

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 597 841**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.02.2005 PCT/EP2005/050464**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.08.2005 WO05075673**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2005 E 05716622 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 1713937**

54 Título: **Detección, identificación y diferenciación de especies de Proteus utilizando la región espaciadora**

30 Prioridad:

**06.02.2004 EP 04447030  
10.02.2004 US 542875 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.01.2017**

73 Titular/es:

**FUJIREBIO EUROPE N.V. (50.0%)  
Technologiepark 6  
9052 Gent, BE y  
ROCHE DIAGNOSTICS GMBH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**JANNES, GEERT;  
MIJS, WOUTER;  
HABERHAUSEN, GERD y  
EMRICH, THOMAS**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 597 841 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Detección, identificación y diferenciación de especies de *Proteus* utilizando la región espaciadora

### CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a nuevas secuencias de ácidos nucleicos derivados de la región ITS (espaciador transcrito interno), entre los ácidos ribonucleicos ribosómicos (ARNr) de 16S y 23S o entre los genes de ARNr, que se utilizarán para la detección y/o identificación específica de especies de *Proteus*.

La presente invención se refiere también a un procedimiento para la detección y/o identificación específica de especies de *Proteus*, utilizando nuevas secuencias de ácido nucleico derivadas de la región ITS.

10 Dicha secuencia o procedimiento puede utilizarse para detectar y/o identificar *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* y/o *Proteus penneri*.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El género *Proteus* consiste en 8 especies: *P. mirabilis*, *P. penneri*, *P. vulgaris*, *P. myxofaciens* y *P. hauseri* y 3 genomaspecies aún no nombradas.

15 Los miembros del género *Proteus* se encuentran comúnmente en el medio ambiente, aunque que a menudo también forman parte del tracto gastrointestinal. Clínicamente, *P. mirabilis* es la más relevante como el organismo más frecuentemente aislado, aunque las demás especies se pueden encontrar también en el ámbito clínico.

20 *P. mirabilis* representa el 3 % de los aislamientos de infecciones nosocomiales, mientras que ocupa el segundo lugar, después de *Escherichia coli* entre los aislamientos de infecciones del tracto urinario comunes y el tercero como agente causante de cistitis, pielonefritis y prostatitis sin complicaciones. *P. mirabilis* también se reseña como agente etiológico de aquellas infecciones mortales tales como bacteriemia, meningoencefalitis neonatal, meningitis, empiema y osteomielitis. Además, otras infecciones tales como infecciones gastrointestinales y por heridas podrían ser causadas por *P. mirabilis* y especies relacionadas tales como *P. penneri*.

*P. penneri*, así como *P. mirabilis*, se mostró que están implicadas en la formación de cálculos renales, mientras que *P. mirabilis* se ha reseñado como un agente etiopatogénico en la artritis reumatoide.

25 Actualmente, se identifican y diferencian las especies de *Proteus* mediante procedimientos basados en el cultivo y las pruebas bioquímicas fenotípicas.

30 Una característica típica de *Proteus* es la propiedad de movimiento en enjambre de la bacteria en agar de sangre de oveja. En combinación con una prueba de oxidasa e indol las diferentes especies de *Proteus* se pueden diferenciar con exactitud, aunque no todos los casos pueden resolverse de una manera clara por los sistemas tradicionales. Los sistemas actuales disponibles en el mercado no dan una respuesta uniforme y única en la identificación y diferenciación entre especies de *Proteus*.

35 Además de su resistencia inherente a nitrofurantoína y tetraciclina, la mayoría de esas *Proteus* spp. son, como cepas de tipo silvestre, sensibles a amino/ureidopenicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos y carbapenemos. Sin embargo, informes recientes muestran la aparición de resistencias contra varios agentes antimicrobianos, entre otros contra los mencionados, en particular en algunos hospitales. Un ensayo de identificación rápida y específica para esos organismos podría constituir la base para una gestión antimicrobiana más apropiada de las infecciones causadas por estos organismos bacterianos oportunistas típicos.

40 Teniendo en cuenta el creciente número de infecciones nosocomiales, así como el aumento de la resistencia al panel existente de agentes antimicrobianos y puesto que las pruebas basadas en el cultivo consumen todavía mucho tiempo y requieren un alto volumen de trabajo de personal cualificado, se necesitan nuevos procedimientos de identificación rápida y más específica. En particular en el caso de infecciones graves, como la sepsis nosocomial, un ensayo rápido, específico y sensible es obligatorio, ya que es una cuestión de vida o muerte.

45 La solicitud de patente internacional WO 03/095677 describe unas pocas sondas de los genes de ARNr de 23S e ITS mal caracterizados de *P. vulgaris* para identificar esta especie específica, describiendo por accidente la sonda ATACGTGTTATGTGC de la región ITS.

Se ha dado a conocer un procedimiento para identificar bacterias en una muestra con la especie *P. mirabilis* del grupo *Proteus* solo presente mediante la amplificación de una porción del ADNr de 23S presente en la muestra en la solicitud de patente internacional WO 00/52203.

50 Sin embargo existe la necesidad de un procedimiento para identificar no solo si una especie de *Proteus* está presente en una muestra, sino también el tipo de especie de *Proteus* que está presente.

### SUMARIO DE LA INVENCION

Es un objeto de la presente invención proporcionar nuevas secuencias de ácido nucleico derivadas de los ITS de especies de *Proteus*, que se pueden utilizar para la detección y/o identificación de especies de *Proteus*. Se proporcionan secuencias derivadas de los ITS de especies de *Proteus*, en particular de *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* y/o *Proteus penneri*.

- 5 La presente invención proporciona la materia objeto como se expone en todos y cada uno de los (i) a (viii) siguientes:
- (i) Un conjunto de al menos dos sondas de polinucleótidos para la detección y/o identificación de especies de *Proteus*, comprendiendo cada sonda 5 a 50 nucleótidos e hibridando dichas sondas específicamente en posiciones adyacentes separadas por no más de 25 nucleótidos entre dichas dos sondas en cualquiera de los ácidos nucleicos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID NO 1 a 17, su forma de ARN en la que T se sustituye por U, la forma complementaria de la misma o polinucleótidos homólogos equivalentes que comparten al menos un 80 % de homología con los correspondientes polinucleótidos no modificados de las SEQ ID NO 1 a 17.
- 10 (ii) Un conjunto de al menos dos sondas de polinucleótidos como se expone en (i) anterior, en el que dichas sondas se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID NO 18 a 67.
- (iii) Un conjunto de tres sondas de polinucleótidos como se expone en (i) o (ii) anteriores, comprendiendo cada sonda 5 a 50 nucleótidos e hibridando dichas sondas específicamente en posiciones adyacentes separadas por no más de 25 nucleótidos entre las sondas adyacentes en cualquiera de los ácidos nucleicos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID NO 1 a 17, su forma de ARN en la que T se sustituye por U, la forma complementaria de la misma, o polinucleótidos homólogos equivalentes que comparten al menos un 80 % de homología con los correspondientes polinucleótidos no modificados de SEQ ID NO 1 a 17.
- 15 (iv) Una composición que comprende al menos un conjunto de al menos dos sondas de polinucleótidos como se expone en uno cualquiera de (i) a (iii) anteriores.
- (v) Un procedimiento para detectar o identificar especies de *Proteus* utilizando al menos un conjunto de al menos dos sondas de polinucleótidos como se expone en una cualquiera de (i) a (iii) anteriores, en el que dichas sondas se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID NO 18 a 67.
- 20 (vi) Un procedimiento como se expone en (v) anterior para la detección y/o identificación de especies de *Proteus* en una muestra que comprende las etapas de:
- (i) liberar, aislar y/o concentrar los ácidos polinucleicos en la muestra;
- (ii) amplificar la(s) región(es) espaciadora(s) de ARNr de 16S-23S, o al menos una de la(s) secuencia(s) diana que comprende(n) cualquier/cualesquiera molécula(s) de ácido nucleico como se expone(n) en (i) anterior, con al menos un par de cebadores adecuados;
- 30 (iii) poner en contacto los ácidos polinucleicos con al menos un conjunto de al menos dos sondas de polinucleótidos que hibridan específicamente en posiciones adyacentes separadas por no más de 25 nucleótidos entre sondas adyacentes, seleccionadas dichas sondas del grupo que consiste en las SEQ ID NO 18 a 67;
- (iv) detectar los híbridos formados y
- (v) interpretar la(s) señal(es) obtenida(s) y deducir la presencia de especies de *Proteus* y/o identificar las especies de *Proteus* en la muestra.
- 35 (vii) Un procedimiento como se expone en (v) o (vi) anterior, en el que las dos sondas de polinucleótidos consisten en cualquier combinación de los polinucleótidos de la Tabla 2.
- (viii) Un kit para la detección y/o identificación de especies de *Proteus* que comprende los siguientes componentes:
- 40 -un conjunto de al menos dos sondas de polinucleótidos como se expone en uno cualquiera de (i) a (iii) anteriores, -un tampón de hibridación, o componentes necesarios para producir dicho tampón;
- La presente memoria descriptiva describe una molécula de ácido nucleico aislada seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO 1 a 67, sus formas complementarias, la forma de ARN de las mismas en la que T se sustituye por U y homólogos.
- 45 De acuerdo con la presente memoria descriptiva, dichas moléculas de ácido nucleico pueden ser utilizadas para la detección y/o identificación de especies de *Proteus*.
- La presente memoria descriptiva describe nuevos polinucleótidos para uso como sondas y/o cebadores, para la detección y/o identificación de especies de *Proteus*, en particular de *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, y/o *Proteus penneri*.
- 50 La presente memoria descriptiva describe por tanto una molécula de ácido nucleico aislada que hibrida

específicamente con una secuencia diana que comprende o que consiste en una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO 18 a 67, sus formas complementarias, la forma de ARN de las mismas en la que T se sustituye por U, secuencias homólogas de las mismas y fragmentos de las mismas, para la detección y/o identificación de especies de *Proteus*.

- 5 La presente memoria descriptiva describe además conjuntos de sondas para la detección y/o identificación de especies de *Proteus*, en particular de *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, y/o *Proteus penneri* en una muestra.

La presente memoria descriptiva también describe cebadores que permiten la amplificación específica de la región espaciadora de ARNr de 16S-23S de especies de *Proteus*, en particular de *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, y/o *Proteus penneri*.

- 10 La presente memoria descriptiva describe además una composición que contiene cualquiera de las nuevas secuencias descritas en esta memoria, o cualquiera de los nuevos conjuntos de sondas y/o cebadores descritos en el presente documento, o una combinación de los mismos.

- 15 La presente memoria descriptiva describe además un kit en el que se utilizan dichas sondas y/o cebadores, para la detección y/o identificación de especies de *Proteus*, en particular de *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* y/o *Proteus penneri*.

La presente memoria descriptiva también describe un procedimiento de hibridación rápido y fiable para la detección y/o identificación de especies de *Proteus*, en particular de *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* y/o *Proteus penneri*.

