiencia humano
 <400> 2
 25 gggcaccctc cactctt 17
 <210> 3
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Malaria
 30 <400> 3
 taiftaftta agtgtatgtg taatg 25
 <210> 4
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Malaria
 35 <400> 4
 caatttgtt taagttctt ttatg 25
 <210> 5
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 45 <400> 5
 tcccacgtct ccattt 16
 <210> 6
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 50 <400> 6
 tgagttcogg cactgt 16
 <210> 7
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> S. cerevisiae
 55 <400> 7
 ttcaatgata agaatctgtc tc 22
 <210> 8
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> S. cerevisiae
 65 <400> 8
 agattggcat atgatcacta cc 22

5
 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Estafilococo aureus
 <400> 9
 10 aaagctgcaa atattaagga 20
 <210> 10
 <211> 17
 <212> ADN
 15 <213> Estafilococo aureus
 <400> 10
 ggaatataa cctgcac 17
 20 <210> 11
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 25 <400> 11
 gagcgtgtgg tggtcag 17
 <210> 12
 <211> 17
 <212> ADN
 30 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 12
 cgtctgtctg gfggact 17
 35 <210> 13
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 40 <400> 13
 caaggagttc ttcggcacc 19
 45 <210> 14
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 50 <400> 14
 ggacctccag ccggca 17
 <210> 15
 <211> 16
 <212> ADN
 55 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 15
 ggtggcacag gccaat 16
 60 <210> 16
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 65

5 <400> 16
gaagcgaccg tcgca 16

<210> 17
<211> 15
<212> ADN
10 <213> Tuberculosis micobacteriana

<400> 17
ccgcgcgtgc tggtc 15

15 <210> 18
<211> 19
<212> ADN
<213> Tuberculosis micobacteriana

20 <400> 18
tccatgtagt ccacctcag 19

<210> 19
<211> 16
<212> ADN
25 <213> Tuberculosis micobacteriana

<400> 19
cagtcgcccg aacgta 16

30 <210> 20
<211> 15
<212> ADN
<213> Tuberculosis micobacteriana

35 <400> 20
tggtagtcgc ccgct 15

<210> 21
<211> 18
<212> ADN
40 <213> Tuberculosis micobacteriana

<400> 21
caatcgaggc ggtgtct 18

45 <210> 22
<211> 13
<212> ADN
<213> Tuberculosis micobacteriana

50 <400> 22
cgaccgcccg ttg 13

<210> 23
<211> 14
<212> ADN
55 <213> Tuberculosis micobacteriana

<400> 23
gatgcgcacc gccca 14

60

65

5 <210> 24
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

10 <400> 24
 goggtgccat caggag 16

15 <210> 25
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

20 <400> 25
 goggggact accat 15

25 <210> 26
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

30 <400> 26
 gattgccac gtgccag 18

35 <210> 27
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

40 <400> 27
 gcaacggggc gtc 13

45 <210> 28
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

50 <400> 28
 ccctggtggc caagc 15

55 <210> 29
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

60 <400> 29
 gctggcac caggg 15

65 <210> 30
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

70 <400> 30
 ctggcgtgc gcatc 15

75 <210> 31
 <211> 17

5

<212> ADN
<213> Tuberculosis micobacteriana

10

<400> 31
ccgogtgtac accacaa 17

15

<210> 32
<211> 16
<212> ADN
<213> Tuberculosis micobacteriana

20

<400> 32
agcgcacacc aggca 16

25

<210> 33
<211> 20
<212> ADN
<213> Tuberculosis micobacteriana

30

<400> 33
ggattgacgg taggtggaga 20

35

<210> 34
<211> 21
<212> ADN
<213> Tuberculosis micobacteriana

40

<400> 34
acgetgcac ctacgtatt a 21

45

<210> 35
<211> 14
<212> ADN
<213> Tuberculosis micobacteriana

50

<400> 35
ccgcctggg gagi 14

55

<210> 36
<211> 15
<212> ADN
<213> Tuberculosis micobacteriana

60

<400> 36
catgetccgc cgctt 15

65

<210> 37
<211> 20
<212> ADN
<213> Tuberculosis micobacteriana

70

<400> 37
tagccaaagt ctgactgat 20

75

<210> 38
<211> 16
<212> ADN
<213> Tuberculosis micobacteriana

80

5 <400> 38
gogcattcac tgcttc 16

<210> 39
<211> 21
<212> ADN
10 <213> Tuberculosis micobacteriana

<400> 39
tgtgataat caccttgcc t 21

15 <210> 40
<211> 16
<212> ADN
<213> Tuberculosis micobacteriana

20 <400> 40
cggggaattg atcgcc 16

<210> 41
<211> 15
<212> ADN
25 <213> Tuberculosis micobacteriana

<400> 41
accagctcac cgctc 15

30 <210> 42
<211> 20
<212> ADN
<213> Tuberculosis micobacteriana

35 <400> 42
ggtagatagtg gtgaagtagt 20

<210> 43
<211> 16
<212> ADN
40 <213> Tuberculosis micobacteriana

<400> 43
gogtcagca agctca 16

45 <210> 44
<211> 16
<212> ADN
<213> Tuberculosis micobacteriana

50 <400> 44
cgcgaaattg ctgtca 16

<210> 45
<211> 15
<212> ADN
55 <213> Tuberculosis micobacteriana

<400> 45
ctgtgcgcat gcaac 15

60

65

5
 <210> 46
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

10
 <400> 46
 tcccggttag gccga 15

15
 <210> 47
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

20
 <400> 47
 caaacggatt ctggttagcg 20

25
 <210> 48
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

30
 <400> 48
 ggttgatgcc caccocg 17

35
 <210> 49
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

40
 <400> 49
 caagtaagggt gtgcggt 17

45
 <210> 50
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

50
 <400> 50
 gccgacgato gcactc 16

55
 <210> 51
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

60
 <400> 51
 gagccgattt caogaacc 18

65
 <210> 52
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

70
 <400> 52
 ctctgttaag cctcaga 17

75
 <210> 53
 <211> 16

5 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 53
 tgggccggat ggaatc 16

10 <210> 54
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 54
 gaagcgaac gaaatgt 17

15 <210> 55
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 55
 ctgctgcga attcgt 17

20 <210> 56
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 56
 gatccccgg ttctc 16

25 <210> 57
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 57
 gctgacagac catcc 15

30 <210> 58
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 58
 gtctagccg tcatga 16

35 <210> 59
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 59
 tccgaagalc ogttctac 18

40 <210> 60
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

45

50

55

60

65

5 <400> 60
gagcgcaaca ccglttc 17

<210> 61
<211> 17
<212> ADN
<213> Tuberculosis micobacteriana

10 <400> 61
gacttctcg aogaacc 17

15 <210> 62
<211> 18
<212> ADN
<213> Tuberculosis micobacteriana

20 <400> 62
gctgcaaga tcaatacc 18

25 <210> 63
<211> 19
<212> ADN
<213> Tuberculosis micobacteriana

30 <400> 63
ttcaaccoga tgaactacg 19

35 <210> 64
<211> 17
<212> ADN
<213> Tuberculosis micobacteriana

40 <400> 64
ggtgatcacc ttggccg 17

45 <210> 65
<211> 17
<212> ADN
<213> Tuberculosis micobacteriana

50 <400> 65
tgggtctat gtcctga 17

55 <210> 66
<211> 19
<212> ADN
<213> Tuberculosis micobacteriana

60 <400> 66
gcagtaoctt cagattgag 19

65 <210> 67
<211> 19
<212> ADN
<213> Tuberculosis micobacteriana

<400> 67
ggotcaatct gaaggtact 19

5 <210> 68
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

10 <400> 68
 gggccagctg ttaag 15

15 <210> 69
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

20 <400> 69
 ttgcgcgcgc ttaac 15

25 <210> 70
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

30 <400> 70
 ggtfccggtg ccatac 16

35 <210> 71
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

40 <400> 71
 gtatggcaacc ggaacc 16

45 <210> 72
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

50 <400> 72
 tccttggcgg tgtattg 17

55 <210> 73
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

60 <400> 73
 cgctaccga cgatg 15

65 <210> 74
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

70 <400> 74
 gacttgtggc tgcagg 16

75 <210> 75
 <211> 15

5 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 75
 cctgcagcca caagt 15

10 <210> 76
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 76
 gcaggttcgc ctgtc 16

15 <210> 77
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 77
 cggccagagta catgc 15

20 <210> 78
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 78
 ggtcccagg tgatac 16

25 <210> 79
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 79
 ggcaaggatg gcagt 15

30 <210> 80
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 80
 gcacgicgaa cctgt 15

35 <210> 81
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 81
 ggcgggcalt ttct 15

40 <210> 82
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 82
 ggcgggcalt ttct 15

45 <210> 83
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 83
 ggcgggcalt ttct 15

50 <210> 84
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 84
 ggcgggcalt ttct 15

55 <210> 85
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 85
 ggcgggcalt ttct 15

60 <210> 86
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 86
 ggcgggcalt ttct 15

65 <210> 87
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 87
 ggcgggcalt ttct 15

5 <400> 82
 ggogatgato ggctc 15

<210> 83
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

10 <400> 83
 ggogalgatt tccaggt 17

<210> 84
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

15 <400> 84
 gccaaagcct gtaggt 16

<210> 85
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

20 <400> 85
 tgggogacaa cctcc 15

<210> 86
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

25 <400> 86
 gccccggata ccagag 16

<210> 87
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

30 <400> 87
 actcggitta tcaögaog 18

<210> 88
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

35 <400> 88
 ccstggotac caggac 16

<210> 89
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

40 <400> 89
 gtatacatcg glgcttgc 18

45

50

55

60

65

5
 <210> 90
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

10
 <400> 90
 gcaccagcgg tgaaca 16

15
 <210> 91
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

20
 <400> 91
 ggcaccgatg gactg 15

25
 <210> 92
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

30
 <400> 92
 ccaccaoggt gatcag 16

35
 <210> 93
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

40
 <400> 93
 cgccatcaac gactc 15

45
 <210> 94
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

50
 <400> 94
 ttgcggtcog atgta 15

55
 <210> 95
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

60
 <400> 95
 ttgggttcc tgcctc 16

65
 <210> 96
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

70
 <400> 96
 ggfttgctgg cctcc 15

75
 <210> 97
 <211> 15

5 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

<400> 97
 tcaacaacgg cctgc 15

10 <210> 98
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

15 <400> 98
 atggaccgct cgatca 16

<210> 99
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

20 <400> 99
 caaccgtcac ctgacc 16

25 <210> 100
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

30 <400> 100
 ttctggcgcg aacc 15

<210> 101
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

35 <400> 101
 ggctgggtcca aogtg 15

40 <210> 102
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

45 <400> 102
 gcattgggat caggctcg 18

<210> 103
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

50 <400> 103
 ttgcccggag caaag 15

<210> 104
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

60

65

5 <400> 104
 ccgtagtagc cgtct 15
 <210> 105
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

10 <400> 105
 atgtcagcgt gcaac 15
 <210> 106
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

15 <400> 106
 gatcctccgt ottctoca 18
 <210> 107
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

20 <400> 107
 ccggaactga accaga 16
 <210> 108
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

25 <400> 108
 gggatagcg actta 15
 <210> 109
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

30 <400> 109
 gagcaggtgc ttccc 16
 <210> 110
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

35 <400> 110
 ctctgtggc gaacg 15
 <210> 111
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

40 <400> 111
 gggtectat ggcgg 15

45

50

55

60

65

5
 <210> 112
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 112
 ggttgaacaa cccaagtc 18

10
 <210> 113
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 113
 cgatcccgat aggtgttt 18

15
 <210> 114
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 114
 ggcaaccaga tcagac 17

20
 <210> 115
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 115
 atcacaggag tggagtt 17

25
 <210> 116
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 116
 aagatgttgc gccaet 16

30
 <210> 117
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 117
 taogaaccac acgttgc 17

35
 <210> 118
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 118
 gttggtacc cgacag 16

40
 <210> 119
 <211> 15

45

50

55

60

65

5 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

<400> 119
 gcttgacgccc gctac 15

10 <210> 120
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

15 <400> 120
 gaagttgagt tgcaggt 18

<210> 121
 <211> 15
 <212> ADN
 20 <213> Tuberculosis micobacteriana

<400> 121
 cagccgatgc cgctg 15

25 <210> 122
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

30 <400> 122
 cgccgatgcg glaagaa 17

<210> 123
 <211> 15
 <212> ADN
 35 <213> Tuberculosis micobacteriana

<400> 123
 acagcgccaa cgcca 15

40 <210> 124
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

45 <400> 124
 gacgatcgga ggtcgt 10

<210> 125
 <211> 15
 <212> ADN
 50 <213> Tuberculosis micobacteriana

<400> 125
 tgcgcctag gclga 15

55 <210> 126
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

60

65

5
 <400> 126
 alctgctggc cgaac 15
 <210> 127
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

