

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 145**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.11.2011 PCT/US2011/060224**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.05.2012 WO12064978**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.11.2011 E 11840497 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2638178**

54 Título: **Procedimientos y kits para la detección e identificación de micobacterias**

30 Prioridad:

**10.11.2010 US 412190 P**

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

**22.03.2017**

73 Titular/es:

**BRANDEIS UNIVERSITY (100.0%)  
415 South Street  
Waltham, MA 02453-2728, US**

72 Inventor/es:

**WANGH, LAWRENCE, J. y  
RICE, JOHN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 606 145 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

Procedimientos y kits para la detección e identificación de micobacterias

### Campo

5 En el presente documento se proporcionan procedimientos para la detección e identificación de cepas de micobacterias, y composiciones y kits para realizar dichos procedimientos. En particular, se proporcionan procedimientos de amplificación y detección por fluorescencia de ácidos nucleicos para la detección y diferenciación de micobacterias basados, por ejemplo, en la patogenicidad, en la especie, y en la resistencia o sensibilidad a antibióticos. En el presente documento, las composiciones y los procedimientos se proporcionan para identificar y diferenciar micobacterias en mezclas de diferentes micobacterias y no micobacterias.

### 10 Antecedentes

15 *Mycobacterium* es un género de actinobacterias, habida cuenta de su propia familia, *Mycobacteriaceae*. El género incluye patógenos que causan enfermedades graves en los mamíferos, incluyendo la tuberculosis (TB) y la lepra (Ryan y Ray (editores) (2004). Sherris Medical Microbiology (4<sup>a</sup> ed.). McGraw Hill. Las micobacterias pueden colonizar sus huéspedes sin que ellos muestren signos adversos. Por ejemplo, miles de millones de personas en todo el mundo tienen infecciones asintomáticas por *M. tuberculosis*. Las micobacterias son resistentes de manera natural a una serie de antibióticos tales como la penicilina, y han surgido muchas otras cepas resistentes a los antibióticos.

20 Las micobacterias se clasifican en el complejo de *M. tuberculosis* (MTBC) o micobacterias no tuberculosas (NTM) con fines de diagnóstico y tratamiento. El MTBC comprende especies que pueden causar la tuberculosis: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. Canetti* y *M. microti*. Las NTM son el resto de micobacterias, que pueden causar una enfermedad pulmonar parecida a la tuberculosis, linfadenitis, enfermedad de la piel, enfermedad diseminada, enfermedad de Hansen y lepra. Del MTBC y de las NTM, hay diferentes especies más o menos comunes en diferentes regiones del mundo, y presentan diferentes características patógenas y de virulencia.

25 La presencia de la TB resistente a antibióticos y la TB resistente a múltiples fármacos (TB RMF) y la tuberculosis extremadamente resistente a los fármacos (TB ERF), en particular, es de gran preocupación para la comunidad médica. La TB RMF es la TB que es resistente a dos fármacos antituberculosos de primera línea, la isoniazida y la rifampicina, que normalmente se usan para el tratamiento de todas las personas con la enfermedad de la TB. En la actualidad, la TB ERF es un tipo relativamente raro de TB RMF, definida como la TB que es resistente a la isoniazida y a la rifampicina, más resistente a cualquier fluoroquinolona y a al menos uno de tres fármacos inyectables de segunda línea (por ejemplo, amikacina, kanamicina o capreomicina). Debido a que la TB ERF es resistente a fármacos de primera línea y de segunda línea, los pacientes se quedan con opciones de tratamiento que son mucho menos eficaces. Las formas resistentes de la TB plantean preocupaciones sobre una epidemia de TB en el futuro con opciones de tratamiento limitadas, y ponen en peligro los avances logrados en el tratamiento y el control de la TB en todo el mundo.

35 La infección por *Mycobacteria* puede consistir comúnmente de una infección mixta de: micobacterias en presencia de otros agentes infecciosos, NTM y MTBC, diferentes especies de NTM o MTBC y/o micobacterias con diferentes perfiles de resistencia a antibióticos.

### Sumario

40 En algunas realizaciones, en el presente documento, se proporcionan procedimientos de identificación de uno o más tipos de micobacterias en una muestra, que comprenden (a) proporcionar: (i) una muestra que se sospecha que comprende una o más micobacterias, e (ii) reactivos de detección que comprenden al menos un par de cebadores y al menos un conjunto de sondas distinguibles de forma detectable de dos sondas de hibridación que se hibridan con secuencias de ácido nucleico diana adyacentes en una o más micobacterias, comprendiendo cada conjunto de sondas: (A) una sonda de desactivación marcada con un desactivador no fluorescente, y (B) una sonda de señalización marcada con un colorante emisor de fluorescencia y un desactivador no fluorescente, en el que la sonda de señalización no emite fluorescencia por encima del fondo cuando no está hibridada con su secuencia diana, pero emite una señal de fluorescencia por encima del fondo tras la hibridación con su secuencia diana en ausencia de sonda de desactivación unida, en el que, si tanto la sonda de señalización como la sonda de desactivación se hibridan a sus secuencias de ácido nucleico diana adyacentes, el desactivador no fluorescente de la sonda de desactivación desactiva la señal de la sonda de señalización; (b) amplificar el ácido nucleico de una o más micobacterias con los cebadores; (c) detectar la fluorescencia del colorante emisor de fluorescencia de cada sonda distinguible de forma detectable fijada en un intervalo de temperaturas; (d) generar distintivos de fluorescencia dependientes de la temperatura para cada colorante emisor de fluorescencia; y (e) analizar los distintivos de fluorescencia dependientes de la temperatura para identificar una o más micobacterias en la muestra.