- 20 La presente memoria descriptiva describe además un procedimiento de hibridación basado en PCR en tiempo real para la detección y/o identificación de especies de *Proteus*, en particular *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* y/o *Proteus penneri*.

#### LEYENDAS DE TABLA

Tabla 1: programa de amplificación y curva de fusión usado en los ejemplos.

Tabla 2: diferentes combinaciones de HybProbes ensayadas

- 25 Tabla 3: lista de microorganismos ensayados para determinar la especificidad de la combinación de HybProbes representadas por las SEQ ID NO 24 y 39.

Tabla 4: lista de las SEQ ID NO 1 a 69.

Las SEQ ID de esta tabla se derivan de los siguientes organismos:

SEQ ID	Organismo	SEQ ID	Organismo
1	<i>P. mirabilis (glu)</i>	25	PROTEUS
2	<i>P. mirabilis (glu)</i>	26	PROTEUS
3	<i>P. mirabilis (glu)</i>	27	<i>P. mirabilis (glu)</i>
4	<i>P. mirabilis (flu)</i>	28	<i>P. mirabilis (glu)</i>
5	<i>P. mirabilis (ile-ala)</i>	29	<i>P. mirabilis (glu)</i>
6	<i>P. mirabilis (ile-ala)</i>	30	PROTEUS
7	<i>P. mirabilis (ile-ala)</i>	31	PROTEUS
8	<i>P. mirabilis (ile-ala)</i>	32	PROTEUS
9	<i>P. mirabilis (ile-ala)</i>	33	PROTEUS
10	<i>P. mirabilis (ile-ala)</i>	34	<i>P. mirabilis (ile-ala)</i>
11	<i>P. vulgaris</i>	35	<i>P. mirabilis (ile-ala)</i>
12	<i>P. vulgaris</i>	36	PROTEUS
13	<i>P. vulgaris</i>	37	<i>P. mirabilis (glu)</i>
14	<i>P. penneri</i>	38	<i>P. mirabilis (glu)</i>
15	<i>P. penneri</i>	39	<i>P. mirabilis (glu)</i>

SEQ ID	Organismo	SEQ ID	Organismo
16	<i>P. penneri</i>	40	PROTEUS
17	<i>P. penneri</i>	41	PROTEUS
18	<i>P. vulgaris (glu)</i>	42	PROTEUS
19	<i>P. vulgaris (glu + ilelala)</i>	43	PROTEUS
20	<i>P. vulgaris (glu + ilelala)</i>	44	PROTEUS
21	<i>P. mirabilis (glu)</i>	45	PROTEUS
22	<i>P. mirabilis (glu)</i>	46	PROTEUS
23	<i>P. mirabilis (glu)</i>	47	PROTEUS
24	<i>P. mirabilis (glu)</i>	48	<i>P. mirabilis</i>
49	PROTEUS	60	<i>P. vulgaris</i>
50	<i>P. vulgaris + P. penneri (glu)</i>	61	PROTEUS
51	<i>P. mirabilis</i>	62	PROTEUS
52	<i>P. vulgaris + P. penneri (glu)</i>	63	PROTEUS
53	PROTEUS	64	PROTEUS
54	<i>P. mirabilis (ilelala)</i>	65	<i>P. mirabilis</i>
55	<i>P. mirabilis (ilelala)</i>	66	<i>P. mirabilis</i>
56	<i>P. vulgaris (ilelala)</i>	67	<i>P. mirabilis</i>
57	<i>P. vulgaris (ilelala)</i>	68	CEBADORES
58	PROTEUS	69	CEBADORES
59	PROTEUS		

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Las siguientes definiciones sirven para ilustrar los términos y expresiones usados en las diferentes formas de realización de la presente invención como se expone más adelante.

5 Los términos "espaciador" e "ITS" (espaciador transcrito interno) son términos abreviados que hacen referencia ambos a la región entre el ARNr de 16S y de 23S o entre los genes de ARNr 16S y 23S.

El término "sonda" hace referencia a un oligonucleótido monocatenario o un polinucleótido que tiene una secuencia que es suficientemente complementaria para hibridar con una secuencia diana.

10 Una secuencia diana es una secuencia a detectarse que comprende cualquier molécula de ácido nucleico representada por cualquiera de las SEQ ID NO 1 a 17, su forma complementaria, la forma de ARN de las mismas, homólogos o fragmentos de las mismas.

Una secuencia diana puede ser bien ADN genómico o bien ARN precursor, o versiones amplificadas de los mismos.

Preferiblemente, las sondas descritas en el presente documento son aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, o más de aproximadamente un 95 % homólogas al complemento exacto de la secuencia diana.

15 Las sondas descritas en el presente documento se pueden preparar clonando (y cultivando) plásmidos recombinantes que contienen insertos que incluyen las secuencias de nucleótidos correspondientes, si es necesario escindiendo los últimos de los plásmidos clonados usando las nucleasas adecuadas y recuperándolas, por ejemplo, mediante fraccionamiento de acuerdo con el peso molecular.

20 Las sondas descritas en el presente documento también se pueden sintetizar químicamente, por ejemplo mediante el procedimiento de fosfotriéster convencional.

El término ácidos nucleicos "complementarios" como se utiliza en el presente documento significa que las

secuencias de ácidos nucleicos pueden formar una doble cadena de bases apareadas perfectamente entre sí.

Los términos "ácido polinucleico", "ácido nucleico" y "polinucleótido" corresponden a bien ADNc bicatenario o monocatenario o bien ADN o ARN genómico que contiene al menos 5, 10, 15, 20, 30, 40 o 50 nucleótidos contiguos. Se hace también referencia a un ácido polinucleico, que es menor de 100 nucleótidos de longitud como un "oligonucleótido".

Los polinucleótidos descritos en el presente documento pueden contener también nucleótidos modificados tales como inosina o nucleótidos que contienen grupos modificados que no alteran esencialmente sus características de hibridación.

Las moléculas de ácido polinucleico descritas en el presente documento se representan siempre desde el extremo 5' al extremo 3'. Pueden utilizarse en cualquier forma, es decir en su forma bicatenaria o monocatenaria (cualquiera de las dos hebras), en su forma de ADN o ARN (en la que T se sustituye por U), modificada o no.

El término "vecino más cercano" significa el taxón que se sabe que es o que se espera que sea el más estrechamente relacionado en términos de homología del ADN y que tiene que diferenciarse del organismo de interés.

La expresión "hibridación específica del taxón" o "sonda específica del taxón" significa que la sonda solo hibrida con el ADN o ARN del taxón para el que fue diseñado y no con ADN o ARN de otros taxones.

El término taxón puede hacer referencia a un género completo o a un subgrupo dentro de un género, una especie o incluso un subtipo dentro de una especie (subespecies, serovares, secuevares, biovares...).

El término "amplificación específica" o "cebadores específicos" hace referencia al hecho de que dichos cebadores solamente amplifican la región relevante de los organismos para los que fueron diseñados y no de otros organismos.

El término "amplificación específica de espaciador" o "cebadores específicos de espaciador" hace referencia al hecho de que dichos cebadores amplifican solo la región espaciadora de los organismos para los que fueron diseñados y no de otros organismos.

El término "sonda específica" hace referencia a sondas que solo hibridan con la región correspondiente de los organismos para los que fueron diseñados y no con la región correspondiente de otros organismos, ni con ninguna otra región.

El término "sonda específica de espaciador" hace referencia a sondas que solo hibridan con el espaciador relevante de los organismos para los que fueron diseñados y no con separadores de otros organismos.

El término "sensibilidad" hace referencia al número de falsos negativos: es decir, si 1 de las 100 cepas a detectar se deja pasar, la prueba muestra una sensibilidad de  $(100-1/100) \% = 99 \%$ .

El término "especificidad" hace referencia al número de falsos positivos: es decir, si de 100 cepas detectadas, 2 parecen pertenecer a organismos para los que la prueba no está diseñada, la especificidad de la prueba es de  $(100-2/100) \% = 98 \%$ .

Los oligonucleótidos o polinucleótidos seleccionados como "preferentes" muestran una sensibilidad y una especificidad de más del 80 %, preferiblemente más del 90 % y lo más preferiblemente más del 95 %.

El término "soporte sólido" puede hacer referencia a cualquier sustrato al que se pueda acoplar una sonda de polinucleótidos, a condición de que retenga sus características de hibridación y a condición de que el nivel de fondo de hibridación se mantenga bajo. Habitualmente, el sustrato sólido será una placa de microvaloración, una membrana (por ejemplo nailon o nitrocelulosa) o una microesfera (perla), sin limitarse a estos ejemplos. Antes de la aplicación a la membrana o fijación, puede ser conveniente modificar la sonda de ácido nucleico a fin de facilitar la fijación o mejorar la eficiencia de la hibridación. Dichas modificaciones pueden englobar prolongación con homopolímeros, acoplamiento con diferentes grupos reactivos tales como grupos alifáticos, grupos  $\text{NH}_2$ , grupos SH, grupos carboxílicos, o acoplamiento con biotina, haptenos o proteínas.

El término "marcado" hace referencia al uso de ácidos nucleicos marcados. El marcaje se puede llevar a cabo mediante el uso de nucleótidos marcados incorporados durante la etapa de polimerización de la amplificación tal como se ilustra por Saiki *et al.* (1988) Science 239: 487-491; Gilbertson, et al. ((1990) Mol Cell Probes 4:353-365) o mediante el uso de cebadores marcados, o mediante otro procedimiento conocidos por la persona experta en la técnica. La naturaleza del marcador puede ser isotópica ( $^{33}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ , etc.) o no isotópica (biotina, digoxigenina, tinte fluorescente, enzima, etc.).

El término "señal" hace referencia a una serie de ondas electromagnéticas (por ejemplo fluorescencia), o cambios en la corriente eléctrica que transportan información. La señal puede ser directamente visible, o puede hacerse visible y/o interpretable por diferentes medios o dispositivos.

Una muestra puede comprender cualquier material biológico. Este material biológico puede ser tomado bien directamente del ser humano o animal infectado, o bien después de cultivo o enriquecimiento, o bien de los alimentos, del medio ambiente, etc.

5 El material biológico pueden ser por ejemplo esputos de cualquier clase, lavados bronquiales, sangre, tejido cutáneo, biopsias, material de cultivo de linfocitos en sangre, colonias, etc. Dichas muestras pueden prepararse o extraerse de acuerdo con cualquiera de las técnicas conocidas en la materia.

De acuerdo con la presente memoria descriptiva, las especies de *Proteus* que son clínicamente relevantes pueden ser *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* y *Proteus penneri*.

10 Diferentes especies de *Proteus* muestran dos tipos diferentes de espaciador en función del tipo de gen de ARNt insertado en la región espaciadora, ARNt<sup>glu</sup> o ARNt<sup>ile-ala</sup>. Además, para cada tipo de espaciador y para cada especie de *Proteus*, pueden distinguirse diferentes agrupaciones o grupos.

Por ejemplo, de las nueve cepas de *P. mirabilis*, teniendo en cuenta el primer tipo de separador, es decir, con la inserción de ARNt<sup>glu</sup>, podrían definirse cuatro grupos diferentes, representados respectivamente por las SEQ ID NO 1 a 4.