10
 <400> 127
 cgggtacgcc caaat 15
 <210> 128
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

15
 <400> 128
 ccagatggtg actcgg 16
 <210> 129
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

20
 <400> 129
 attcaatat cggttggc 18
 <210> 130
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

25
 <400> 130
 ccacgatcgc cattgt 16
 <210> 131
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

30
 <400> 131
 ggtgagcaca tcgacc 16
 <210> 132
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

35
 <400> 132
 atagctggcg algttga 17
 <210> 133
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

40
 <400> 133
 cggcagacctg ttctt 15

45
 <400> 133
 cggcagacctg ttctt 15

50
 <400> 133
 cggcagacctg ttctt 15

55
 <400> 133
 cggcagacctg ttctt 15

60
 <400> 133
 cggcagacctg ttctt 15

65

5 <210> 134
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

10 <400> 134
 cggctagaag tagttcg 18

15 <210> 135
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Mycobacterium tuberculosis

20 <400> 135
 gcaactacca ccggca 16

25 <210> 136
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

30 <400> 136
 gtaggcgago gacca 15

35 <210> 137
 <211> 81
 <212> ADN
 <213> Virus de inmunodeficiencia Humano

<400> 137

aaggccaatg gacatatcaa atttatcaag agccatttaa aaatctgaaa acaggaaaat 60

atgcaagaat gaggggtgcc c 81

40 <210> 138
 <211> 62
 <212> ADN
 <213> Malaris

45 <400> 138

tatttattta agtgtatgtg taatgaataa aatttttgct aaaagaactt taacaaaaat 60

tg 62

50 <210> 139
 <211> 90
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

55 <400> 139

60

65

5	tcccacgtct ccatttcttt atgcctggct ttgccoctct caccagccgt ggaagccagc	60
	agtategagc tctcacagtg ccggaactca	90
10	<210> 140 <211> 67 <212> ADN <213> <i>S. cerevisiae</i> <400> 140	
15	ttcaatgcta agaatcctgc tcoctatgac ggtaacgtta ttcttggtag tgatcatag	60
	ccaatct	67
20	<210> 141 <211> 74 <212> ADN <213> <i>Staphylococcus aureus</i> <400> 141	
25	aaagctgcaa atattaagga aaataatacc attgttgcta gacacatttt aggtaaagtg	60
	caggttatat tgcc	74
30	<210> 142 <211> 81 <212> ADN <213> <i>Tuberculosis micobacteriana</i> <400> 142	
35	gagcgtgtgg tggtaagcca gctgggtcgg tcgccccggg tgtacttcga cgagaccatt	60
40	gacaagtcca ccgacaagac g	81
45	<210> 143 <211> 137 <212> ADN <213> <i>Tuberculosis micobacteriana</i> <400> 143	
50	caaggagttc ttggcaacca gccagctgag ccaattcatg gaccagaaca acccgtgtc	60
	ggggttgacc cacaagcgcc gactgtcggc gctggggccc ggcggctctg cacgtgagcg	120
	tgccgggctg gaggtcc	137
55	<210> 144 <211> 43 <212> ADN <213> <i>Tuberculosis micobacteriana</i>	
60		
65		

5 <400> 144
 ggaggcacag gccaatcgc cgaicgatgc ggacggcgc ttc 43

<210> 145
 <211> 71
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

10 <400> 145

ccgcgcgtgc tggtcgcgcg caaggcgggc gaggtggagt acgtgcctc gtctgaggtg 60

15 **gactacatgg a 71**

<210> 146
 <211> 151
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

20 <400> 146

25 **cagtgcctcg aacgtatggt ggacgtatgc gggcgttgat catcgtcgac gtgcagaacg 60**
actctgcga gggcggctcg ctggcggtaa ccggtggcgc cgcgctggcc cgcgccatca 120
gcgactacct ggcogaagcg gcggactacc a 151

30 <210> 147
 <211> 111
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

35 <400> 147

caatcgaggc ggtgttctac aagggtgcct acaccggagc gtacagcggc ttccaaggag 60

40 **tcgaagagaa cggcacgcca ctgctgaatt ggtcgcggca acgcggcgtc g 111**

<211> 49
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

45 <400> 148
 gatgcgcacc gccagcgtcg agtgggttg cagctcctga tggcaaccg 49

50 <210> 149
 <211> 159
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

55 <400> 149

60

65

ES 2 582 602 T3

5 gggggggact aocatcacgt cgtggcaacc aaggacttcc acatcgacc gggtgaccac 60
 ttctcgggca caccggacta ttctctgtcg tggccaccgc attgcgtcag cggtaactccc 120
 gggggggact tccatcccag tctggacaog tggcaatc 159
 <210> 150
 <211> 101
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 150
 15 gcaacggcggc gtcgatgagg tccgatgtgt cggatttggc accgatcatt gtgtgogcca 60
 gacggccgag gacgggtac gcaatggctt ggcaccagg g 101
 20 <210> 151
 <211> 88
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 25 <400> 151
 gcttggccac cagggtgctg gtggacctga cagcgggtgt gtggccgat accaocgtcg 60
 30 ccgcgctgga ggagatgccc accgccag 88
 35 <210> 152
 <211> 179
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 152
 40 ccgcgtgtac accaccactc cgaagaagcc gaactcggcg ctccggaagg ttgcccggt 60
 gaagttgacg agtcaggctg aggtcacggc gtacattccc ggcgagggcc acaacctgca 120
 ggagcaactcg atggtgctgg tggcggcgg ccgggtgaag gacctgctg gtgtgogct 179
 45 <210> 153
 <211> 76
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 50 <400> 153
 ggattgacgg taggtggaga agaagcaccg gccaaactac tgccagcagc cgcgtaata 60
 55 cgtagggtgc gacgt 76
 60 <210> 154
 <211> 74
 <212> ADN
 65

	<213> Tuberculosis micobacteriana	
5	<400> 154	
	cccgcctggg gagtacggcc gcaaggctaa aactcaaagg aattgacggg ggccccaca	60
10	agcggcggag catg	74
	<210> 155	
	<211> 142	
	<212> ADN	
15	<213> Tuberculosis micobacteriana	
	<400> 155	
20	tagccaaagt cttgactgat tccagaaaag ggagtcatat tgtctagtgt gtcctctata	60
	ccggactacg ccgaacagct ccggacggcc gacctgocg tgacccgacc gcgegtccg	120
	gtcctggaag cagtgaatgc gc	142
25	<210> 156	
	<211> 125	
	<212> ADN	
	<213> Tuberculosis micobacteriana	
30	<400> 156	
	tgtgatatat cacctttgcc tgacagcgac ttcacggcac gatggaatgt cgcaaccaa	60
	tgcaattgcc gctttgatga tgaggagagt catgccactg ctaaccattg gcgatcaatt	120
35	ccccg	125
	<210> 157	
	<211> 80	
	<212> ADN	
40	<213> Tuberculosis micobacteriana	
	<400> 157	
45	aacagctcac cgctctcacc gccggtgacc tgtccaaggt cgacgccaaag cagccccggc	60
	actacttcac cactatcaac	80
	<210> 158	
	<211> 78	
50	<212> ADN	
	<213> Tuberculosis micobacteriana	
	<400> 158	
55	gcgttcagca agctcaatga cgagttcgag gaccgcgacg ccagatcct gggggtttcg	60
	attgacagcg aattcggc	78
60		
65		

5 <210> 158
 <211> 78
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 159

10 ctgtgogcat gcaactggog caagggcgac ccgacgctag acgctggcga actcctcaag 60
 gcttoggcct aaccggga 78

15 <210> 160
 <211> 299
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 160

20 caaacggatt ctggttagcg gaatcatcac cgactogtcg atcgcgttc acatcgcaag 60
 ggtagcccag gagcagggcg ccagctggt gctcaccggg ttcgaccggc tgdggctgat 120
 25 tcagcgcatc accgaccggc tgcggcaaa ggccccgctg ctogaactcg acgtgcaaaa 180
 cgaggagcac ctggccagct tggccggccg ggtgaccgag gcgatcgggg cgggcaacaa 240
 30 gctcgaccgg gtggtgcatt cgattgggtt catgccgcag accgggatgg gcatcaacc 299

35 <210> 161
 <211> 120
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 161

40 gtacggtg tgogttogaa tctcgttgcg gcagggccca tccggacgct ggcgatgagt 60
 gatcgtcg gcggtgcgct cggcgaggag gccggcgccc agatccagct gctcgaggag 120

45 <210> 162
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 162

50 gagccgattt caogaaccgg tggggacggt catggtcccc gcggtttgt ggcataacc 60
 tgatctgagg cgtaaaccgag 80

55 <210> 163
 <211> 280
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 163

60

65

5 tgggcccgat ggaatcgaaa ccgctgcgoc ggggcdataa aatgattatc ggcctgoggg 60
 gttcctatgg cgcctgtgtc atgattgcca tgctgtctgc ggtggtcgga ctgggttgt 120
 tcaaccgct atcgggtggg gccgggttga tctcggccg gatggcatat aaagaggaca 180
 aacaaaaccg gttgctgcg gtgcgcagcg aggccaaggc caatgtgcgg cgcttctgoc 240
 10 acgacatttc gttctgtctc 260

 <210> 164
 <211> 292
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 164

 20 ctgctgcgca attcgtaggg cgtcaataca ccgcagcca gggcctcgt gcccgaaag 60
 ggatccgtca tggctgaagt gtgctgagtc acaccgaca acgtcagag cgtascecca 120
 gtgogaaagt tcccgccgga aatgcagcc acgttacgt cgtggacata ccgatttcgg 180
 25 cccggccgcg gcgagacgat aggttctcgg ggtgactgcc acagccactg aaggggcca 240
 accccatttc gtatcccggt cagtcctggt tacoggagga aaccggggga tc 292

 <210> 165
 <211> 79
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 165

 35 gccgacagac catccggctg tctggaacca ccggctggt gaccacata ccgtcagac 60
 cgtatcatca ggctacgac 79

 <210> 166
 <211> 68
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 166

 45 tccgacgac cgttctact cccacctgcc ggctaccagc atgccgtgcc cggaacggtg 60
 50 ttgcgctc 68

 <210> 167
 <211> 118
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 167

 60

 65

5	gacttctctcg acgaaccctt tgaggacatt ctgtogaocg cggaaatttc ccattgtctc	60
	ggcgacacca agctgggttag cgcggtgccc accccgcgcg tattgatcgt gcagcc	116
10	<210> 168 <211> 63 <212> ADN <213> Tuberculosis micobacteriana	
	<400> 168	
15	ttcaaccoga tgacctacgc cggcatggcg agactggcgc tgatcggcgc caaggtgatc	60
	acc	63
20	<210> 169 <211> 298 <212> ADN <213> Tuberculosis micobacteriana	
	<400> 169	
25	tggggtctat gtcctgattg ttcgatatcc gacacttcgc gatcacatcc gtgatcacag	60
	cccgataaca ccaactctctg gaaggaatgc tgtgcccgag caacacccac ccattacaga	120
30	aaccaccacc ggagccgcta gcaacggctg tcccgtcgtg ggtcatatga aataccocgt	180
	cgagggcggc ggaaaccagg actcgtggcc caaccggctc aaagtatact ttatggggca	240
	gctcccgcgc cctttggtec tgaccaccgg gttggccgag tttctgaagg tactgc	296
35	<210> 170 <211> 284 <212> ADN <213> Tuberculosis micobacteriana	
40	<400> 170	
	ggctcaatct gaaggtactg caccaaaaac cggccgtcgc tgaccgatg ggtgcggcgt	60
45	tcgactatgc cgcggaggtc ggcaccatcg acgttgacgc cctgacgcgg gacatcgagg	120
	aagtgatgac cacctgcgag ccgtggtggc ccgcgcacta cggccactac gggccgctgt	180
	ttatccggat ggcgtggcac gctgcggcca cctaccgcat ccacgacggc cgcggcggcg	240
50	ccggggggcg catgcagcgg ttccgcgcgc ttaacagctg gcc	284
55	<210> 171 <211> 680 <212> ADN <213> Tuberculosis micobacteriana	
	<400> 171	
60		
65		