15 Teniendo en cuenta el segundo tipo, es decir, con la inserción de ARNt<sup>ile-ala</sup>, podrían definirse seis grupos diferentes, representados respectivamente por las SEQ ID NO 5 a 10.

Para detectar y/o identificar todas las especies de *Proteus* o cada especie de *Proteus* o cualquier combinación de al menos dos especies de *Proteus*, la presente invención proporciona un conjunto de al menos dos nuevas moléculas de ácido nucleico.

20 Una secuencia de ITS descrita en el presente documento comprende o consiste en una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO 1 a 17, sus formas complementarias, la forma de ARN de las mismas en la que T se sustituye por U y cualquier secuencia homóloga de las mismas.

25 También se describen secuencias homólogas que se encuentran en el ITS de cualquier especie de *Proteus*, a las que también se hace referencia en lo sucesivo como "homólogos". El grado de homología es mayor del 80 % u 85 %, preferiblemente mayor del 90 % y más preferiblemente mayor del 95 %.

"Homólogos" pueden ser secuencias homólogas de cualquiera de las SEQ ID NO 1 a 17 o de cualquier fragmento de las mismas de al menos 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 nucleótidos localizado en la región ITS de cualquier especie de *Proteus*.

30 Las SEQ ID NO 1 a 10 derivan de *P. mirabilis*, las SEQ ID NO 11 a 13 derivan de *P. vulgaris* y las SEQ ID NO 14-17 de *P. penneri*.

La presente memoria descriptiva también describe nuevas moléculas de ácido nucleico derivadas de los ITS para la detección de cualquier especie de *Proteus*, resolviendo los problemas generados por una variabilidad muy alta debido al hecho de que hay diferentes tipos de ITS habiendo considerado el ARNt insertado, comprendiendo cada tipo diferentes grupos.

35 De hecho, se ha descubierto que las nuevas moléculas de ácido nucleico que consisten en las SEQ ID NO 44, 53, 58, 59 y 61 se encuentran en los dos tipos de separadores de todas las especies de *Proteus* ensayadas, en particular en las especies de *Proteus* que son clínicamente relevantes.

40 Los polinucleótidos específicos mencionados, cualquier fragmento de los mismos de al menos 10, 15, 20, 25, 30 y preferiblemente de aproximadamente 20 nucleótidos (18, 19, 20, 21 o 22), la forma de ARN de los mismos y la forma complementaria de los mismos, a los que también se hace referencia como polinucleótidos específicos de género, son regiones específicas del ITS que se pueden utilizar para el diseño de cebadores y/o sondas para la detección de una cualquiera o de todas las especies de *Proteus*, en particular, de las tres especies de *Proteus* que son clínicamente relevantes.

45 También se proporcionan nuevos polinucleótidos para uso como sondas y/o cebadores para la detección y/o identificación de una, dos o más especies de *Proteus*.

En otras palabras, la presente memoria descriptiva describe nuevos polinucleótidos para uso como sondas y/o cebadores, que hibridan con las secuencias diana descritas en el presente documento para la detección y/o identificación de una, dos o más especies de *Proteus*.

50 En particular, la presente memoria descriptiva describe una molécula de ácido nucleico aislada que hibrida específicamente con una secuencia diana que comprende o que consiste en un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO 1 a 17, su forma de ARN en la que T se sustituye por U, la forma complementaria de la misma, cualquier homólogo de la misma y fragmentos de al menos 10, 15, 20, 25, 30, 50, 100, 150, 200 o 300 nucleótidos contiguos de la misma.

Las sondas de polinucleótidos preferidas son de entre aproximadamente 5 a aproximadamente 50 bases de longitud, más preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 nucleótidos y son suficientemente homólogas a la secuencia diana.

5 Los polinucleótidos de SEQ ID NO 18 a 67 o cualquiera de sus homólogos, la forma complementaria de los mismos o la forma de ARN de los mismos se pueden utilizar como sondas.

Los cebadores preferidos descritos en el presente documento son polinucleótidos de ADN monocatenarios capaces de actuar como un punto de iniciación para la síntesis de la secuencia diana. La longitud y la secuencia del cebador descrito en el presente documento deben ser tales que permitan cebar la síntesis de los productos de extensión.

10 Preferiblemente un cebador descrito en el presente documento es de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud, preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 35, más preferiblemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 25. Su longitud y secuencia específicas han de elegirse en función de las condiciones utilizadas, tales como temperatura y fuerza iónica.

15 Los cebadores descritos en el presente documento amplifican las secuencias diana. En otras palabras, los cebadores descritos en el presente documento amplifican una molécula de ácido nucleico que comprende cualquiera de las SEQ ID NO 1 a 17, su hebra complementaria y/o sus homólogos.

Pueden usarse cebadores universales localizados en las regiones flanqueantes conservadas del espaciador de ARNr, es decir, en el gen de 16S y el gen de 23S. Si están presentes especies de *Proteus* en la muestra, el producto de amplificación, la(s) secuencia(s) diana, comprenderán entonces una molécula de ácido nucleico que consiste en cualquiera de las SEQ ID NO 1 a 17 y/u homólogos.

20 Preferiblemente, la(s) secuencia (s) diana consiste(n) en cualquier/cualesquiera molécula(s) de ácido nucleico seleccionada(s) del grupo que consiste en las SEQ ID NO 1 a 17 y/u homólogos, flanqueada(s) por no más de aproximadamente 40 a aproximadamente 50 nucleótidos respectivamente de ARNr de 16S y 23S.

Para algunas aplicaciones puede ser apropiado amplificar no las diferentes bacterias presentes en la muestra, sino más específicamente las especies de *Proteus*.

25 En este caso un par de cebadores se deriva de las secuencias de ITS descritas en el presente documento, por ejemplo de los polinucleótidos representados por las SEQ ID NO 44 y 53.

El hecho de que los cebadores de amplificación no tengan que coincidir exactamente con la secuencia de molde correspondiente para garantizar la amplificación apropiada está ampliamente documentado en la bibliografía (Kwok *et al.* (1990) Nucl. Acids Res. 18: 999).

30 El procedimiento de amplificación utilizado puede ser bien la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Saiki *et al.*, ((1988), Science 239: 487-491), bien la reacción en cadena de la ligasa (LCR; Landgren *et al.*, ((1988), Science 241: 1077-1080), Wu y Wallace, ((1989) Genomics 4: 560-569); Barany, ((1991), Proc Natl Acad Sci. USA 88: 189-193); bien la amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA; Guatelli *et al.*, ((1990), Proc Natl Acad Sci. USA 87: 1874-1878), Compton, ((1991), Nature 350: 91-92); bien el sistema de amplificación basado en la transcripción (TAS; Kwok *et al.*, (1989) Proc Natl Acad Sci. USA 86: 1173-1177), bien la amplificación por desplazamiento de hebra (SDA; Duck, ((1990) Biotechniques 9: 142-147); Walker *et al.*, ((1992) Proc Natl Acad Sci. USA 89: 392-396) o bien la amplificación por medio de replicasa Q $\beta$  (Lizardi *et al.*, ((1988) Bio/Technology 6: 1197-1202), Lomeli *et al.*, ((1989) Clin Chem. 35: 1826-1831) o bien cualquier otro procedimiento adecuado para amplificar moléculas de ácido nucleico conocido en la materia.

40 Los polinucleótidos preferidos descritos en el presente documento para su uso como cebadores o como sondas, o para diseñar nuevos cebadores y sondas a utilizarse en los procedimientos descritos en el presente documento, están representados por las SEQ ID NO 18 a 67.

45 Los polinucleótidos descritos en el presente documento pueden diferir en la secuencia de cualquiera de los polinucleótidos representados por las SEQ ID NO 18 a 67, ya sea por adición o por eliminación de cualquiera de sus respectivos extremos de uno o varios nucleótidos, o por cambio de uno o más nucleótidos dentro de dichas secuencias, o una combinación de ambos, a condición de que los equivalentes así obtenidos hibriden todavía con la secuencia diana. Dichos polinucleótidos equivalentes comparten al menos el 80 % de homología, preferiblemente más del 85 %, más preferiblemente más del 90 % de homología con los polinucleótidos no modificados correspondientes.

50 Cuando se utiliza un equivalente de un polinucleótido, puede ser necesario modificar las condiciones de hibridación para obtener la misma especificidad que el polinucleótido no modificado correspondiente.

Como consecuencia de ello, también será necesario modificar por consiguiente la secuencia de otros polinucleótidos cuando los polinucleótidos se vayan a utilizar en un conjunto en las mismas condiciones de hibridación. Estas modificaciones pueden hacerse de acuerdo con principios tales como los descritos en Hames B y Higgins S (Eds):

"Nucleic acid hybridization. Practical approach." IRL Press, Oxford, Reino Unido, 1985.

Los cebadores y/o sondas de polinucleótidos descritos en el presente documento pueden comprender también análogos de nucleótidos tales como fosforotioatos (Matsukura et al., ((1987) Proc Natl Acad Sci. USA 84 (21): 7706-7710), alquilfosforotioatos (Miller et al, ((1979) Biochemistry 18 (23): 5134-5143) o ácidos peptidonucleicos (Nielsen et al, ((1991) Science 254 (5037): 1497-1500); Nielsen et al, ((1993) Nucl Acids Res. 21 (2): 197-200) o pueden contener agentes intercalantes (Asseline et al, (1984), Proc. Natl Acad Sci. USA 81(11): 3297-3301), etc.

Los cebadores o sondas modificadas requieren adaptaciones con respecto a las condiciones en las que se utilizan con el fin de obtener la especificidad y sensibilidad requeridas. Sin embargo los resultados de la hibridación deberían mantenerse fundamentalmente iguales que los obtenidos con los polinucleótidos no modificados.

10 La introducción de estas modificaciones puede ser ventajosa a fin de influir en algunas características tales como cinética de hibridación, reversibilidad de la formación de híbridos, estabilidad biológica de las moléculas de polinucleótidos, etc.

Las sondas y cebadores descritos en el presente documento se utilizan en procedimientos, para la detección y/o identificación de especies de *Proteus*, en particular de *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* y/o *Proteus penneri*.

15 La detección y/o identificación de las secuencias diana se puede efectuar mediante el uso de un procedimiento de electroforesis, un procedimiento de hibridación o un procedimiento de secuenciación.

De acuerdo con la memoria descriptiva, un procedimiento para la detección de una o más especies de *Proteus* en una muestra puede comprender las etapas siguientes:

20 - En primer lugar y si es necesario, los ácidos nucleicos presentes en la muestra se hacen disponibles para amplificación y/o hibridación.

- En segundo lugar y también si es necesario, los ácidos nucleicos, si están presentes, se amplifican con uno u otro sistema de amplificación de diana. Por lo general, se necesita la amplificación para mejorar la señal de hibridación subsiguiente. Sin embargo para algunas muestras, o para algunos sistemas de amplificación de señal altamente sensibles, la amplificación podría no ser necesaria.

25 -En tercer lugar, los ácidos nucleicos presentes en la muestra o el producto amplificado resultante se ponen en contacto con sondas y se permite proceder a la hibridación.

- Por último, los híbridos se detectan usando un sistema de detección conveniente y compatible. A partir de la(s) señal(es) o patrón(es) de hibridación observado(s), puede deducirse la presencia o ausencia de una, dos o más especies de *Proteus*.

30 Para la etapa de amplificación, pueden utilizarse los cebadores situados en las regiones flanqueantes conservadas (gen 16S y 23S) del espaciador de ARNr, también llamados cebadores universales. El par de cebadores representados por las SEQ ID NO 68 y 69 es un ejemplo de un par de cebadores universal.

Para algunas aplicaciones puede ser apropiado amplificar no todas las bacterias presentes en la muestra, sino uno o varios géneros, o una o varias especies de *Proteus*.

35 En este último caso, esto puede lograrse mediante el uso de cebadores específicos de género o cebadores específicos de especie derivados de la región ITS de especies de *Proteus*.

De acuerdo con la memoria descriptiva, "un procedimiento para la detección y/o identificación de especies de *Proteus* en una muestra" puede comprender las etapas de:

(i) opcionalmente, aislar y/o concentrar los ácidos polinucleicos presentes en la muestra;

40 (ii) amplificar opcionalmente la(s) región(es) espaciadoras de ARNr de 16S-23S, o al menos una de las secuencias diana o fragmento(s) de la misma, con al menos un par de cebadores adecuados;

(iii) poner en contacto los ácidos polinucleicos con al menos una sonda de polinucleótido que hibrida con al menos una de las secuencias diana seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO 1 a 17, homólogas de las mismas, su forma de ARN en la que T se sustituye por U, la forma complementaria de las mismas y fragmentos de las mismas;

45

(iv) detectar los híbridos formados y

(v) interpretar la(s) señal(s) obtenida(s) y deducir la presencia de especies de *Proteus* y/o la identificación de especies de *Proteus* en la muestra.

50 Un fragmento, como se menciona por ejemplo en las etapas de amplificación o hibridación de cualquier procedimiento descrito en el presente documento, puede comprender o consistir en aproximadamente 10, 15, 20, 25,

30, 50, 100, 200, 300 nucleótidos contiguos de una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento.

Preferiblemente, las sondas descritas en el presente documento hibridan en condiciones de alto rigor.

5 En condiciones de alto rigor, se forman solo los híbridos de ácido nucleico complementario. Por consiguiente, el rigor de las condiciones de ensayo determina la cantidad de complementariedad necesaria entre dos hebras de ácido nucleico que forman un híbrido. El rigor se elige para maximizar la diferencia en estabilidad entre el híbrido formado con el ácido nucleico diana y el ácido nucleico no diana.

10 En cualquier caso, las condiciones de hibridación apropiadas se eligen de tal manera que la señal de hibridación obtenida cuando un polinucleótido descrito en el presente documento hibrida específicamente con una secuencia diana es diferente de la señal obtenida cuando dicho polinucleótido hibrida con una secuencia diana de manera no específica.

En la práctica, las diferentes señales pueden visualizarse, por ejemplo, cuando su intensidad es dos, cinco, diez o más veces más fuerte con una hibridación específica con la diana, en comparación con la hibridación no específica con la secuencia diana. El sistema LiPA es un buen ejemplo en este sentido.

15 Las diferentes señales también pueden visualizarse cuando se trazan diferentes picos en un análisis de curva de fusión, por ejemplo cuando se utiliza un procedimiento de PCR en tiempo real.

En una realización, una técnica muy conveniente y ventajosa para la detección de secuencias diana que están posiblemente presentes en la muestra es el procedimiento de PCR en tiempo real.

Existen diferentes formatos para la detección de ADN amplificado que puede utilizarse, en particular sondas TaqMan™, sondas Molecular Beacons, "Scorpions" o sondas de hibridación FRET.

20 En cuanto a las sondas TaqMan™, se marca una sonda de hibridación monocatenaria con dos componentes. Cuando el primer componente, el denominado agente fluorescente, se excita con luz de una longitud de onda adecuada, se transfiere la energía absorbida al segundo componente, el denominado apagador, según el principio de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia. Durante la etapa de reasociación de la reacción de PCR, la sonda de hibridación se une al ADN diana y se degrada por la actividad exonucleasa 5'-3' de la polimerasa, por ejemplo polimerasa Taq, durante la fase de elongación. Como resultado el componente fluorescente excitado y el apagador se separan espacialmente entre sí y por tanto se puede medir una emisión de fluorescencia del primer componente (patente EP 543.942 y patente de EE.UU. 5.210.015).

30 Con respecto a las sondas de Molecular Beacons, las sondas también se marcan con un primer componente y con un apagador, estando preferiblemente situados los marcajes en extremos diferentes de una sonda al menos parcialmente autocomplementaria. Como resultado de la estructura secundaria de la sonda, ambos componentes están en cercanía espacial en solución. Después de la hibridación con los ácidos nucleicos diana, ambos componentes se separan entre sí de tal manera que después de excitación con luz de una longitud de onda adecuada pueda medirse la emisión de fluorescencia del primer componente (patente de EE.UU. 5.118.801).

35 En cuanto a "Scorpions", una sonda y un cebador están contenidos en una molécula. Al igual que en el sistema de Molecular Beacons, cada sonda está marcada con un primer componente y con un apagador, estando situados los marcajes en diferentes extremos de una sonda al menos parcialmente autocomplementaria. Un cebador está ligado a cada sonda por el intermedio de un bloqueador de PCR, que impide que la estructura secundaria se abra en ausencia de la secuencia diana específica. (Whitcombe, D. *et al.* (1999) *Nature Biotechnology* 17, 804-807; Thelwell, N. *et al.* (2000) *Nucleic Acids Research* vol. 28, n.º 19, 3752-3761; Svanvik *et al* *Analytical Biochemistry* 287, 179-182 (2000).

40 El formato de prueba de sonda de hibridación por Transferencia de Energía de Resonancia de Fluorescencia (FRET) es especialmente útil para todo tipo de ensayos de hibridación homogéneos (Matthews, J. A. y Kricka, L. J., *Anal Biochem* 169 (1988) 1-25). Se caracteriza por dos sondas de hibridación monocatenarias que se utilizan simultáneamente y son complementarias a sitios adyacentes de la misma hebra de un ácido nucleico diana (amplificado). Ambas sondas están marcadas con diferentes componentes fluorescentes. Cuando se excita con luz de una longitud de onda adecuada, un primer componente transfiere la energía absorbida al segundo componente de acuerdo con el principio de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, de modo que se puede medir una emisión de fluorescencia del segundo componente cuando ambas sondas de hibridación se unen en posiciones adyacentes a la molécula diana que se va a detectar.

50 Cuando se reasocian con la secuencia diana, las sondas de hibridación deben estar situadas muy cerca entre sí, en una disposición de cabeza a cola. Por lo general, el hueco entre el extremo 3' marcado de la primera sonda y el extremo 5' marcado de la segunda sonda es lo más pequeño posible y en particular consiste en aproximadamente 0 a 25 bases y preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 bases. Esto permite una cercanía estrecha del compuesto donante de FRET y el compuesto aceptor de FRET, que es típicamente de 10 a 100 Angstrom.

55

De forma alternativa a la monitorización del incremento en la fluorescencia del componente aceptor de FRET, también es posible monitorizar la disminución en la fluorescencia del componente donante de FRET como una medida cuantitativa del evento de hibridación.

5 Entre todos los formatos de detección conocidos en la técnica de la PCR en tiempo real, se ha probado que el formato de sonda de hibridación de FRET es altamente sensible, exacto y fiable (documentos WO 97/46707; WO 97/46712 y WO 97/46714). Sin embargo, el diseño de secuencias de sondas de hibridación FRET apropiadas en ocasiones puede estar limitado por las características especiales de la secuencia de ácido nucleico diana a detectarse.

10 Como alternativa al uso de dos sondas de hibridación de FRET, también es posible el uso de un cebador marcado fluorescentemente y solo una sonda polinucleotídica marcada (Bernard, P. S., et al., Anal. Biochem. 255 (1998); 101-7). A este respecto, se puede elegir arbitrariamente si el cebador está marcado con el compuesto donante de FRET o con el aceptor de FRET.

15 La fluorescencia se puede medir durante la etapa de elongación, generando curvas de amplificación a partir de las que, dependiendo de los cebadores y/o sondas utilizadas, de su  $T_m$  y de las condiciones de hibridación, es posible deducir la presencia de las especies de *Proteus* para detectar o deducir qué especies de *Proteus* está(n) presentes.

20 Las sondas de hibridación FRET (también llamadas HybProbes o sondas FRET) también se puede utilizar para el análisis de curva de fusión (documentos WO 97/46707; WO 97/46712 y WO97/46714). En dicho ensayo, el ácido nucleico diana se amplifica en primer lugar en una reacción de PCR típica con cebadores de amplificación adecuados. Las sondas de hibridación pueden estar ya presentes durante la reacción de amplificación o marcarse posteriormente. Después de la terminación de la reacción de PCR, la temperatura de la muestra se aumenta consecutivamente. La fluorescencia se detecta siempre que la sonda de hibridación se una al ADN diana. A la temperatura de fusión, la sonda de hibridación se libera de su diana y la señal fluorescente disminuye inmediatamente hasta el nivel de fondo. Esta disminución se monitoriza con una gráfica temporal de fluorescencia frente a temperatura apropiada de tal forma que pueda calcularse el negativo de una primera función derivada. El valor de temperatura correspondiente al máximo obtenido de dicha función se toma a continuación como la temperatura de fusión determinada de dicho par de sondas de hibridación FRET.

25 Las mutaciones puntuales o polimorfismos en el ácido nucleico diana dan como resultado una complementariedad de menos del 100 % entre el ácido nucleico diana y las sondas FRET, lo que da por tanto como resultado una disminución de la temperatura de fusión. Esto permite una detección común de un grupo de variantes de secuencia por medio de hibridación FRET HybProbe mientras que, posteriormente, pueden discriminarse diferentes miembros de dicho grupo por medio de la práctica de análisis de curva de fusión.

30 En lugar de sondas de hibridación FRET, se puede utilizar de forma alternativa Molecular Beacons para el análisis de curva de fusión.

35 Tras la disponibilidad de PCR en tiempo real y análisis homogéneo de curva de fusión de PCR en tiempo real, se ha hecho posible la discriminación de ciertos tipos de especies o cepas utilizando tintes de unión a ADN bicatenario tales como SybrGreen™ I. o, de forma alternativa, sondas de hibridación diseñadas específicamente que hibridan con diferentes secuencias diana pero similares.

40 En el primer caso, tiene que determinarse la temperatura de fusión del producto de PCR bicatenario generado. Sin embargo, este procedimiento solo tiene aplicaciones limitadas ya que pocas diferencias no pueden monitorizarse de manera eficiente, debido a que variaciones menores en la secuencia solamente dan como resultado diferencias de temperatura de fusión imperceptibles.