5 ttcgcgccgc ttaacagctg gcccgacaac gccagcttgg scaagggcgc ccgctgctg 60
 tggccgggtca agaagaagta cggcaagaag ctctcatggg cggacctgat tgttttcgcc 120
 ggcaactgcg cgttggaatc gatgggcttc aagacgttcg ggttcggctt cggccgggtc 180
 gaccagtggg agcccgatga ggtctatttg ggcaaggaag ccacctggct cggcgatgag 240
 10 cgttacagcg gtaagcggga tctggagaac ccgctggccg cgttcagat ggggctgatc 300
 tacgtgaacc cggaggggccc gaacggcaac ccggacccc tggccgcggc ggtcgacatt 360
 cgcgagacgt ttcggcgcat ggccatgaac gacgtcgaaa cagcggcccg ccagctgtaa 420
 15 ggcctctgca aagcccgcta ccggtacttg ctgcagcttt gtcgcggct gatcgtcggc 480
 ggtcacactt tcgtaagac ccctggcgcc ggcccggccg atctggtcgg ccccgaacc 540
 20 gaggtgctc cgtcggagca gatgggcttg ggctggaaga gctcgtagcc ggggcttggg 600
 ctccgacgag ggcacctcgt ctaccogaac ccgacctct ccagcattgg caccggaacc 660

25 <210> 172
 <211> 162
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 172

30 gtatggcacc ggaaccgta aggacgcgat caccagcggc atcagggctg tatggacgaa 60
 caccocgacg aaatgggaca acagtttctt ccagatcctg tacggctacg agtgggagct 120
 35 gacgaagagc cctgctggcg cttggcaata caccgccaag ga 162

40 <210> 173
 <211> 393
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 173

45 cgtcccccga ccatgctggc cactgacctc tcgctgcggg tggatccgat ctatgagcgg 60
 atcacggctc gctggctgga acaccocgag gaattggccg acgagttcgc caaggcctgg 120
 tacaagctga tccaccgaga catgggtccc gttcgcgagat accttgggccc gctggtcccc 180
 50 aagcagaccc tgctgtggca ggatccggtc cctgcggtca gccacgacct cgtcggcgaa 240
 gccgagattg ccagcotta gagecagatc cgggcacatgg gattgactgt ctccageta 300
 gtttcgaccg catggggcggc ggcgtcgtcg ttccgtggta gcgacaagcg cggcggcgcc 360
 55 aacgggtggtc gcacccgctt gcagccacaa gtc 393

60 <210> 174
 <211> 356

65

5 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 174

10 cctgcagcca caagtcgggt gggaggtcaa cgaccccagc ggggatctgc gcaaggtcat 60
 togcaccctg gaagagatcc aggagtcatt caactccgcg ggcgccggga acatcaaagt 120
 gtccttcgcc gacctcgtcg tgctcgggtg ctgtgccgcc atagagaaag cagcaaaggc 180
 15 ggttgccac aacatcacgg tgcccttcac cccgggccc cgggatgctg cgcaggaaca 240
 aaccgacgtg gaatectttg ccgtgctgga gcccaaggca gatggcttc gaaactaact 300
 cggaaagggc aaccgcttgc cggccgagta catgctgctc gacaaggcga acctgc 356

20 <210> 175
 <211> 190
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 175

25 cggccgagta catgctgctc gacaaggcga acctgcttac gctcagtgc cctgagatga 60
 cggtgctggt aggtggcctg cggctcctcg ggcgaaacta caagcctta ccgtgggcg 120
 30 tgttcaccga ggcctcogag tcaactgacca acgactctt cgtgaacctg ctgacatgg 180
 gtatcacctg ggagcc 196

35 <210> 176
 <211> 181
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 176

40 ggcaaggatg gcagtgcca ggtgaagtgg accggcagcc ggtggacct ggtcttcggg 60
 tccaactcgg agttggggc gcttgctgag gtctatggcg ccgatgacgc gcagccgaag 120
 45 ttcgtgcagg acttcgtcgc tgctgggac aaggtgatga acctcgacag gttcgacctg 180
 c 181

50 <210> 177
 <211> 67
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 177

55 gggggcctg tttctggctg tctggtgcc gctggacaac ggccttcggc ccgagccgat 60
 categcc 67

60

65

5 <210> 178
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

10 <400> 178
 ggogatgatt tccagatacc cggcgtggtc ggttggocgg tctaacctac aggctttgg 59

15 <210> 179
 <211> 263
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

<400> 179

20 **tggggacaa cctccgggc cccgatact cacggcctt aaccggctcg cctaccatcg 60**
agcctgtgc ccaacgaagg taatgagcga tctcaccgga tcgcacgcct agcagcctc 120
gtctcgggaa tcgcggtct gctgctgtgc ggcatactc cgtctcttc ggtgaaccaa 180

25 **accaccgga ccatctctg gccgcagggc agcaaccgcg accgcaacat caccagatc 240**
accgcccctc tggatccgg ggc 263

30 <210> 180
 <211> 79
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

<400> 180

35 **actcggttta tcacgacgc cggcggctc aagaaggcgc tgatgctct cggcgtgctg 60**
gcggctctgg tagccatgg 79

40 <210> 181
 <211> 180
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

45 <400> 181

gtatacatcg gtgcttgccc agctggcggc ggtgagcacc gccggcgtct ggatgcgcct 60

50 **gcccgccacc ctggccggaa tcgctgctg gctgatgctc agcctttcg tctcggggc 120**
gctgggaccg gccccgggcg ggctggcctc caaccggctc gctgtgttca cgcctggctc 180

55 <210> 182
 <211> 67
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

60 <400> 182

65

5 ggcaccgatg gactgctggc ggcgctggcg gtgctggccg cggcgttgtc gctgatcacc 60
 gtggtgg 67

10 <210> 183
 <211> 346
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 183

15 ggcacacacc gactccgcgg gcaccgcgg agggaaagggc cgggtcggga tcaacgggtc 60
 gcacgcggcg ctgcggttcg gattggacc gccacgtacc cgggtgatgg gcagctacgg 120
 ggagaacaac ctggccgcca cggccacctc ggcttggtac cagttaccgc cccgcagccc 180
 20 ggaccggccg ctggtggtgg ttcccgggc cggcgccatc tggctctaca aggaggacgg 240
 cgatttcate tacggccagt cctgaaaat gcagtggggc gtcaccggcc cggaccggcg 300
 catccagcca ctggggcagg tatttcgat cgacatcgga ccgcaa 346

25 <210> 184
 <211> 293
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 184

30

35 ttccgcttcc tgcctcggca tgtcatcggc gcgaattcgt cggacgacgg ctacatcctg 60
 ggcattggccc gactgcgcga ccacgcggc tacatgtcca actatttcg ctggttcggc 120
 agcccgagg atcccttcg ctggtattac aacctgctgg cgtgatgac ccatgtcagc 180
 40 gacgccagtc tgtggatgc cctgccagac ctggcccgcc ggctagtgtg ctggtcgtg 240
 ctgtcgcgtg aggtcctgc ccgcctcggg ccggcgggtg aggcacgcaa acc 293

45 <210> 185
 <211> 76
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 185

50 tcaacaacgg cctgcggccg gaggccatca tgcgctcgg ctgcctggtc acctatgtgc 60
 tgatcgagcg gtccat 76

55 <210> 186
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

60

65

5 <400> 186
 cacocgtcatc ctgacocgtgg tgttgcgcga ccagaccctg tcaacoggtgt tggaaqccac 60
 cagggttcgc gccaaaa 77

10 <210> 187
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

15 <400> 187
 ggctggteca acgtgcgggc gtttgcggc ggctgcggac tggccgacga cgtactcgtc 60
 gagcctgata ccaatgc 77

20 <210> 188
 <211> 302
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

25 <400> 188
 ttcccccag caaagatgcc cgcgatgcc gtcgcggctc ggggtggtggc cgaggatctg 60
 togtgacac cggaggactg gatcgggtg accccgcgcg gggtaacgga cctgcgcctca 120
 ctgcaggaat atgtgggtc gacgcagccg gtgctgctgg actgggggtt cggtttggcc 180
 ttcccggtgc agcagccgat gctgcacgcc aatggcatcg ccgaaatccc gaagttccgc 240
 atcacaccgg actactcggc taagaagctg gacaccgaca cgtgggaaga cggcactaac 300
 gg 302

30 <210> 188
 <211> 105
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

35 <400> 189
 atgtcacgt gcaactggtg cgggtggggc acccggggc attcggtgc gtaccaccg 60
 acgaggagga ccgcgtagtc gcctttctgg agaagacgga ggatc 105

40 <210> 190
 <211> 392
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

45 <400> 190

50

55

60

65

	ctgaaccggc gcacactgcg ccagaccgag ttcatcgcg tgcgcaagct ggcgggtgcc	120
5	gagcgacacc agctcaatag ggccctgctg agcgtggacc gttttgtgcg ccgggacagt	180
	ccgctaccgg tggaccggg catcctgctg caattgctcg agcggttcgg catgttcggc	240
10	atccggatgt cgattgccc gctggcggcc ggcgtagacc attcgaccgg gctggccgcc	300
	gaactgctgg agcgacggg gctgggtggc ctgcgcaatg tgatagacca gcagttcggc	360
	cagcgtccg acatgctaa ggcgcatacc gc	392
15	<210> 191 <211> 72 <212> ADN <213> Tuberculosis micobacteriana	
20	<400> 191	
	gagcaggtgc ttcccgcgc gacggagcga gtgctgctg gggtagctgg cgaatacgt	60
25	tggcaacag ag	72
30	<210> 192 <211> 68 <212> ADN <213> Tuberculosis micobacteriana	
	<400> 192	
35	gggttcctat gggggcgtgg tcatgattgg catgctgctg tcggtggctg gacttgggt	60
	gttcaacc	68
40	<210> 193 <211> 300 <212> ADN <213> Tuberculosis micobacteriana	
	<400> 193	
45	cgatccgat aggtgtttg ccggttgcg gatcagacc cgatttcggg gtgaggcggc	60
	atccatagcg togatggcag agcgccgctc acgcccggc acagcttctt cgattgaagg	120
50	gaaatgaaga tgacctgct tatcgattac atcctgagcc tgttcgcgag cgaagacgcc	180
	gcctggctgt tggttgccg ccgggaggg gccatgacca gtgcccggct gatgatata	240
	gcgcccacc aatctcctc ggtggcggc aatgtggtgc cgggtctgaa tctgggtgcc	300
55	<210> 194 <211> 292 <212> ADN	
60		
65		

	<213> Tuberculosis micobacteriana	
5	<400> 194	
	atcacaggag tggagttttg aacgcaacga cggcaggtag tgtgcaattc aacgtcttag	60
10	gaccactgga actaaacctc cggggcaacca aactgccatt gggaaagccg aaacaacgtg	120
	cogtgctogc catgctgttg ctatcccgga accaagtgtg agcggccgac gcactggtcc	180
	aggcaatctg ggagaagtcg ccacctgcac gagcccgacg caccgccac acgtacattt	240
15	gcaaccttcg coggacctg agcgatgcag gcggtgattc gcgcaacatc tt	292
	<210> 195	
	<211> 65	
	<212> ADN	
20	<213> Tuberculosis micobacteriana	
	<400> 195	
25	taagaaccac acggttgcca gacatcacac tagactactt gtgtaacggc gccctgtcgg	60
	gtagccaa	68
	<210> 196	
	<211> 70	
	<212> ADN	
30	<213> Tuberculosis micobacteriana	
	<400> 196	
35	gcttgacgcc gctaacggc acggcagcag cactggccac ggcgctggca gcaactgcga	60
	actcaacttc	70
	<210> 197	
	<211> 80	
	<212> ADN	
	<213> Tuberculosis micobacteriana	
45	<400> 197	
	cagccgatgc cgtgtcaag ggccacagc ccggtacatc gcacggcgtg ccgagatcct	60
	gggttcttac cgcacggcg	80
50		
	<210> 198	
	<211> 79	
	<212> ADN	
	<213> Tuberculosis micobacteriana	
55	<400> 198	
60		
65		

5	acagcgccaa cgtcagccgc caccacgccc tcctcgtcga cacgggcacc aactacgta	60
	tcaacgacct ccgatcgtc	79
10	<210> 199 <211> 129 <212> ADN <213> Tuberculosis micobacteriana	
	<400> 199	
15	tcgcccctag gctgaccggg tgtcaatcgt gacgccatac gaggacctgc tgcgcttctg	60
	gctcgaaacg ggtacgccc aatccgaccg cacgggcacc ggaaccggca gctgtttcgg	120
20	ccagcagat	129
25	<210> 200 <211> 200 <212> ADN <213> Tuberculosis micobacteriana	
	<400> 200	
30	ogggtagccc caaatccgac cgcaccggca ccggaaccgg cagcctgttc ggccagcaga	60
	tgcgctatga ttgtcgggc ggtttccggc tgcctactac caagaaagtc cttttcaat	120
35	cggtagccta cgagctgctg tggtttttgc gggcgattc caatatcggg tggctgcacg	180
	agcacggagt caccatctgg	200
40	<210> 201 <211> 107 <212> ADN <213> Tuberculosis micobacteriana	
	<400> 201	
45	attccaatat cggttggctg cagcagcagc ggtcaccat ctgggacgaa tgggcaagt	60
	atacagggca actcggggccg atctacggtg tacaatggcg atcgtgg	107
50	<210> 202 <211> 228 <212> ADN <213> Tuberculosis micobacteriana	
55	<400> 202	
60		
65		