De forma alternativa, las sondas de hibridación se pueden utilizar de tal manera que se determine la temperatura de fusión del híbrido sonda/ácido nucleico diana.

45 Existen diferentes plataformas de PCR en tiempo real que pueden utilizarse, tales como los equipos ABI/Prism™ y en particular el aparato LightCycler™, todos basados en el mismo principio que consiste en medir la emisión de luz, monitorizar continuamente el pico de emisión durante el ciclo de fusión, determinar y visualizar las temperaturas (picos de fusión) a la que las sondas marcadas se desprenden de los productos de amplificación. Los datos de los picos de fusión son característicos de una secuencia [sonda: diana] particular debido a que los desapareamientos entre sonda y diana afectan a la cinética de la fusión, produciendo diferentes picos de fusión para cada especie de interés.

50 La plataforma LightCycler™ ofrece muchas ventajas y en particular, una ganancia de tiempo y el posible uso de varios sistemas de detección de sonda fluorescente específicos de secuencia diferentes tales como sondas de hibridación (HybProbes), sondas TaqMan™, Molecular Beacons, sondas Scorpion y bisondas (SYBR Green I).

55 En un procedimiento preferido descrito en el presente documento, se utiliza el sistema HybProbe, que consiste en dos sondas de polinucleótidos adyacentes derivadas de las secuencias diana descritas en el presente documento, en una orientación de cabeza a cola, separadas por unos pocos nucleótidos, generalmente de 0 a 25,

preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 5. Una de las sondas se marca en su extremo 3' por un tinte donante, la otra se marca con una molécula aceptora en su extremo 5' y se bloquea el fosfato en el extremo 3' (para evitar su actuación como cebador). El tinte donante es generalmente fluoresceína y la molécula aceptora en general, LC Red 610, 640, 670 o 705.

- 5 La detección de una secuencia diana descrita en el presente documento puede conseguirse también mediante una hebra de PCR marcada interna y una sonda de detección situada en la hebra opuesta. La señal depende de la aproximación espacial de los tintes y depende de la cantidad de diana.

10 Cuando ambas sondas hibridan con su secuencia diana la luz emitida del donante se transmite al fluoróforo aceptor por transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) y la fluorescencia emitida (610, 640, 670 o 705 nm) se puede detectar. La intensidad de la fluorescencia emitida aumenta en paralelo con el ADN diana, producto de la amplificación.

15 Las sondas LightCycler ofrecen la ventaja frente a las sondas TaqMan™ de que no requieren hidrólisis y por lo tanto, ninguna extensión adicional de los tiempos de PCR (reasociación-elongación  $\leq 12$  s). Por lo tanto, es posible tomar ventaja de la ciclación térmica de alta velocidad de la LightCycler y completar el programa de PCR en solo 45 minutos.

Y las recientes generaciones de plataformas de PCR en tiempo real son capaces de monitorizar varias sondas en una sola reacción, lo que permite la detección y/o identificación de diferentes especies de *Proteus* a nivel de especie y/o la distinción de los diferentes tipos de separadores de *Proteus*.

20 Además, se ha demostrado que los procedimientos diseñados para la tecnología TaqMan se pueden convertir fácilmente a la tecnología HybProbe con resultados equivalentes (Haematologica vol. 85 (12) pág. 1248-1254, diciembre de 2000).

25 Según la presente memoria descriptiva, en los conjuntos de al menos dos sondas de polinucleótidos, a las que posiblemente se hace referencia como HybProbes, ambas HybProbes pueden hibridar con la misma secuencia diana, adyacentes entre sí, con no más de 25 nucleótidos entre dichas 2 HybProbes, preferiblemente con no más de 15 nucleótidos, más preferiblemente con no más de 10 nucleótidos, en particular con no más de 5 nucleótidos.

Cuando hay dos HybProbes, una se marca con un fluoróforo aceptor y la otra con un donante de tal manera que, tras la hibridación de las dos HybProbes con la secuencia diana, los fluoróforos donador y aceptor están preferiblemente a 0 a 25 nucleótidos entre sí, más preferiblemente a 0 a 10 nucleótidos entre sí y lo más preferiblemente a 0 a 5 nucleótidos entre sí.

30 Cuando hay más de dos HybProbes, al menos una está marcada con un fluoróforo aceptor y las demás con un donante (o viceversa) de tal manera que, tras la hibridación de las HybProbes con la secuencia diana, los fluoróforos donador y aceptor están preferiblemente a 0 a 25 nucleótidos entre sí, más preferiblemente a 0 a 10 nucleótidos entre sí y lo más preferiblemente a 0 a 5 nucleótidos entre sí.

35 Para la detección y/o identificación de especies de *Proteus*, en particular las especies de *Proteus* que son clínicamente relevantes, puede utilizarse un conjunto de al menos dos sondas de polinucleótidos, hibridando dichas sondas con al menos una de las secuencias diana seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO 1 a 17, sus formas de ARN en las que T se sustituye por U, las formas complementarias de las mismas y los homólogos de las mismas, en el que hay preferiblemente no más de 25 nucleótidos, más preferiblemente no más de 10 nucleótidos y lo más preferiblemente no más de 5 nucleótidos entre dichas sondas.

40 Un conjunto de sondas de la invención también puede consistir en 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más, sondas, pero preferiblemente se compone de 2 a 5 sondas.

Los conjuntos de sondas enumerados en la Tabla 2 y sus homólogos son conjuntos preferidos de la invención.

45 Grupos de tres polinucleótidos, dos para uso como cebador y el otro para su uso como sonda, también se pueden utilizar. Luego uno de dichos cebadores y dicha sonda hibridan con al menos una de las secuencias diana seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO 1 a 17, sus formas de ARN en las que T se sustituye por U, las formas complementarias de las mismas y homólogos de las mismas, por lo que hay preferiblemente no más de 25 nucleótidos, más preferiblemente no más de 10 nucleótidos y lo más preferiblemente no más de 5 nucleótidos entre dicho cebador y dicha sonda.

50 Los conjuntos de al menos dos polinucleótidos de la invención se utilizan en procedimientos para la detección y/o identificación de especies de *Proteus*. En particular, *P. mirabilis*, *P. vulgaris* y/o *P. penneri* pueden detectarse y/o identificarse.

Un procedimiento descrito en el presente documento para la detección y/o identificación de especies de *Proteus* en una muestra, en particular de *P. mirabilis*, *P. vulgaris* y/o *P. penneri*, puede comprender las etapas de:

(i) opcionalmente, liberar, aislar y/o concentrar los ácidos polinucleicos presentes en la muestra;

- (ii) opcionalmente, amplificar la región espaciadora de ARNr de 16S-23S, o al menos una secuencia diana, o un fragmento de la misma, con al menos un par de cebadores adecuados;
- (iii) poner en contacto los ácidos polinucleicos con al menos un conjunto de al menos dos HybProbes que hibridan con al menos una secuencia diana seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO 1 a 17, sus formas de ARN en las que T se sustituye por U, las formas complementarias de las mismas, cualquier homólogo y un fragmento de al menos 10 y preferiblemente al menos 20 nucleótidos contiguos de las mismas;
- (iv) detectar los híbridos formados en la etapa (iii);
- (v) deducir la presencia de especies de *Proteus*, o identificar las especies de *Proteus* en la muestra a partir de las señales de hibridación diferenciales obtenidas en la etapa (iv).
- 10 Por ejemplo, un par de cebadores utilizado en la etapa de amplificación es cualquier combinación de un cebador directo derivado de cualquiera de los polinucleótidos representados por las SEQ ID NO 53 o 61 o sus homólogos y un cebador inverso derivado de cualquiera de los polinucleótidos representados por las SEQ ID NO 44, 58 o 59, o sus homólogos.
- 15 Por ejemplo, un conjunto de dos HybProbes utilizadas en la etapa de hibridación puede ser cualquier combinación de la HybProbe representada por la SEQ ID NO 22 con cualquiera de las HybProbes representadas por las SEQ ID NO 37, 38 y 39, o sus homólogos.
- La HybProbe representada por la SEQ ID NO 22 puede estar marcada con fluoresceína y las demás puede estar marcadas con cualquiera de LCR610, LCR640, LCR670 o LCR705.
- 20 Una de las ventajas del sistema HybProbes reside en el hecho de que permite la detección de variación de secuencia, incluyendo mutaciones, polimorfismos y otras especies de ácidos nucleicos variantes, basándose en el concepto molecular siguiente: una de las HybProbe es una "sonda de anclaje" unida estrechamente, mientras que la "sonda sensora" adyacente se extiende por la región de variación de secuencia. Durante la fusión del producto de PCR final, la alteración de secuencia se detecta como un cambio en la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) de la sonda sensora.
- 25 Por ejemplo, si la muestra contiene solo la SEQ ID NO 1, utilizando HybProbes que hibridan específicamente con dicha SEQ ID NO 1, se generaría un único pico de fusión. Si hay también un homólogo en la muestra, utilizar las mismas dos HybProbes generaría dos picos, siempre que haya al menos una base no apareada que generalmente induce un cambio de temperatura fácilmente observable.
- 30 Dependiendo del formato de las sondas utilizadas para la detección de los productos de amplificación, de los polinucleótidos seleccionados (o diseñados), de su T<sub>m</sub> y de las condiciones de hibridación, la fluorescencia se puede medir durante la etapa de amplificación, generando entonces curvas de amplificación, o después de la etapa de amplificación para un análisis de la curva de fusión, generando curvas de fusión.
- 35 Así la(s) señal(es) obtenida(s) puede(n) visualizarse en forma de curvas de amplificación o en la forma de curvas de fusión, de las que es posible deducir la presencia de especies de *Proteus* y/o deducir que una(s) de la(s) especie(s) de *Proteus* está(n) presente(s).
- En particular, un procedimiento para la detección y/o identificación de especies de *Proteus* en una muestra comprende también las etapas de
- (i) si es necesario, liberar, aislar y/o concentrar los ácidos polinucleicos presentes en la muestra;
- (ii) amplificar al menos una de las secuencias diana seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO 1 a 17, sus formas de ARN en las que T se sustituye por U, las formas complementarias de las mismas, cualquier homólogo y un fragmento de al menos 20 contiguos de las mismas, con un par de cebadores uno de los cuales está marcado,
- (iii) poner en contacto los ácidos polinucleicos con al menos una HybProbe que hibrida, adyacente a dicho cebador marcado con menos de 25 nucleótidos entremedias, con dicha(s) secuencia(s) diana,
- (iv) detectar los híbridos formados y
- 45 (v) deducir la presencia de especies de *Proteus*, y/o la identificación de las especies de *Proteus* en la muestra a partir de las señales obtenidas en la etapa (iv).
- De acuerdo con la presente memoria descriptiva, el procedimiento descrito en el presente documento que utiliza el sistema HybProbes se puede adaptar para la detección e identificación de una o varias especies de *Proteus*, permitiendo su distinción de otras especies de *Proteus*.
- 50 En particular, un procedimiento descrito en el presente documento que utiliza el sistema HybProbes se puede adaptar para la detección e identificación de *Proteus mirabilis*, lo permite su distinción de otras especies de *Proteus*.

Entonces, en la etapa de amplificación, los cebadores adecuados son pares de cebadores que amplifican específicamente la(s) secuencia(s) diana seleccionada(s) de un grupo que consiste en las SEQ ID NO 1 a 10, sus formas de ARN en las que T se sustituye por U, las formas complementarias de las mismas y homólogos de las mismas.

- 5 En la etapa de hibridación, las HybProbes deben hibridar específicamente por ejemplo con cualquiera de las SEQ ID NO 21 a 24, 27 a 29, 37 a 39, 47 a 49, 51, 54, 55 y 65 a 67 o con su forma de ARN en la que T se sustituye por U, o con la forma complementaria de las mismas.

Por lo tanto, las cepas de *Proteus mirabilis* se pueden distinguir de manera inequívoca de todos los demás organismos examinados por análisis de la curva de fusión.

- 10 No se obtienen señales relevantes con especies no de *Proteus* ni con ADN genómico humano.

Un conjunto preferido de 2 HybProbes consiste en las SEQ ID NO 24 u homólogas y la SEQ ID NO 39 u homólogos.

Este conjunto de HybProbes constituido por las SEQ ID NO 24 y 39 es ajustable a *Proteus mirabilis* con una alta sensibilidad.

- 15 Además, el procedimiento descrito en el presente documento que utiliza el sistema HybProbes puede adaptarse también para la detección y/o identificación de *Proteus vulgaris* o *Proteus penneri*, permitiendo la distinción de la primera o la última de las demás especies de *Proteus*.

- 20 Entonces, para la detección y/o identificación de *Proteus vulgaris* en la etapa de amplificación, los cebadores adecuados son pares de cebadores que amplifican específicamente la(s) secuencia(s) diana seleccionadas de un grupo que consiste en las SEQ ID NO 11 a 13, sus formas de ARN en las que T se sustituye por U, las formas complementarias de las mismas y homólogos.

En la etapa de hibridación, las HybProbes deben hibridar específicamente por ejemplo con cualquiera de las SEQ ID NO 18 a 20, 56 y 57 o con su forma de ARN en la que T se reemplaza por U, o con la forma complementaria de las mismas.

- 25 De acuerdo con la presente memoria descriptiva, cada polinucleótido enumerado en la Tabla 4, que corresponde a las SEQ ID NO 18 a SEQ ID NO 67 y cualquiera de sus homólogos, se puede utilizar en cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento como cebador y/o como sonda, solo o en combinación.

- 30 Una segunda realización basada también en un procedimiento de hibridación es la técnica de ensayo de sonda lineal. El ensayo de sonda lineal (LiPA) es un formato de hibridación inversa (Saiki et al. (1989). Proc. Natl Acad Sci. USA 86: 6230-6234) que utiliza tiras de membrana sobre las que pueden aplicarse convenientemente varias sondas de polinucleótidos (incluyendo polinucleótidos de control negativo o positivo) como líneas paralelas. La técnica LiPA, como se describe por Stuyver et al. ((1993) J. Gen Virology 74: 1093-1102) y en la patente europea EP 637342, proporciona una prueba de hibridación rápida y fácil de usar. Los resultados se pueden leer en el plazo de 4 h. después del inicio de la amplificación. Después de la amplificación, durante la que por lo general se incorpora un marcaje no isotópico al producto amplificado y la desnaturalización alcalina, el producto amplificado se pone en contacto con las sondas en la membrana y se lleva a cabo la hibridación durante aproximadamente 1 a 1,5 h. En consecuencia, los híbridos formados se detectan por un procedimiento enzimático que da como resultado un precipitado de color púrpura-marrón visible. El formato de LiPA es completamente compatible con dispositivos de barrido comercialmente disponibles, haciendo de este modo posible la interpretación automática de los resultados. Todas estas ventajas hacen al formato de LiPA susceptible de uso en un entorno rutinario.

- 35 El formato de LiPA es una herramienta ventajosa para la detección y/o identificación de patógenos a nivel de especies, pero también a niveles taxonómicos superiores o inferiores. Por ejemplo, pueden seleccionarse las configuraciones de sonda en tiras de LiPA de tal manera que puedan detectar el género completo de *Proteus* o puedan identificar especies dentro del género (por ejemplo, *P. mirabilis*, *P. vulgaris* y/o *Proteus penneri*, etc.) o puedan, en algunos casos, incluso detectar subtipos dentro de una especie.

- 45 La capacidad de generar simultáneamente resultados de hibridación con un gran número de sondas es otro beneficio de la tecnología de LiPA. En muchos casos, la cantidad de información que puede obtenerse por una combinación particular de sondas supera en gran medida los datos obtenidos mediante el uso de ensayos de sondas individuales. Por lo tanto la selección de sondas en la tira de membrana es de suma importancia, ya que un conjunto optimizado de sondas generará el máximo de información posible.

- 50 Estas sondas pueden aplicarse a tiras de membrana en lugares diferentes y el resultado se interpreta como positivo si al menos una de estas sondas es positiva. De forma alternativa estas sondas pueden aplicarse como una mezcla en el mismo lugar, reduciendo por este medio el número de líneas en una tira. Esta reducción puede ser conveniente a fin de hacer la tira más breve o de poder aumentar el número total de sondas en una tira.

Otro enfoque es el uso de sondas degeneradas, que pueden simplificar considerablemente los procedimientos de

fabricación de las tiras de LiPA.

Aún otro enfoque son sondas químicas que comprenden dos oligonucleótidos descritos en el presente documento. Por ejemplo, las secuencias de SEQ ID NO 37 y 55 son ambas necesarias para detectar los dos tipos de forma de ITS de *P. mirabilis*. En esta alternativa, puede sintetizarse una sonda que tiene la secuencia de nucleótidos de la primera SEQ ID NO seguida de la secuencia de nucleótidos de la segunda. Esta sonda tendrá las características combinadas de las dos sondas de secuencias SEQ ID NO 37 y 55.

Estos dos enfoques también se pueden utilizar en cualquiera de las realizaciones o procedimientos descritos en el presente documento.

En virtud de las propiedades mencionadas anteriormente, el sistema de LiPA puede considerarse como un formato eficiente para un procedimiento de hibridación en el que varios organismos deben detectarse simultáneamente en una muestra.

Sin embargo, debe quedar claro que se puede utilizar cualquier otro ensayo de hibridación, en el que se utilicen diferentes sondas en las mismas condiciones de hibridación y lavado, para los procedimientos de detección y/o selección anteriormente mencionados. Por ejemplo, puede ser posible inmovilizar el ácido nucleico diana sobre un soporte sólido y utilizar mezclas de diferentes sondas, todas marcadas de forma diferente, lo que da como resultado una señal de detección diferente para cada una de las sondas hibridadas con la diana. Y hoy en día están disponibles muchos soportes diferentes.

A modo de ejemplo, el procedimiento a seguir para la detección de una o más especies de *Proteus* en una muestra utilizando el formato de LiPA se resume a continuación:

- En primer lugar y si es necesario, los ácidos nucleicos presentes en la muestra se hacen disponibles para amplificación y/o hibridación.

- Opcionalmente, los ácidos nucleicos se amplifican con uno u otro sistema de amplificación de diana. Por lo general, se necesita la amplificación para mejorar la señal de hibridación subsiguiente.

- En tercer lugar, eventualmente después de una etapa de desnaturalización, los ácidos nucleicos presentes en la muestra o el producto amplificado resultante se ponen en contacto con las tiras de LiPA sobre las que se inmovilizan una o más sondas, lo que permite la detección de los organismos de interés y se permite proceder a la hibridación.

- Por último, eventualmente después de haber efectuado una etapa de lavado, se detectan los híbridos utilizando un sistema de detección conveniente y compatible. A partir de la(s) señal(es) de hibridación o patrón(es) observado(s) se puede deducir la presencia o ausencia de uno o varios organismos cribados en esa muestra biológica particular.

Pueden usarse cebadores universales localizados en las regiones flanqueantes conservadas del espaciador de ARNr, es decir, en el gen de 16S y el gen de 23S.

Para algunas aplicaciones puede ser apropiado amplificar no las diferentes bacterias presentes en la muestra, sino más específicamente las especies de *Proteus*.

De acuerdo con la presente memoria descriptiva, un procedimiento para la detección y/o identificación de especies de *Proteus* en una muestra puede comprender las etapas de:

(i) si es necesario, liberar, aislar y/o concentrar los ácidos polinucleicos presentes en la muestra;

(ii) si es necesario, amplificar la región espaciadora de ARNr de 16S-23S, o una parte de ella, con al menos un par de cebadores adecuados;

(iii) poner en contacto los ácidos polinucleicos con al menos una sonda que hibrida con la secuencia diana que consiste en las SEQ ID NO 1 o 17, o las formas de ARN de dichas SEQ ID NO 1 o 17 en las que T se sustituye por U, o las formas complementarias de las mismas, o en cualquier homólogo, o en un fragmento de al menos 10 y preferiblemente al menos 20 nucleótidos contiguos de las mismas;

(iv) detectar los híbridos formados en la etapa (iii);

(v) detectar y/o identificar el/los microorganismo(s) presentes en la muestra a partir de las numerosas señales de hibridación diferencial obtenidas en la etapa (iv).

La parte de los ITS mencionada en la etapa de amplificación es un polinucleótido que comprende la secuencia diana, o la secuencia diana misma, consistiendo la secuencia diana en cualquiera de las SEQ ID NO 1 a 17, o en sus formas de ARN en las que T se sustituye por U, o en las formas complementarias de las mismas, o en cualquier homólogo, o en un fragmento de al menos 20 nucleótidos contiguos de las mismas.

Preferentemente, la presente memoria descriptiva da a conocer un procedimiento como se describe anteriormente

en el que al menos 2 microorganismos se detectan simultáneamente.

Un conjunto de sondas como se describe en la etapa (iii) comprende al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o más sondas descritas en el presente documento.

5 En un procedimiento preferido descrito en el presente documento, un conjunto de sondas como se describe en la etapa (iii) comprende al menos dos sondas.

Las sondas preferidas son polinucleótidos de SEQ ID NO 18 a 67, sus formas de ARN en la que T se sustituye por U, las formas complementarias de las mismas, cualquiera homólogos y fragmentos de aproximadamente 10 nucleótidos contiguos de las mismas, con la condición de que se excluya la molécula de ácido nucleico ATACGTGTTATGTGC, son más preferidos fragmentos de aproximadamente 20 nucleótidos contiguos de las mismas.

10 La presente memoria descriptiva también describe un procedimiento como se describe anteriormente, en el que las sondas como se especifican en la etapa (iii) se combinan con al menos una sonda distinta, preferentemente también de la región espaciadora de ARNr de 16S-23S, lo que permite la detección simultánea de diferentes bacterias patógenas susceptibles de estar presentes en la misma muestra.