5 ggtgagcaca togaccagat cagcgcggcg ctggatttgc tgcgcaccga tcccgattcc 60
 100 eggcgcacatca tcgtgtcggc ctggaacgtc ggcgaaatcg agcggatggc gctgcgcgcc 120
 180 tgtcatgcgt tcttcagtt ctacgtcgc gatggcggc tgagctgtca gctctaccaa 180
 228 cgcagcgcgc acctgtttct ggggtgtgcg ttcaacatcg ccagctat 228

10 <210> 203
 <211> 200
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 15 <400> 203

20 cgcgcacctg tttctgggtg tgcggttcaa catcgccagc tatgogttgc tcacccacat 60
 120 gatggcgcgc caggccggct tctcggtcgg cgagttcctc tggaccggtg gcgactgcca 120
 180 catctacgac aatcaogtgc agcaagtacg gctgcagctc agccgcgagc cgcggccata 180
 200 tccgaaacta ettctagccg 200

25 <210> 204
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 30 <400> 204

35 gcaactacca cccgcacggc gacgcgtcga tctacgacag cctggtgcgc atggcccagc 60
 77 cctggtcgcg gcgctac 77

40 <210> 205
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 205
 ccggaaacgt ctgcatcgca aactc 25

45 <210> 206
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 50 <400> 206
 tgcgcgigt gtagaagcc gigtgaa 28

55 <210> 207
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana
 <400> 207
 logtcatca ccgatcc 17

60
 65

5 <210> 208
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

10 <400> 208
 gtgagcagtt cgttcca 17

15 <210> 209
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

20 <400> 209
 tcaacgagac gggcaagct 19

25 <210> 210
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

30 <400> 210
 tgagagagta ggagtc 16

35 <210> 211
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

40 <400> 211
 gtccagcgc gcttc 15

45 <210> 212
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

50 <400> 212
 ctgtaccca cagccggta ggt 23

55 <210> 213
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

60 <400> 213
 gccagcattg aggat 15

65 <210> 214
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

<400> 214
 caattcgggc accaataa 18

<210> 215
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Tuberculosis micobacteriana

<400> 215
 tgagatgccg acgtttccg 19

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de amplificación de un ácido nucleico diana, que comprende:
- a. desnaturalizar el ácido nucleico diana;
 - b. hibridar cebadores de oligonucleótidos con el ácido nucleico diana; y
 - c. extender los cebadores de oligonucleótidos hibridados;
- 10 en el que las etapas de desnaturalizar, hibridar y extender se llevan a cabo por ciclos térmicos dentro de 10 °C de la temperatura de fusión del ácido nucleico diana, y dentro del solapamiento entre las temperaturas de fusión de los cebadores de oligonucleótidos y la temperatura de fusión del ácido nucleico diana; y en el que los cebadores de oligonucleótidos se diseñan para tener una temperatura de fusión que está dentro de aproximadamente 10 °C de la temperatura de fusión del ácido nucleico diana.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, que comprende ensayar el producto de ácido nucleico amplificado para detectar una o más variaciones de secuencias de ácidos nucleicos con respecto a una secuencia de referencia.
- 20 3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que los ciclos térmicos están dentro de 2,5 °C o 5 °C de la temperatura de fusión del ácido nucleico diana, opcionalmente en el que el método se lleva a cabo a una temperatura entre 75 °C y 90 °C.
- 25 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las temperaturas de fusión de uno o ambos de los cebadores de oligonucleótidos es la misma que la temperatura de fusión del ácido nucleico diana, o está dentro de 2,5 °C o 5 °C de la temperatura de fusión del ácido nucleico diana.
- 30 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ácido nucleico diana y los cebadores de oligonucleótidos están en un flujo dinámico de hibridación y desnaturalización.
- 35 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la amplificación produce productos específicos de amplificación del ácido nucleico diana.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la amplificación disminuye la formación de productos de amplificación no específicos en comparación con la amplificación dentro de un amplio intervalo de temperatura.
- 40 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el producto de ácido nucleico diana amplificado se detecta por una lectura de detección colorimétrica, opcionalmente en el que la lectura es una señal positiva o negativa, y opcionalmente en el que el producto de ácido nucleico diana amplificado se detecta por fluorescencia emitida de un colorante fluorescente que se une a ADN.
- 45 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en el que el ensayo se realiza por análisis de curvas de fusión de alta resolución.
- 50 10. El método de la reivindicación 9, en el que el análisis de las curvas de fusión detecta uno o más apareamientos erróneos de pares de bases entre el producto de ácido nucleico diana amplificado y la secuencia de referencia.
- 55 11. El método de la reivindicación 10, en el que el ácido nucleico diana es de un microorganismo infeccioso, y comprende al menos un polimorfismo asociado a reactividad, sensibilidad o resistencia del microorganismo a un fármaco.
- 60 12. El método de la reivindicación 10, en el que ácido nucleico diana es de un microorganismo infeccioso y la secuencia de referencia incluye al menos un polimorfismo asociado a reactividad, sensibilidad o resistencia a un fármaco.
- 65 13. El método de la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en el que dos o más variaciones en el ácido nucleico diana indican reactividad, sensibilidad o resistencia al fármaco.
- 60 14. Un método según cualquier reivindicación precedente, en el que el ácido nucleico diana es ADN.