15 Las sondas preferidas se diseñan para lograr un rendimiento óptimo en las mismas condiciones de hibridación de modo que puedan utilizarse en conjuntos para hibridación simultánea; esto aumenta en gran medida la facilidad de uso de estas sondas y da como resultado una ganancia significativa en tiempo y mano de obra.

Se da a conocer también un kit que contiene cualquiera de los polinucleótidos descritos en el presente documento.

De acuerdo con la presente memoria descriptiva, un kit puede comprender los siguientes componentes:

20 - al menos un polinucleótido que hibrida con la secuencia diana que consiste en cualquiera de las SEQ ID NO 1 a 17, su forma de ARN en la que T se sustituye por U, la forma complementaria de la misma, u homólogos de la misma;

- un tampón de hibridación, o componentes necesarios para producir dicho tampón;

De acuerdo con la presente memoria descriptiva, un kit preferido puede comprender

25 - al menos un conjunto de dos HybProbes de hibridación adyacentes entre sí, a menos de 25 nucleótidos, preferiblemente menos de 5 nucleótidos, de la secuencia diana que consiste en cualquiera de las SEQ ID NO 1 a 17, su forma de ARN en la que T se sustituye por U, la forma complementaria de la misma o cualquier homólogo de la misma;

- un tampón de hibridación, o componentes necesarios para producir dicho tampón;

Para concluir, al utilizar ITS de *Proteus* como diana, es posible diseñar sondas para utilizar en diferentes procedimientos de detección y/o identificación.

30 Con el procedimiento de PCR en tiempo real, por una parte, es posible detectar e identificar el género *Proteus* - en particular *P. mirabilis*, *P. vulgaris* y *P. penneri*, usando un solo conjunto de HybProbe que genera un pico de fusión único en el sistema LightCycler (ejemplo 4).

35 Por otra parte, se puede obtener una señal específica de la especie mediante la presencia de un pico de fusión específico de una especie en particular (*P. mirabilis* en el ejemplo 3), o por la presencia de un pico a una Tm que es específico de una especie en particular (véanse *P. vulgaris* y *P. penneri* en los ejemplos 5 y 6).

También secuenciación de la región de ITS completa y la comparación con una secuencia de referencia como se indica aquí se pueden utilizar como un procedimiento para detectar e identificar especies de *Proteus* (ejemplo 7).

La descripción anterior o los ejemplos que siguen no deben interpretarse como limitantes de la invención a las realizaciones dadas a conocer específicamente en la misma.

#### 40 EJEMPLOS

Para los ejemplos descritos a continuación, se amplificó el espaciador transcrito interno (ITS) de 16S-23S usando cebadores diseñados en regiones conservadas de ARNr de 16S y ARNr de 23S, respectivamente.

##### **Ejemplo 1: Protocolo de LightCycler**

45 El ADN se preparó de acuerdo con procedimientos estándar y se utilizaron aproximadamente 10<sup>4</sup> equivalentes de genoma como diana para la amplificación.

Una muestra se señaló como positiva si estaban presentes una curva de cuantificación y un pico de fusión para esa muestra.

Las sondas se diseñaron para trabajar como HybProbes en LightCycler v1.2 (software v4), lo que permite una detección de PCR de fluorescencia en tiempo real.

Se marcó una HybProbe en su extremo 3' con un tinte de fluoresceína, mientras que se marcó la HybProbe vecina en su extremo 5' con un tinte LC-red 640 o LC-red 705.

5 Siguiendo las instrucciones del fabricante del kit LC-FastStart DNA Master Hybridization Probes (n.º de cat. 3.003.248 o n.º 2.239.272):

- puede utilizarse cualquier material de muestra adecuado para PCR en términos de pureza, concentración y ausencia de inhibidores;

- los cebadores deben estar a una concentración final de 0,3 a 1 µM cada uno;

10 - las HybProbes a una concentración final de 0,2 µM cada una, o doble;

- la concentración de MgCl<sub>2</sub> debe optimizarse y puede variar de 1 a 5 mM;

- y se debe ejecutar un control negativo.

15 Las condiciones de amplificación y de fusión se describen después en el presente documento. Se utilizó la versión 4 del software de LC. Los ajustes de cuantificación fueron F2/back F1 (muestras). Para el ajuste del valor de referencia, se utilizó el modo aritmético. El cálculo del punto de corte (Ct) se basó en el máximo de la segunda derivada. El procedimiento de cálculo para el pico de fusión fue polinómico. El área del pico se utilizó para calcular la Tm.

**Tabla 1: Programa de amplificación y curva de fusión:**

	Temp. (°C)	Tiempo de espera	Pendiente (°C/s)	Modo de adquisición	
45x {	Desnaturalización	95	10 min	20	Ninguno
	Ciclos	95	10 s	20	Ninguno
		50	15 s	20	SIMPLE
		72	30 s	20	Ninguno
	Fusión	95	60 s	20	Ninguno
40		60 s	20	Ninguno	
80		0 s	0,1	CONTINUO	
Enfriamiento	30	0 s	20	Ninguno	

**Ejemplo 2: Diferentes conjuntos de HybProbes**

20 En este ejemplo, se marcó una HybProbe en su extremo 3' con un tinte de fluoresceína, mientras que se marcó la HybProbe vecina en su extremo 5' con tinte LC-Red 640 o LC Red 705.

Se aplicó el mismo protocolo LightCycler como se describe en el ejemplo 1.

Tabla 2: Resultados de diferentes combinaciones ensayadas

SEQ ID NO marcadas con fluoresceína	SEQ ID NO marcados con LC-red	Objetivo del diseño	Cepas detectadas/cepas ensayadas				Preferido/más preferido
			<i>P. mirabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. penneri</i>	Otras bacterias	
21	37	Específico de <i>P. mirabilis</i>	17/17	0/1	0/2	-	++
23	37	Específico de <i>P. mirabilis</i>	17/17	0/1	0/2	-	++
21	38	Específico de <i>P. mirabilis</i>	2/2	0/1	0/1	-	+

ES 2 597 841 T3

SEQ ID NO marcadas con fluoresceína	SEQ ID NO marcados con LC- red	Objetivo del diseño	Cepas detectadas/cepas ensayadas				Preferido/má s preferido
			<i>P. mirabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. penneri</i>	Otras bacterias	
23	38	Específico de <i>P. mirabilis</i>	2/2	0/1	0/1	-	+
24	37	Específico de <i>P. mirabilis</i>	4/4	-	-	-	+
24	38	Específico de <i>P. mirabilis</i>	4/4	-	-	-	+
24	39	Específico de <i>P. mirabilis</i>	42/42	0/3	0/3	0/56	++
22	37	Específico de <i>P. mirabilis</i>	42/42	0/3	0/3	0/56	++
22	38	Específico de <i>P. mirabilis</i>	4/4	-	-	-	+
22	39	Específico de <i>P. mirabilis</i>	4/4	-	-	-	+
25	40	Género <i>Proteus</i>	2/2	1/1	1/1	-	+
25	41	Género <i>Proteus</i>	2/2	1/1	1/1	-	+
26	40	Género <i>Proteus</i>	2/2	1/1	1/1	-	+
26	41	Género <i>Proteus</i>	2/2	1/1	1/1	-	+
27	42	Género <i>Proteus</i>	2/2	1/1	1/1	-	+
28	42	Género <i>Proteus</i>	2/2	1/1	1/1	-	+
29	42	Género <i>Proteus</i>	2/2	1/1	1/1	-	+
30	43	Género <i>Proteus</i>	19/19	2/2	2/2	0/8	++
30	44	Género <i>Proteus</i>	2/2	1/1	1/1	-	+
31	43	Género <i>Proteus</i>	42/42	3/3	3/3	0/56	++
31	44	Género <i>Proteus</i>	2/2	1/1	1/1	-	+

SEQ ID NO marcadas con fluoresceína	SEQ ID NO marcados con LC- red	Objetivo del diseño	Cepas detectadas/cepas ensayadas				Preferido/má s preferido
			<i>P. mirabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. penneri</i>	Otras bacterias	
32	45	Género <i>Proteus</i>	2/2	1/1	1/1	-	+
32	46	Género <i>Proteus</i>	2/2	1/1	1/1	-	+
33	45	Género <i>Proteus</i>	19/19	2/2	2/2	0/8	++
<u>33</u>	46	Género <i>Proteus</i>	2/2	1/1	1/1		+

### Ejemplo 3: HybProbes específicas de *P. mirabilis*

Las HybProbes representadas por las SEQ ID NO 24 y SEQ ID NO 39 se utilizaron en un protocolo LightCycler como se describe en el ejemplo 1. La primera (SEQ ID NO 24) se marcó con fluoresceína y la segunda (SEQ ID NO 39) se marcó con LC-Red 640.

- 5 Se aplicó el mismo protocolo LightCycler como se describe en el ejemplo 1 y la muestra utilizada contenía una de las cepas de *P. mirabilis*. Se observó un pico de fusión específico a 53 °C.

La sensibilidad de este conjunto HybProbe se evaluó usando 42 cepas de *P. mirabilis* (10 procedentes de Europa occidental, 10 del Reino Unido, 10 de Europa meridional, 10 de los Estados Unidos y 2 de Japón). Todas las cepas de *P. mirabilis* tenían una curva de cuantificación visible con valores de Ct variables de 19,95 a 22,81.

- 10 Se observó un pico de fusión de 53 °C (DESVESTA 0,60 °C) para todas las cepas de *P. mirabilis* ensayadas, mostrando una sensibilidad del 100 % para *P. mirabilis* con este conjunto de HybProbes.

Para ensayar la especificidad, se ensayaron 3 cepas de *P. vulgaris* y 3 cepas de *P. penneri*. No se obtuvieron ninguna curva de cuantificación ni curvas de fusión, mostrando una especificidad del 100 % con respecto a las demás especies de *Proteus* clínicamente relevantes.

- 15 Además de estas especies de *Proteus*, se ensayó un gran panel de otros organismos (véase la Tabla 3) y se realizó un experimento adicional con ADN humano. Ni el ADN humano ni los microorganismos ensayados dieron ninguna curva de cuantificación ni pico de fusión alguno, lo que confirma la especificidad de HybProbes del 100 %.

**Tabla 3: Lista de los microorganismos ensayados para determinar la especificidad.**

<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Bartonella henselae</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Cardiobacterium hominis</i>
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Corynebacterium jeikeium</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Gemella haemolysans</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Legionella pneumophila</i>

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Moraxella catarrhalis (Branhamella)</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Morganella morganii</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Mycobacterium fortuitum</i>
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Streptococcus sanguinis</i> grupos "sanguinis"	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Peptostreptococcus magnus</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	<i>Prevotella denticola</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Salmonella enterica venteritidis</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>

Este conjunto de HybProbes es capaz de detectar e identificar *P. mirabilis* de una manera específica.

#### **Ejemplo 4: HybProbes para especies de *Proteus***

Se ensayaron cuatro muestras que contienen respectivamente dos cepas de *P. mirabilis* (cada cepa en una muestra), una de *P. penneri* y una de *P. vulgaris*.