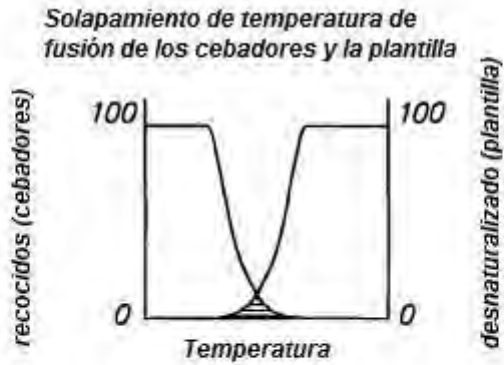


FIG. 1

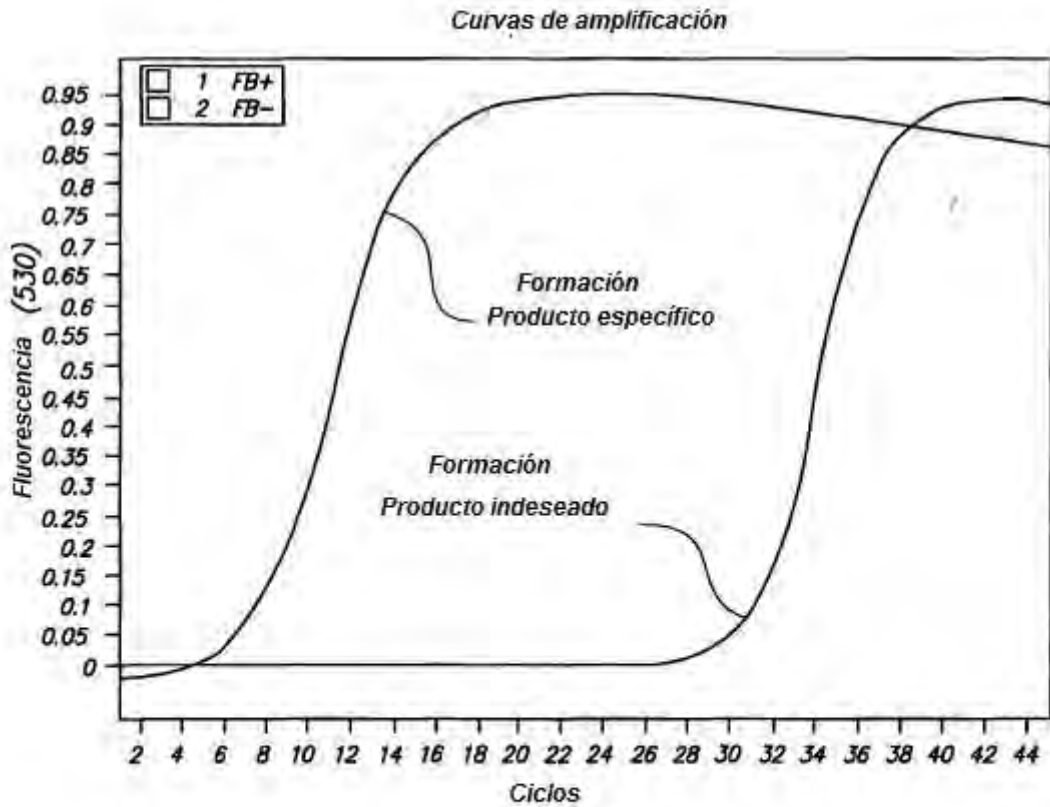


FIG. 2

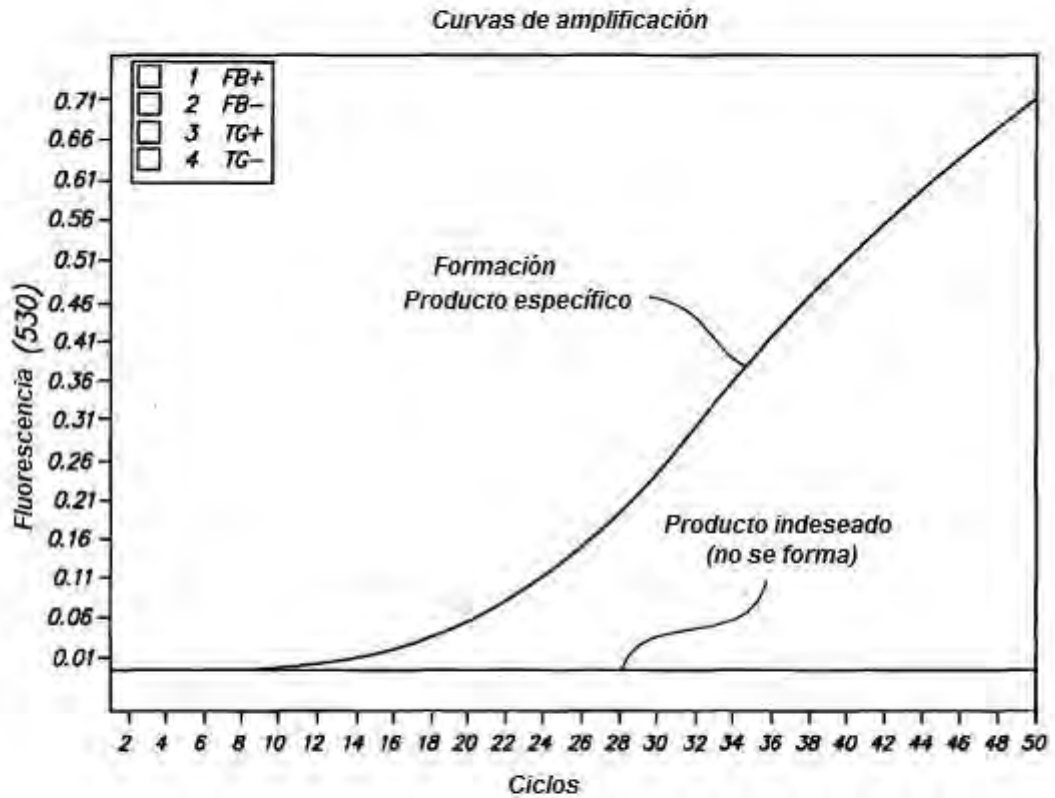


FIG. 3

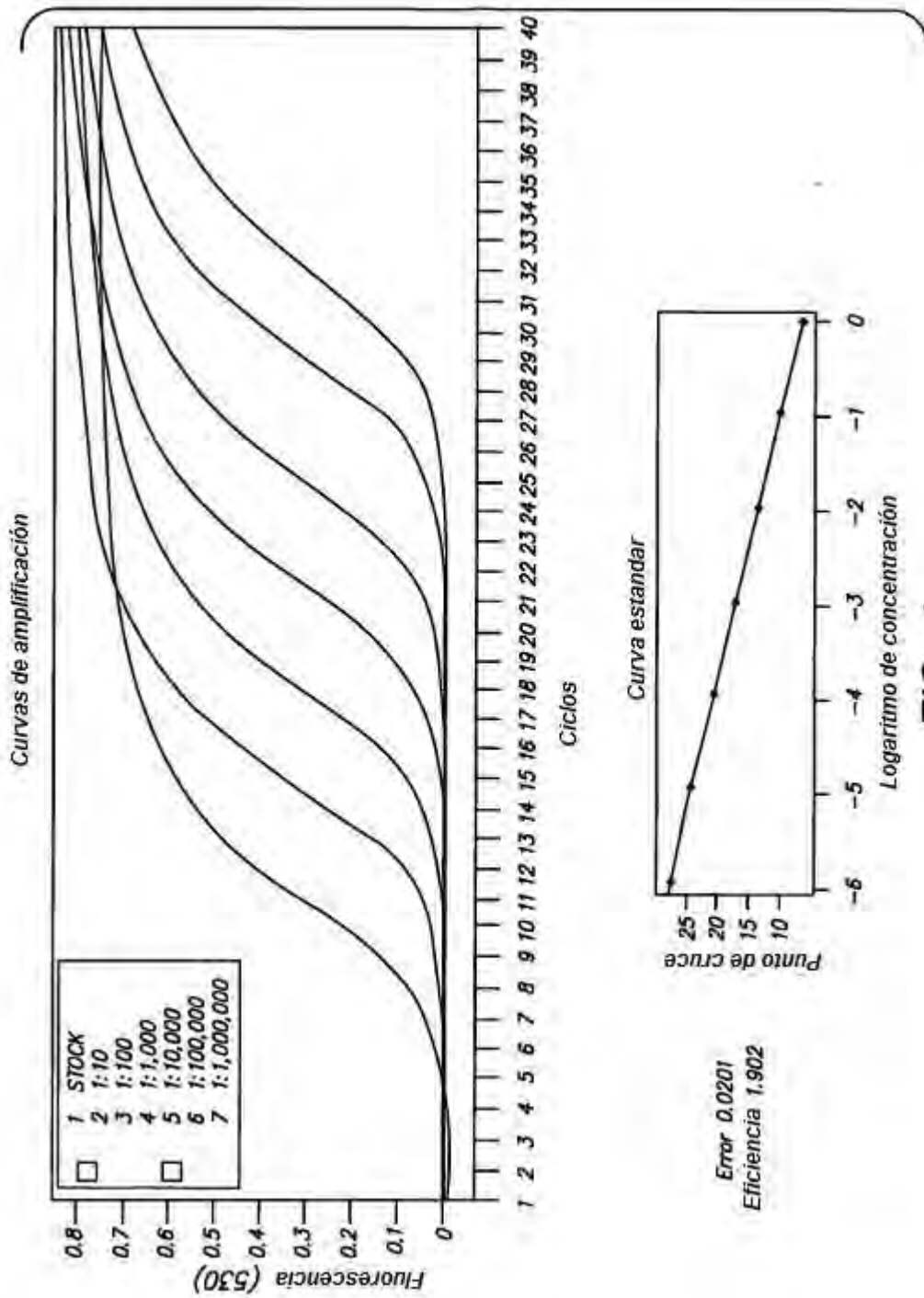
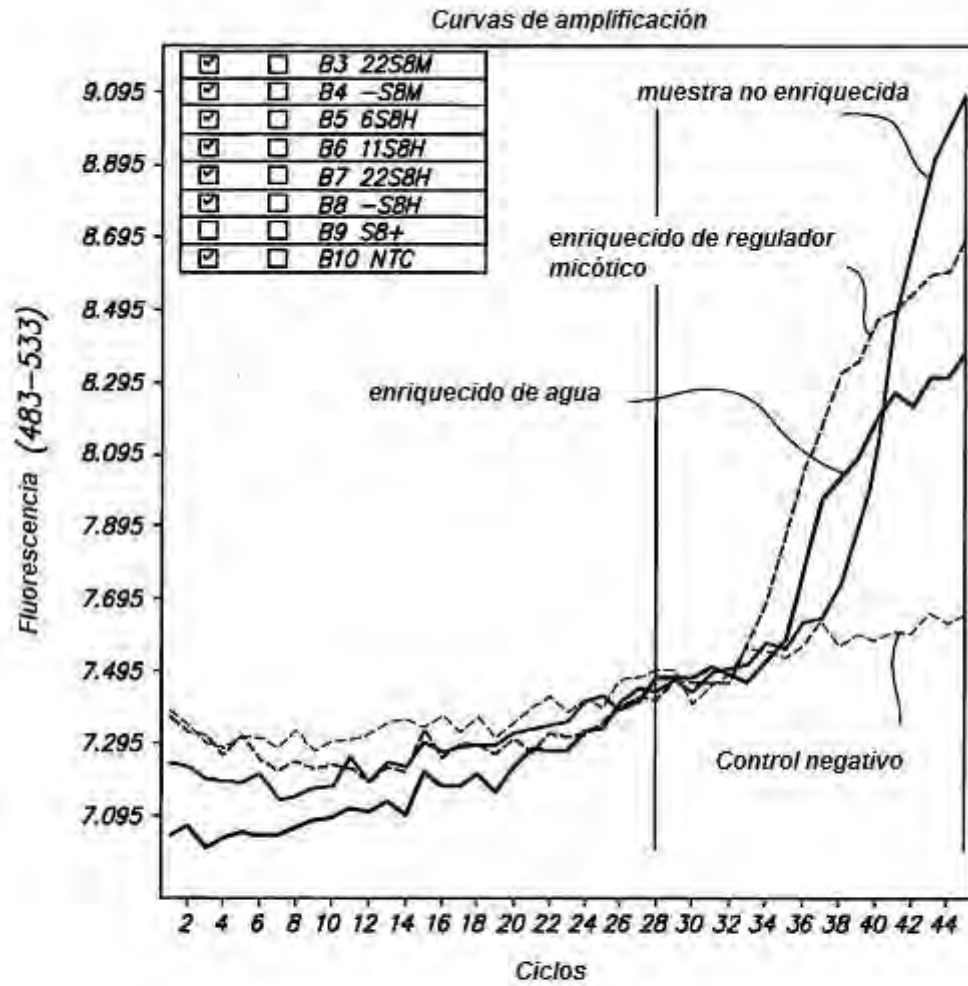


FIG. 4



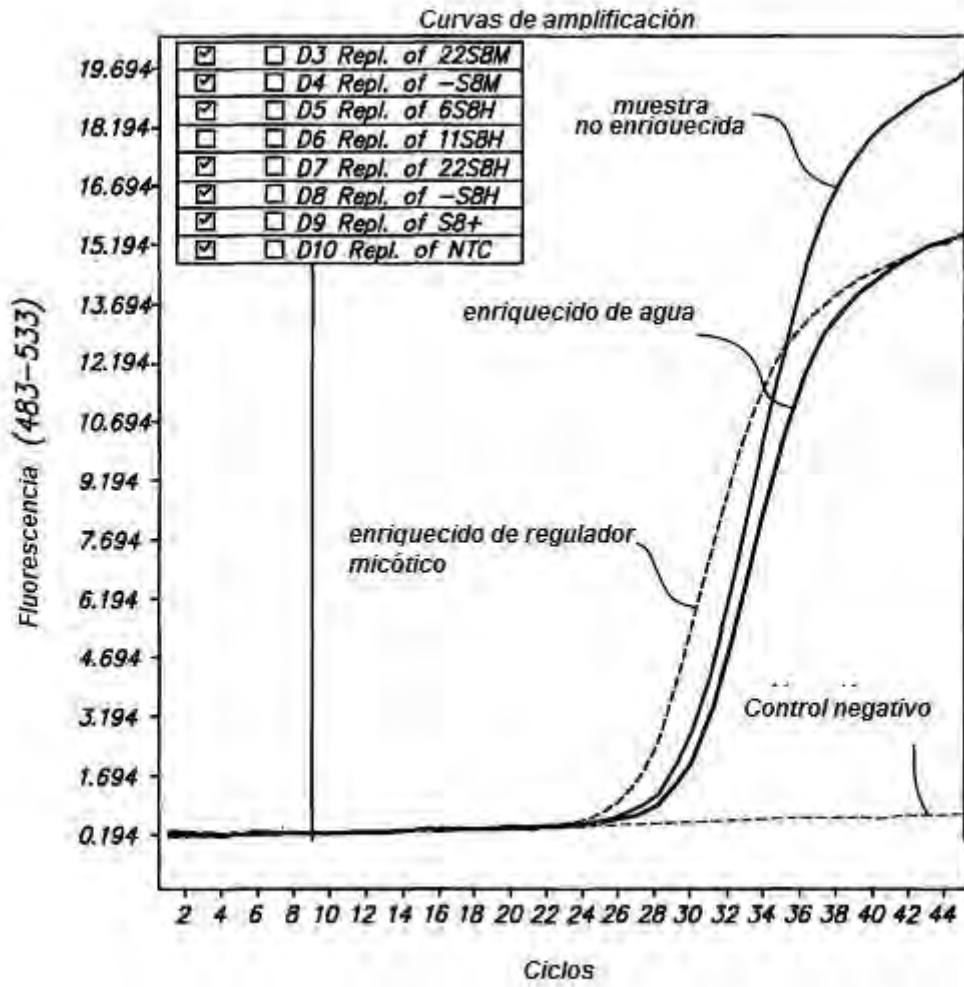
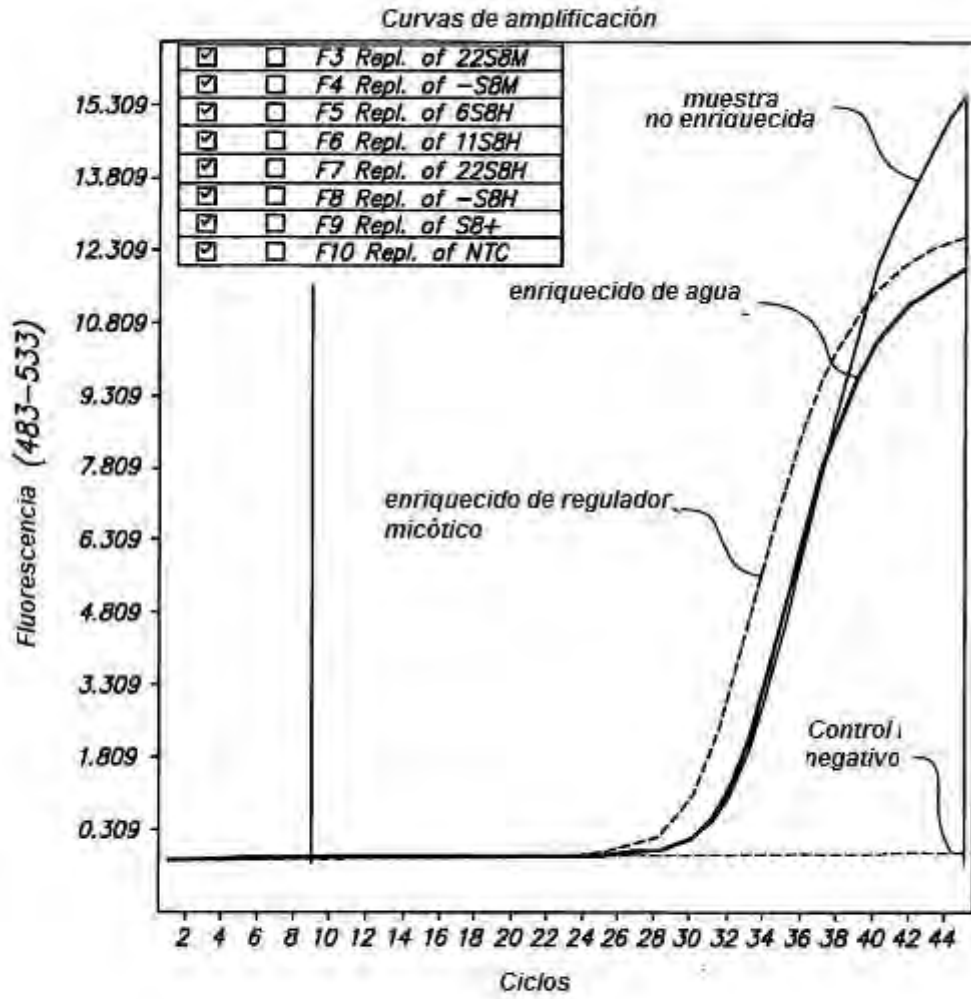