- 5 Las HybProbes representadas por las SEQ ID NO 30 y SEQ ID NO 44 se utilizaron en un protocolo LightCycler como se describe en el ejemplo 1.

Cada cepa generó una curva de cuantificación y se observó un pico de fusión a 55 °C.

Por lo tanto, este conjunto de HybProbes es capaz de detectar e identificar diferentes especies de *Proteus*, en particular las especies de *Proteus* que son clínicamente relevantes.

- 10 **Ejemplo 5: HybProbes para distinguir *P. penneri* de otras especies de *Proteus*.**

Se ensayaron cuatro muestras que contienen respectivamente dos cepas de *P. mirabilis* (cada cepa en una muestra), una de *P. penneri* y una de *P. vulgaris* con otro conjunto de HybProbes.

Las HybProbes representadas por las SEQ ID NO 27 y SEQ ID NO 42 se utilizaron en un protocolo LightCycler como se describe en el ejemplo 1.

- 15 Cada cepa generó una curva de cuantificación. Después de un análisis de la curva de fusión, *P. penneri* mostró un pico de fusión a 52,5 °C. Las otras tres mostraron un pico de fusión a 56 °C.

Este conjunto de HybProbes permite, por lo tanto, distinguir e identificar *P. penneri* de las demás especies de *Proteus*.

#### **Ejemplo 6: HybProbes para distinguir *P. vulgaris* de otras especies de *Proteus*.**

- 20 Se ensayaron cuatro muestras que contienen respectivamente dos cepas de *P. mirabilis* (cada cepa en una muestra), una de *P. penneri* y una de *P. vulgaris* con otro conjunto de HybProbes.

Las HybProbes representadas por las SEQ ID NO 32 y SEQ ID NO 45 se utilizaron en un protocolo LightCycler como se describe en el ejemplo 1.

- 25 Cada cepa generó una curva de cuantificación. Después de un análisis de la curva de fusión, *P. vulgaris* mostró un pico de fusión de 54,5 °C. Las otras dos mostraron un pico de fusión a 52,5 °C.

Este conjunto de HybProbes permite, por lo tanto, distinguir e identificar *P. vulgaris* de las otras especies de *Proteus*.

Teniendo en cuenta las secuencias de ITS de cada especie, se esperaba solo un pico de fusión a 54,5 °C.

El resultado obtenido significa que la cepa de *P. vulgaris* ensayada contiene un polimorfismo en su secuencia de ITS que es responsable del cambio observado en la Tm.

**Ejemplo 7: Detección e identificación de *Proteus* spp. mediante determinación de la secuencia de nucleótidos de ITS.**

- 5 Se recibió una muestra sin una indicación clara de la especie de *Proteus* que se suponía que contenía.

Se amplificó la región ITS de la especie a determinar utilizando cebadores universales situados en 16S y 23S.

Se clonaron los amplicones en el vector pGEM-T (Promega) y se derivaron las secuencias de nucleótidos de ITS de acuerdo con la química de terminación de la cadena didesoxi utilizando cebadores localizados en el vector de plásmido.

- 10 Se encontraron tanto un espaciador que contenía ARNt<sup>glu</sup> como un espaciador que contenía ARNt<sup>ile-ala</sup>.

Estas secuencias de ITS se sometieron a análisis de secuencia y se compararon con los otros espaciadores ya secuenciados.

La secuencia de nucleótidos del espaciador de ARNt<sup>glu</sup> a identificar era completamente idéntica a la secuencia de nucleótidos del espaciador de consenso ARNt<sup>glu</sup> de *P. mirabilis* representada por la SEQ ID NO 4.

- 15 La secuencia de nucleótidos del espaciador de ARNt<sup>ile-ala</sup> de esta muestra difería en 3 pares de bases de 702 (99,4 % de homología) en comparación con la secuencia de nucleótidos de consenso del espaciador de ARNt<sup>ile-ala</sup> de *P. mirabilis* representada por la SEQ ID NO 6.

En vista del alto grado de homología, se pudo deducir que la muestra contenía *P. mirabilis*

**Ejemplo 8: HybProbes para distinguir las tres especies de *Proteus* clínicamente relevantes.**

- 20 Se diseñaron un conjunto de tres HybProbes representadas por las SEQ ID NO 50, SEQ ID NO 51 y SEQ ID NO 52 para un protocolo de LightCycler como se describe en el ejemplo 1, para muestras conteniendo respectivamente *P. mirabilis*, *P. penneri* y *P. vulgaris*

La primera HybProbe (SEQ ID NO 50) marcada con fluoresceína y las otras dos (SEQ ID NO 51 y SEQ ID NO 52) marcadas con LC-Red, permiten la distinción de *P. mirabilis* de *P. vulgaris* y *P. penneri* por medio de curvas de fusión, teniendo la que representa a *P. mirabilis* un pico de fusión a 63 °C y las otras dos a 67 °C.

- 25





SEQ ID NO.	Secuencias
19	acagtcagcgcaacatacatagtagtgcagcaggc
20	acgacgaaatgtaatctgcacagccatcaccaccagacgctcyaagagaacaatctcgggttgga
21	ggcgtaccacttatctgacg
22	cgtaccacttatctgacg
23	gcgtaaccacttatctgacg
24	cgtaccacttatctgac
25	cacacagatgctcgtatgaagacgagcaaa
26	ctcacacagattgctcgtatgaagacgagcaaa
27	cgccaatgcgcggt
28	acgccaatgcgcggt
29	gacgccaatgcgcggt
30	tgaaaacaaaatcaatataatcaccgaggtat
31	attgaaaacaaaatcaatataatcaccgaggtat
32	tgaaacaagcigaaaaatig
33	ggaacaagctgaaaaatig
34	gtgaatttatgctcttaacaatc
35	ttaagggtactcccittaaag
36	ggaacaactgaaaaaatgaaaaacaatca
37	agtcagagaataaactaagcctaattca
38	agtcagagaataaactaagcctaattcaaa
39	gagtcagagaataaactaagcctaattca
40	gcgctcgaagcgtgac
41	cgcgctcgcgaagctg
42	tgagtgaaaggcgtace
43	tgagtcctcaaaaatctcaaa

SEQ ID NO.	Secuencias
44	tgagtctcaaaaatctcaa
45	aacaaatcaatataatcacccgaggatattgatga
46	aacaaatcaatataatcacccgaggatattgat
47	ggacaagctgaaaaattgaaaacaaatc
48	gtaagtaatcggtaattaa
49	atatattaccgaggatattgatgagt
50	gacgccaattgcgcggtatgagtgaa
51	ggcgtaccacttactgac
52	ggcgtaccacactatagtcigtat
53	cctaagagatacgtagttatgtg
54	taatcttgratataaaacaatgattcagagatattaggaatagtagtactggyaattat
55	atataaaacaatgattcagagatattaggaatagtagtactg
56	taatcttgaatataaaaaataaattcafatattatagcaatagtagtactgccaattayttt
57	atataaaataaattcagagatattagcaatagtagtactg
58	tatwtgctttaaacaatctggaaacaagctgaaaaattgaaaaacaaatcaatataatcmcgaggatattgtagtctcaaaaatctcara
59	tgctcttaacaatctggaaacaagctgaaaaattgaaaaacaaatcaatataatca
60	aaygagcagaaaataccggtata
61	gtgctcacacagattgtctgtatgaagaacgagca
62	agaacgagcaaaaagcgcctcgcgaagctgac
63	gacgccaatingcgggtatgagtgaaagggctaccac
64	tgccggtatgagygaaagggctaccac
65	Ggcgtaccacttctgacraragtcagagaaataaytaagctaatcaaaaygagttacttlayt
66	Ggcgtaccacttctgacraragtcagagaaataaytaagctaatcaaaaygagttat
67	Ggcgtaccacttctgacraragtcagagaaataaytaagctaatcaaa
68	Acaccgcccgtcacaccaayg
69	Astgccarggcatccacc

## REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un conjunto de al menos dos sondas de polinucleótidos para la detección y/o identificación de especies de *Proteus*, comprendiendo cada sonda de 5 a 50 nucleótidos e hibridando dichas sondas específicamente en posiciones adyacentes separadas por no más de 25 nucleótidos entre dichas dos sondas en cualquiera de los ácidos nucleicos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID NO 1 a 17, su forma de ARN en la que T se sustituye por U, la forma complementaria de las mismas, o polinucleótidos homólogos equivalentes que comparten al menos un 80 % de homología con los correspondientes polinucleótidos no modificados de las SEQ ID NO 1 a 17.
- 2.** Un conjunto de al menos dos sondas de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dichas sondas se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID NO 18 a 67.
- 10 **3.** Un conjunto de tres sondas de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, comprendiendo cada sonda de 5 a 50 nucleótidos e hibridando dichas sondas específicamente en posiciones adyacentes separadas por no más de 25 nucleótidos entre sondas adyacentes en cualquiera de los ácidos nucleicos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID NO 1 a 17, su forma de ARN en la que T se sustituye por U, la forma complementaria de las mismas, o polinucleótidos homólogos equivalentes que comparten al menos un 80 % de homología con los correspondientes polinucleótidos no modificados de las SEQ ID NO 1 a 17.
- 15 **4.** Una composición que comprende al menos un conjunto de al menos dos sondas de polinucleótidos descritas en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 5.** Un procedimiento para detectar o identificar especies de *Proteus* utilizando al menos un conjunto de al menos dos sondas de polinucleótidos como se expone en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dichas sondas se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID NO 18 a 67.
- 20 **6.** Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 para la detección y/o identificación de especies de *Proteus* en una muestra que comprende las etapas de:
- (i) si es necesario, liberar, aislar y/o concentrar los ácidos polinucleicos presentes en la muestra;
- (ii) amplificar la(s) región(es) espaciadora(s) de ARNr de 16S-23S, o al menos una de la(s) secuencia(s) diana que comprende(n) cualquier/cualesquiera molécula(s) de ácido nucleico como se describe(n) en la reivindicación 1, con al menos un par cebador adecuado;
- 25 (iii) poner en contacto los ácidos polinucleicos con al menos un conjunto de al menos dos sondas de polinucleótidos que hibridan específicamente en posiciones adyacentes separadas por no más de 25 nucleótidos entre sondas adyacentes, seleccionadas dichas sondas del grupo que consiste en las SEQ ID NO 18 a 67;
- 30 (iv) detectar los híbridos formados e
- (v) interpretar la(s) señal(es) obtenida(s) y deducir la presencia de especies de *Proteus* y/o la identificación de las especies de *Proteus* en la muestra.
- 7.** Un procedimiento según la reivindicación 5 o 6, en el que las dos sondas de polinucleótidos consisten en cualquier combinación de los polinucleótidos de la Tabla 2.
- 35 **8.** Un kit para la detección y/o identificación de especies de *Proteus* que comprende los siguientes componentes:
- un conjunto de al menos dos sondas de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3,
  - un tampón de hibridación, o componentes necesarios para producir dicho tampón.