FIG. 5B



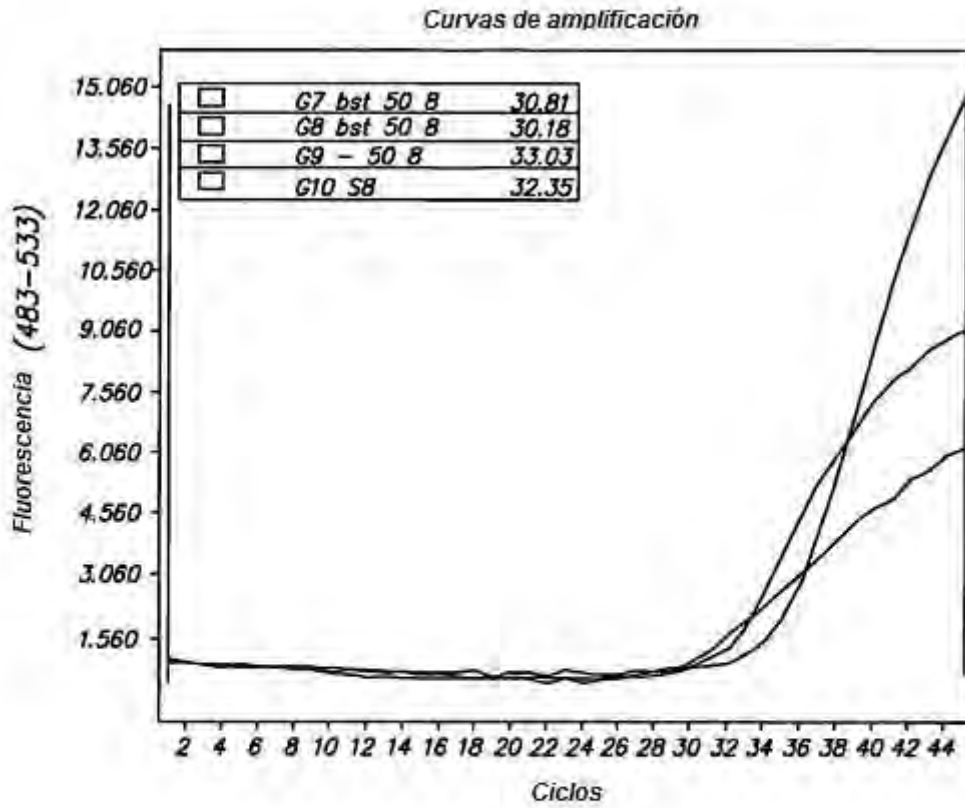


FIG. 5D

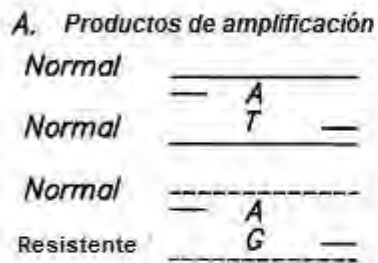
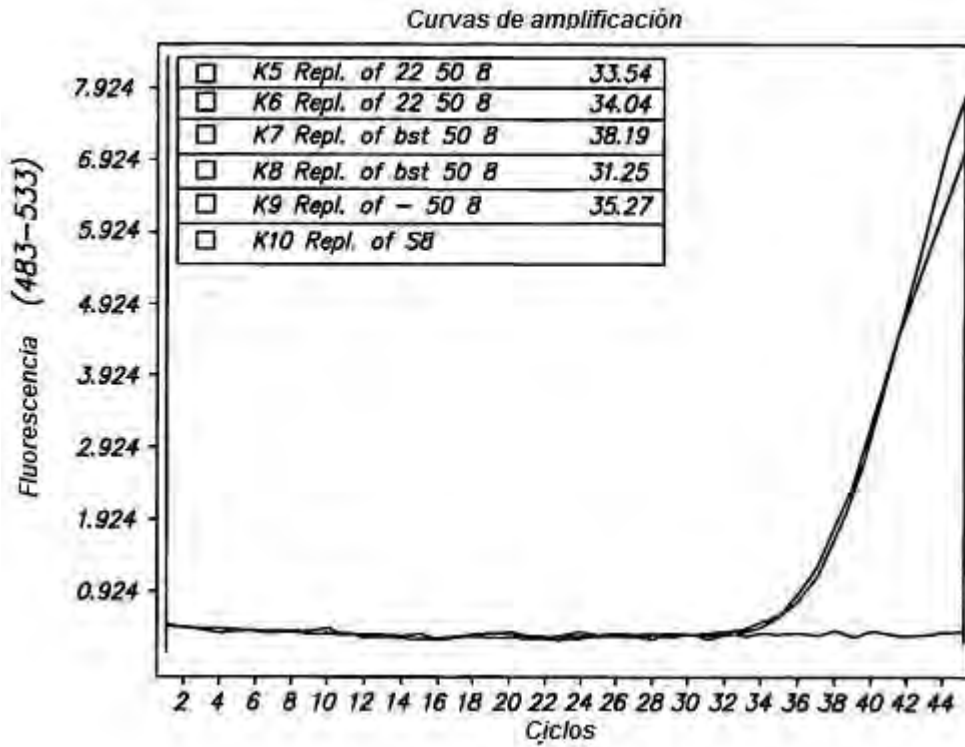


FIG. 6A

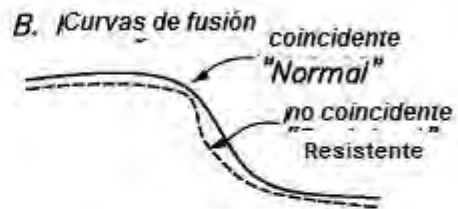
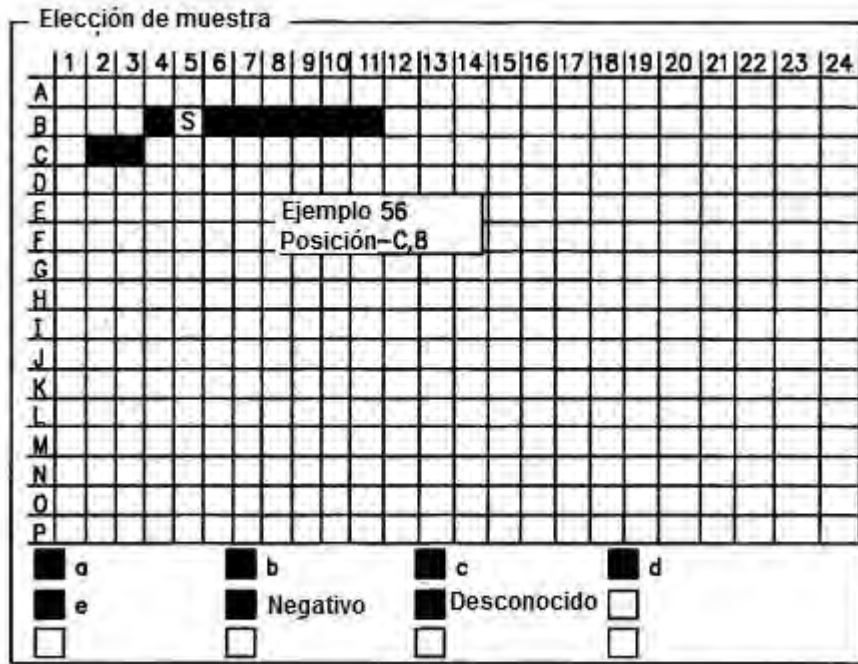


FIG. 6B

C. Parcelas de diferencia



FIG. 6C



Filtro Negativo	Normalizar	Grupo Tm	Agrupado	Resultado	Nombre de grupos	Secuencia
-----------------	------------	----------	----------	-----------	------------------	-----------

Agrupado

Estandar: Sensibilidad:

Estandar diferente: Auto

Seleccionar line base	Limpiar Celdas	Computar grupos
Ejemplo de identidad	Deseleccionar Negativos	

Editar Grupos

Grupo:

! Seleccionar grupo virgen	Borrar grupo	Añadir Grupo
----------------------------	--------------	--------------

Editar llamadas: las muestras marcadas serán cambiadas al tipo seleccionado abajo

Nueva llamada

Estado

FIG. 7A

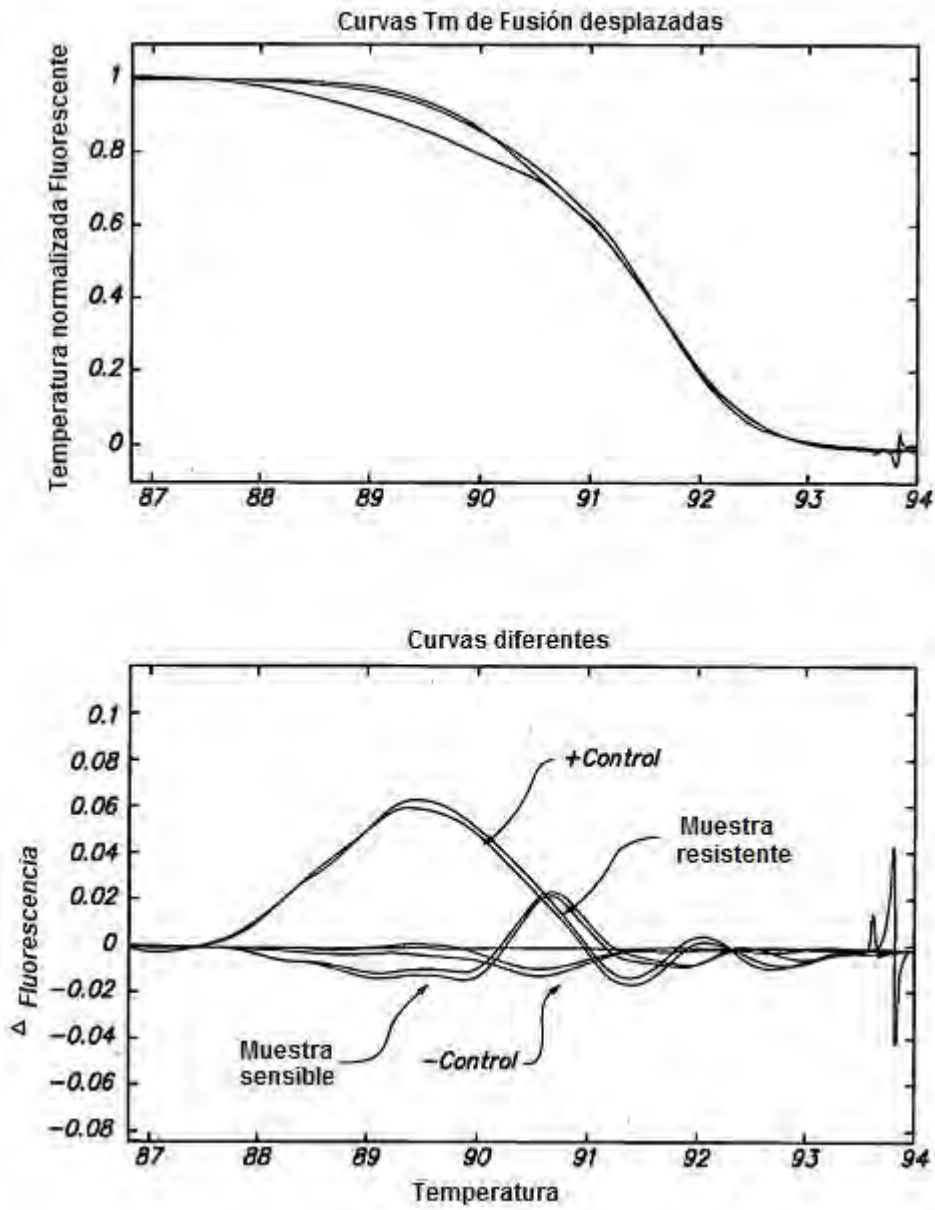


FIG. 7B

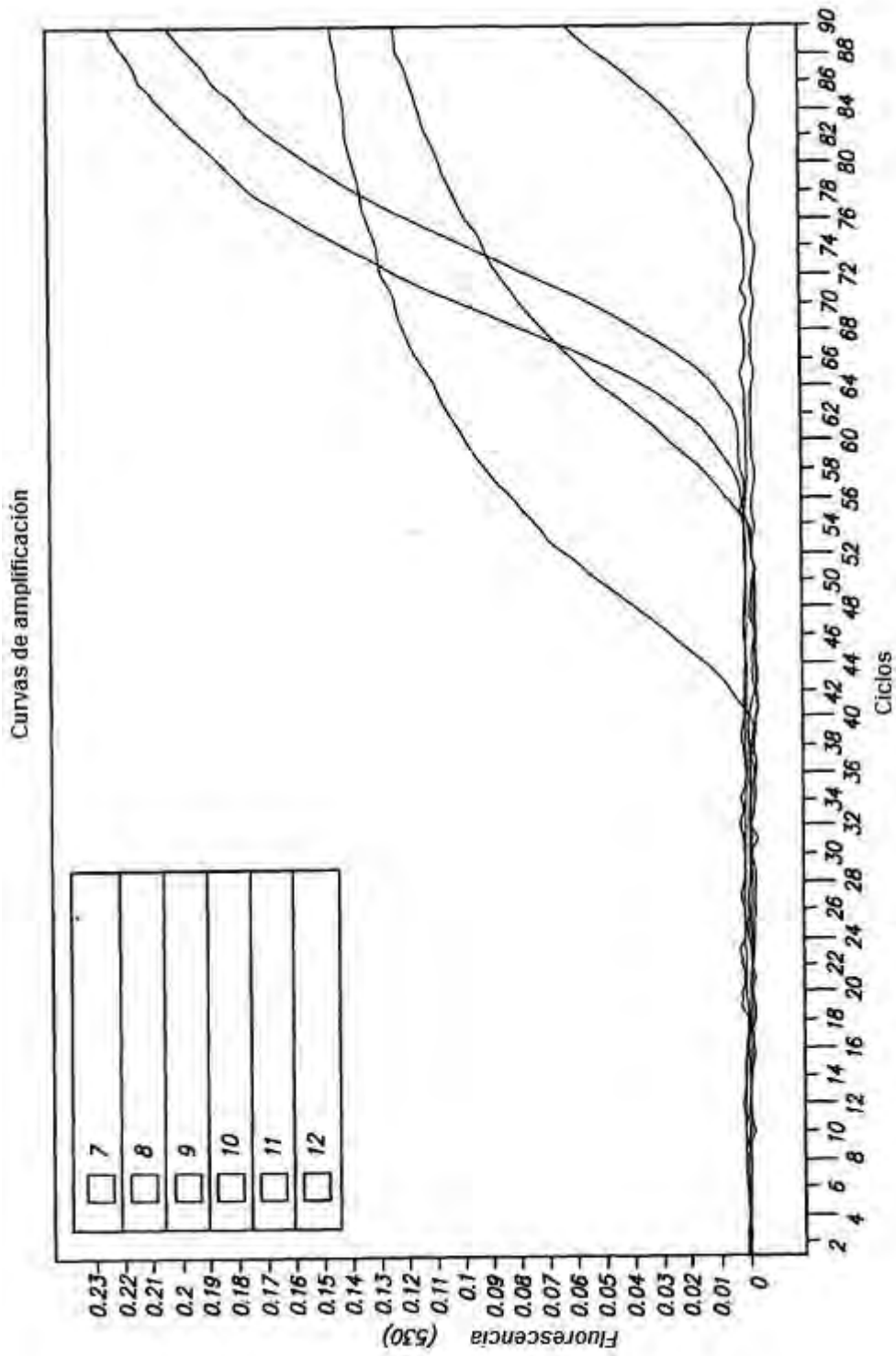


FIG. 8

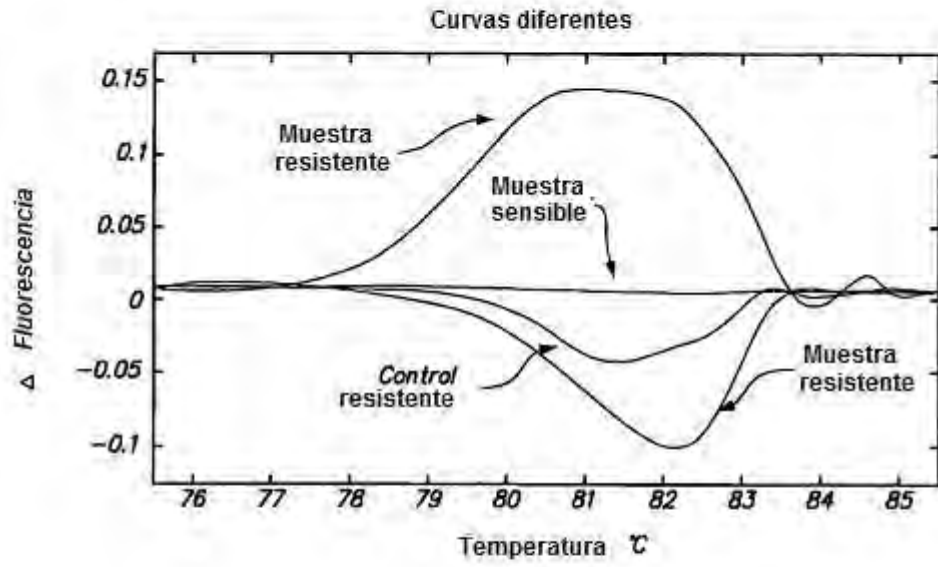


FIG. 9

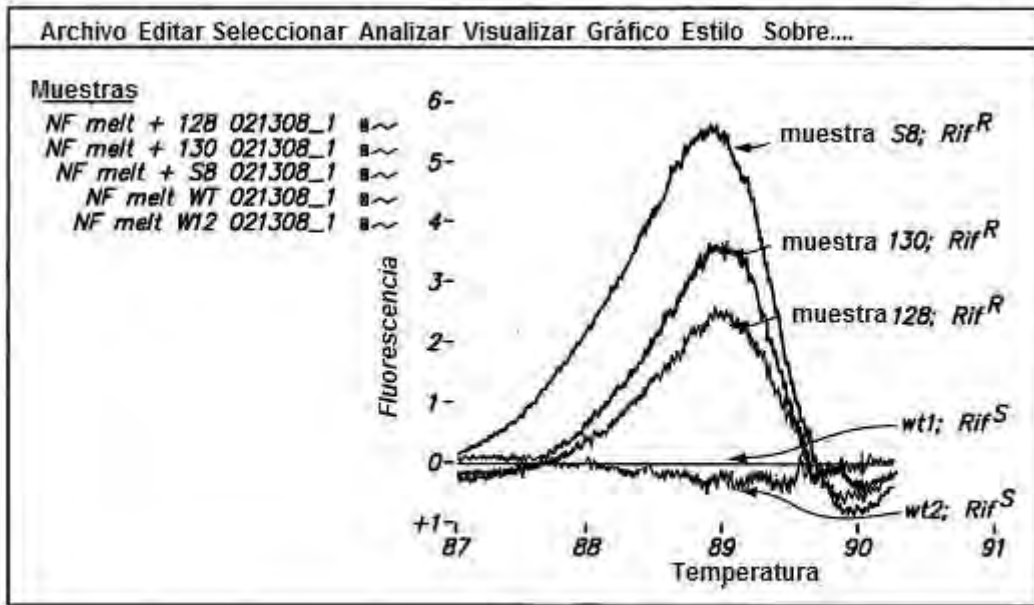


FIG. 10A

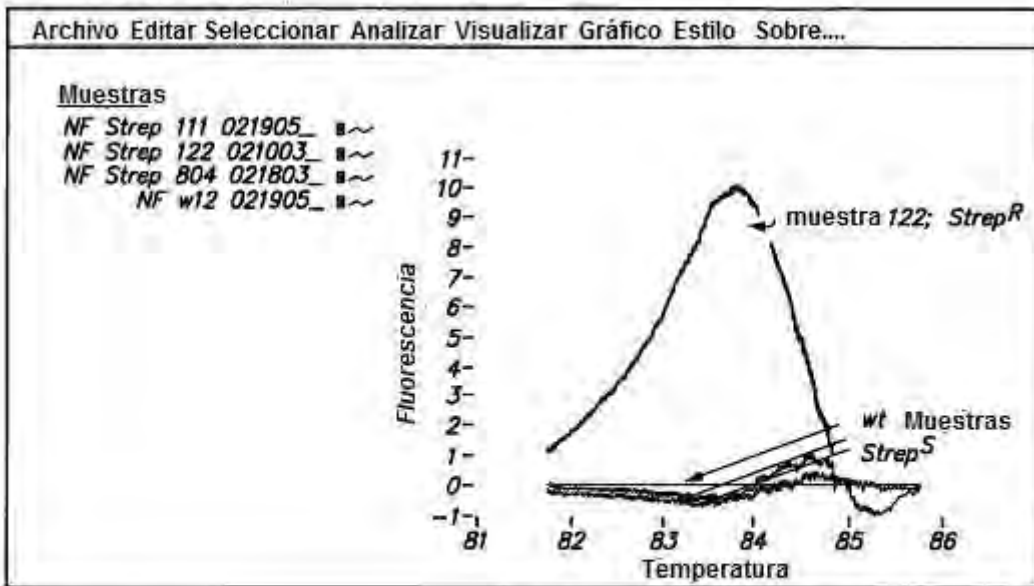


FIG. 10B

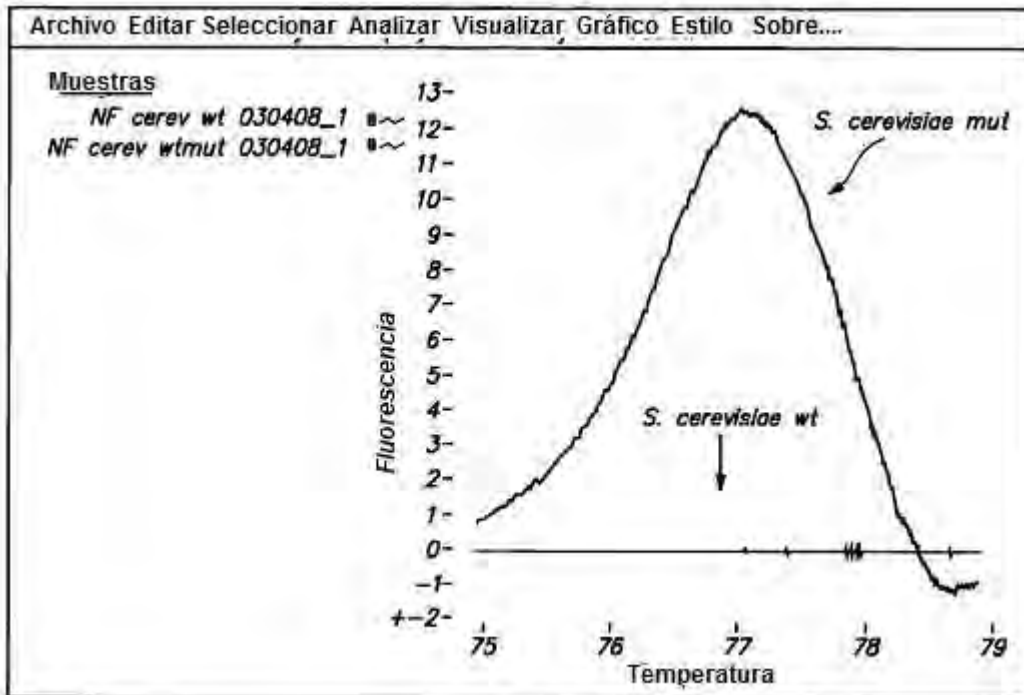


FIG. 11

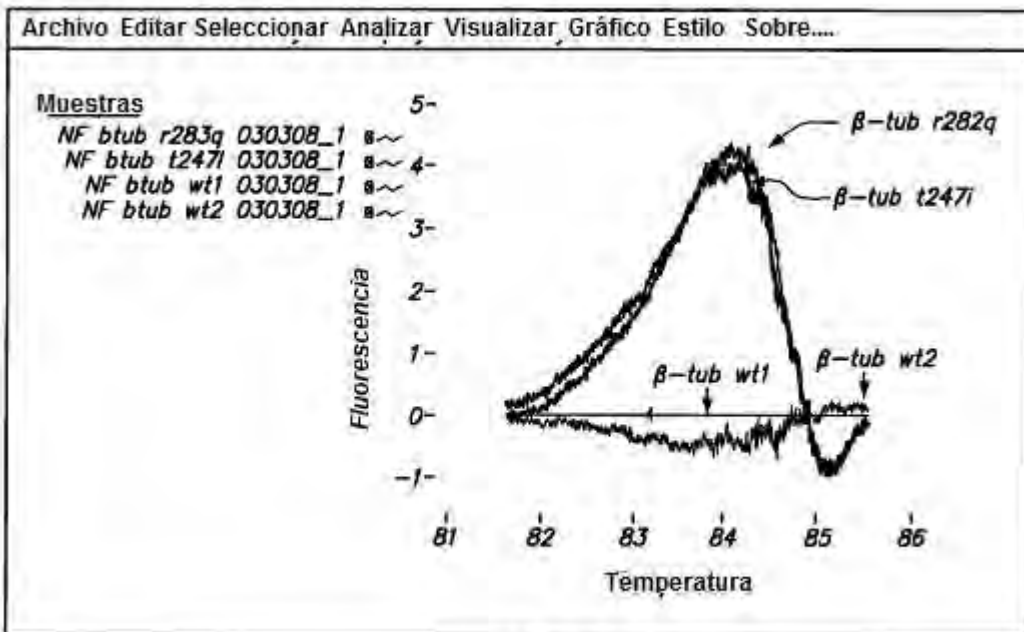


FIG. 12

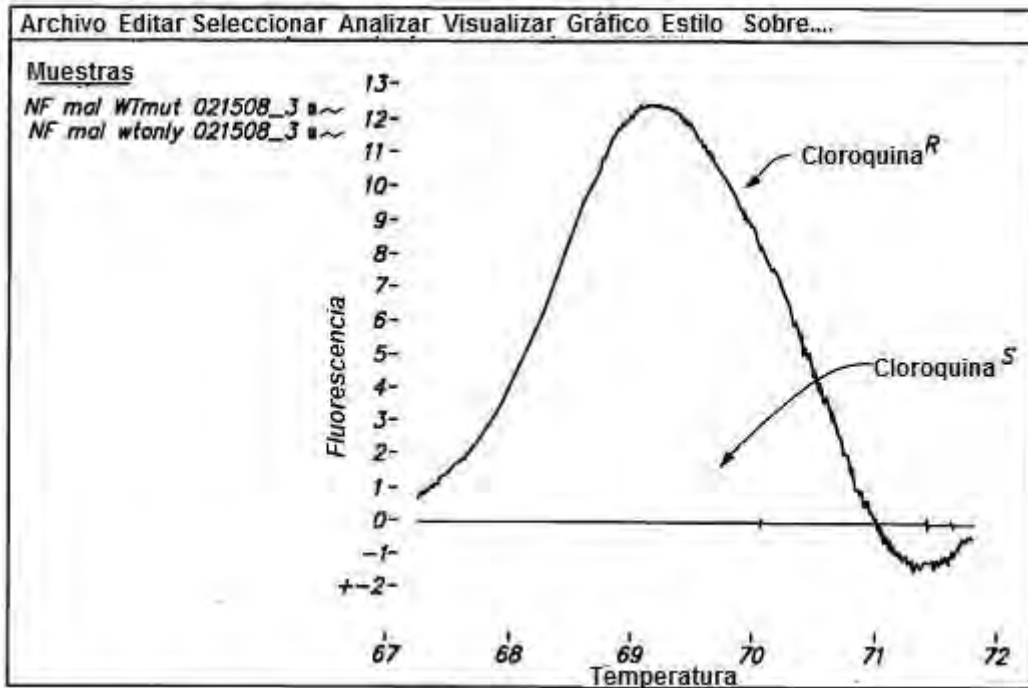


FIG. 13

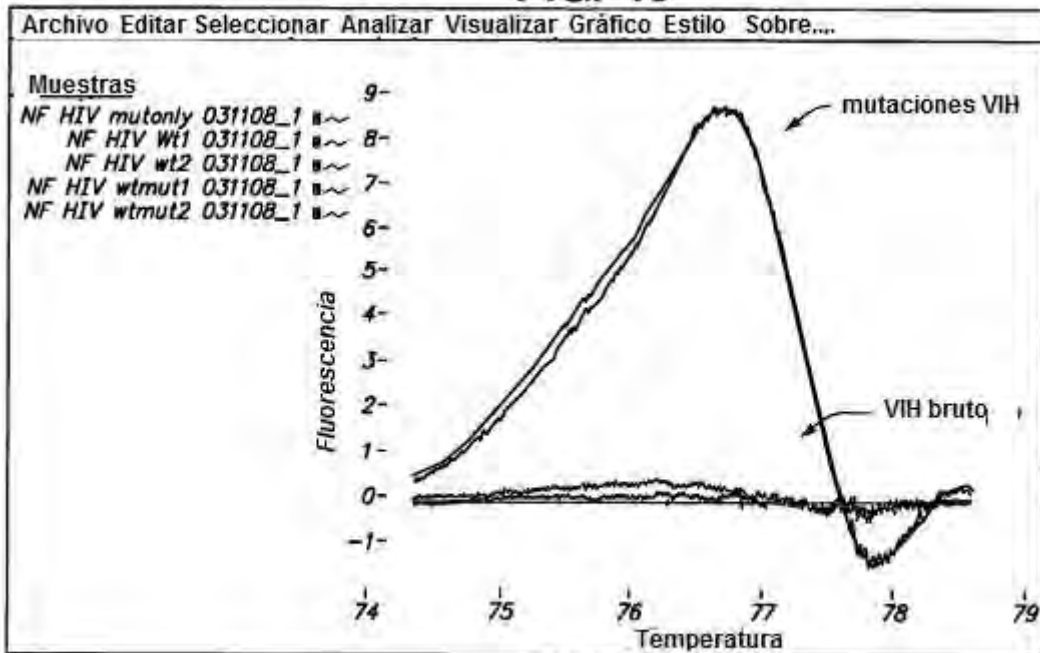


FIG. 14

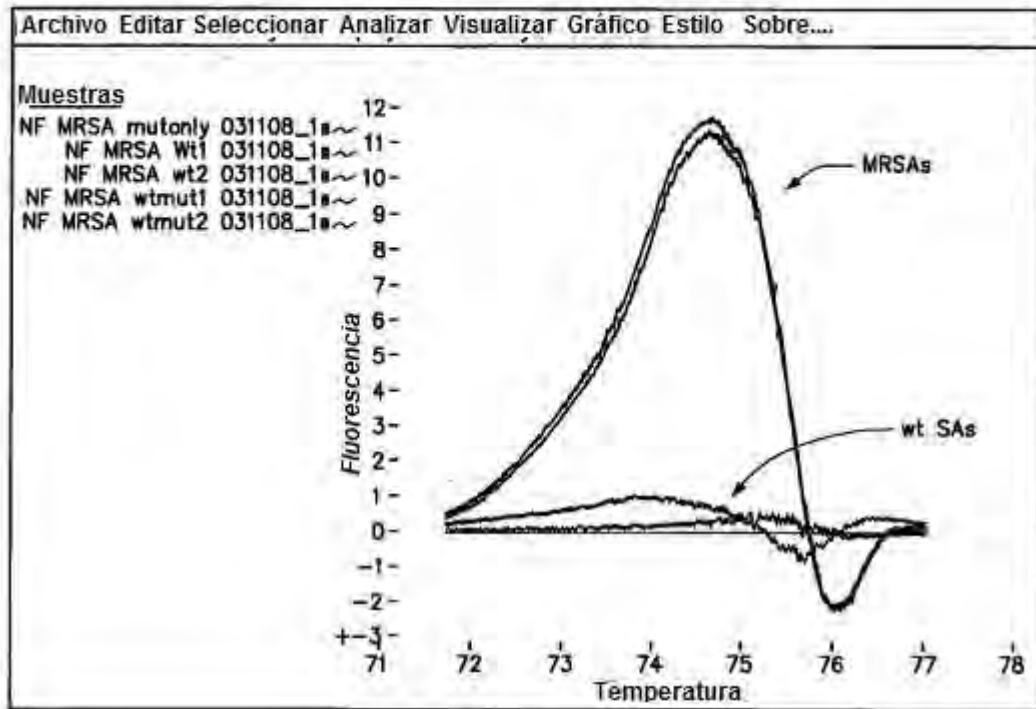


FIG. 15

HTPCR Run

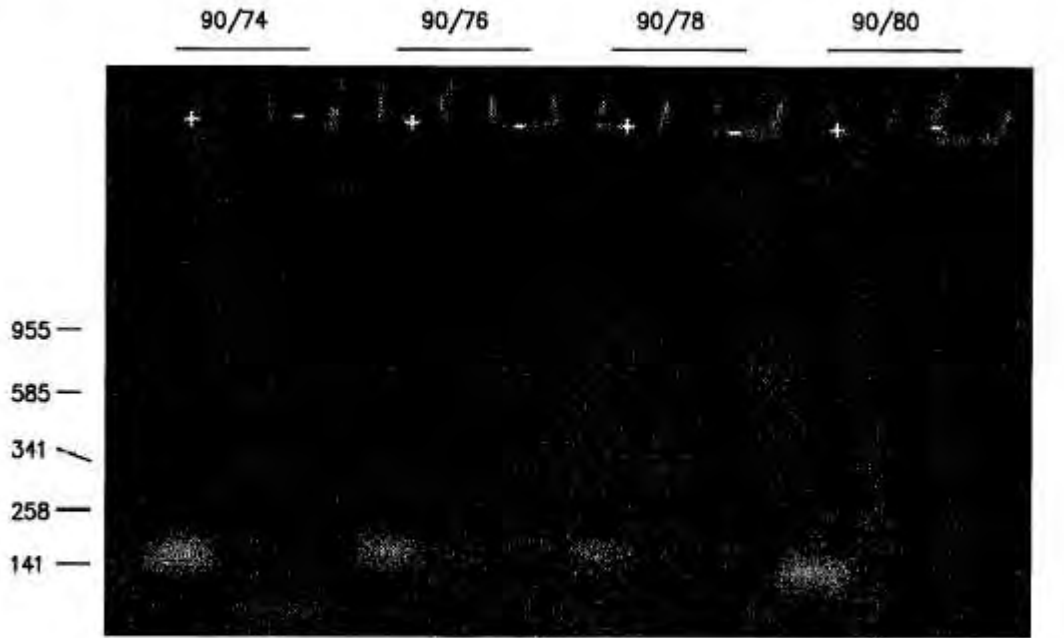


FIG. 16

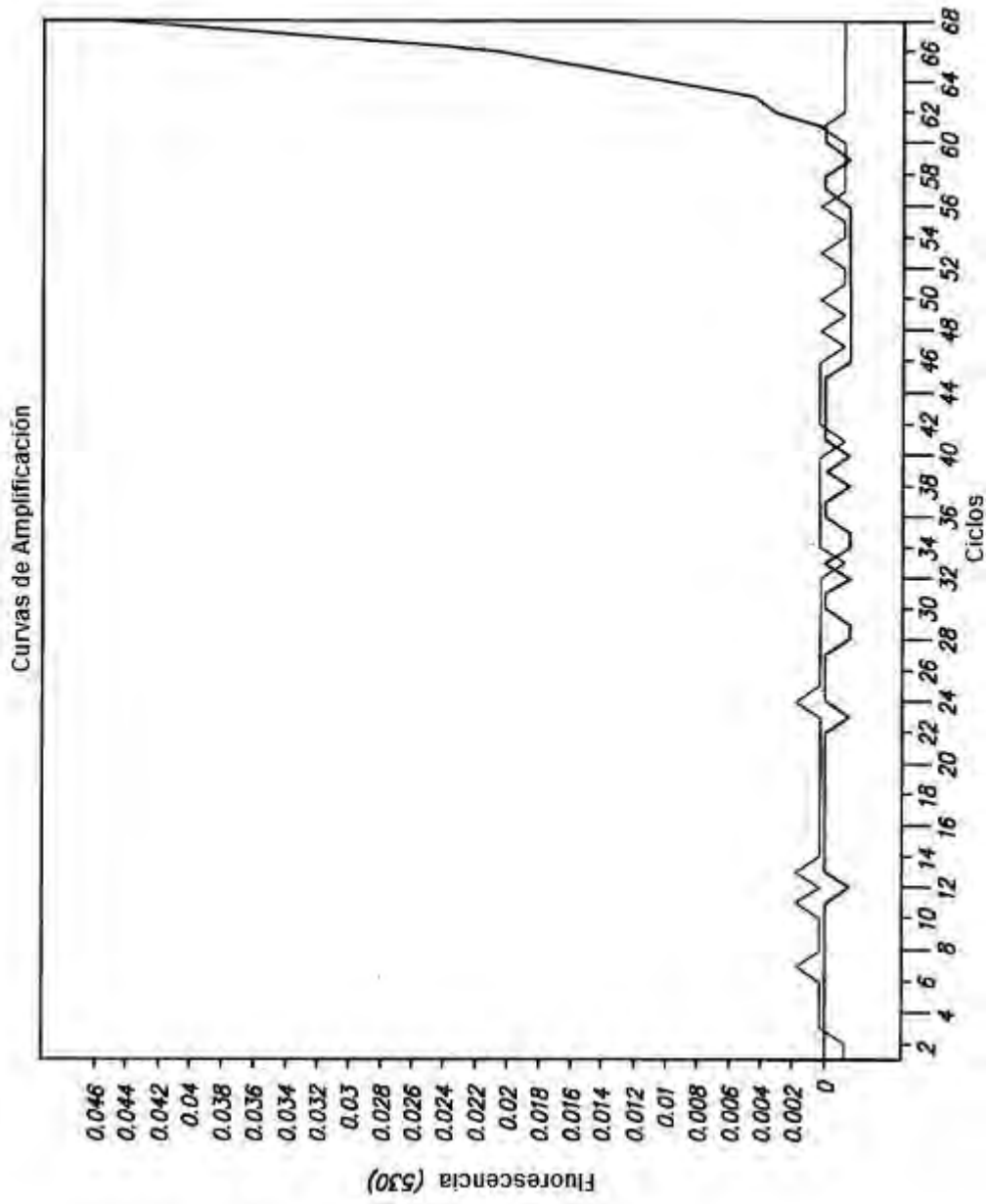


FIG. 17