55 En algunas realizaciones, la temperatura de fusión de la sonda de señalización de un conjunto de sondas es superior a la temperatura de fusión de la sonda de desactivación asociada. En algunas realizaciones, la sonda de desactivación y/o la sonda de señalización están configuradas para hibridarse con una región variable de ácido

nucleico de micobacterias. En algunas realizaciones, el colorante emisor de fluorescencia y los desactivadores no fluorescentes de cada conjunto de sondas son capaces de interactuar mediante FRET. En algunas realizaciones, los reactivos de detección comprenden dos o más conjuntos de sondas. En algunas realizaciones, dos o más conjuntos de sondas comprenden diferentes colorantes emisores de la fluorescencia que emiten a diferentes longitudes de onda de forma detectable. En algunas realizaciones, dos o más conjuntos de sondas comprenden los mismos colorantes emisores de fluorescencia. En algunas realizaciones, los conjuntos de sondas que comprenden los mismos colorantes emisores de fluorescencia se hibridan a sus secuencias de ácidos nucleicos diana a temperaturas de fusión detectablemente diferentes con sus secuencias de ácidos nucleicos diana. En algunas realizaciones, cada uno de los dos o más conjuntos de sondas se distingue de manera detectable del resto de conjuntos de sondas en dichos reactivos de detección por (1) la temperatura de fusión, (2) la longitud de onda de emisión de dicho colorante emisor de fluorescencia o (3) una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, los reactivos de detección comprenden 5 o más conjuntos de sondas. En algunas realizaciones, los reactivos de detección comprenden 10 o más conjuntos de sondas. En algunas realizaciones, se usa un conjunto de sondas para diferenciar entre micobacterias de diferente patogenicidad, especie o resistencia a los antibióticos. En algunas realizaciones, una o ambas sondas de dicho conjunto de sondas comprenden diferentes grados de complementariedad a sus secuencias diana en dos o más micobacterias diferentes. En algunas realizaciones, los diferentes grados de complementariedad dan lugar a diferentes distintivos fluorescentes dependientes de la temperatura generados por un conjunto de sondas y sus secuencias diana. En algunas realizaciones, los distintivos fluorescentes dependientes de la temperatura diferentes se usan para diferenciar diferentes micobacterias en una muestra. En algunas realizaciones, el distintivo de la fluorescencia dependiente de la temperatura comprende una curva de fusión o una curva de hibridación. En algunas realizaciones, el análisis del distintivo de la fluorescencia dependiente de la temperatura comprende la comparación con una curva de fusión o una curva de hibridación previamente establecida. En algunas realizaciones, el análisis se realiza con un ordenador. En algunas realizaciones, la amplificación se realiza mediante un procedimiento de amplificación no simétrica que incluye la extensión de cebadores y una temperatura de hibridación del cebador media tras los primeros ciclos de amplificación. En algunas realizaciones, la amplificación se realiza mediante amplificación de LATE-PCR. En algunas realizaciones, las sondas de al menos un conjunto de sondas distinguibles de forma detectable tienen temperaturas de fusión con sus secuencias de ácidos nucleicos diana inferiores a la temperatura de hibridación de al menos un cebador de la reacción de amplificación.

En algunas realizaciones, uno o más conjuntos de sondas distinguibles de forma detectable están configurados para hibridarse con una región de ácido nucleico de micobacterias para diferenciar entre NTM y MTBC. En algunas realizaciones, el uno o más pares de cebadores están configurados para amplificar una región de ácido nucleico de micobacterias que varía entre NTM y MTBC. En algunas realizaciones, la región de ácido nucleico de micobacterias comprende ARNr 16S. En algunas realizaciones, el uno o más conjuntos de sondas distinguibles de forma detectable comprenden SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54, o tienen un 70 % o más de identidad con las mismas (por ejemplo, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %). En algunas realizaciones, el uno o más pares de cebadores comprenden SEQ ID NO: 51 y SEQ ID NO: 52, o tienen un 70 % o más de identidad con las mismas (por ejemplo, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %).

En algunas realizaciones, uno o más conjuntos de sondas distinguibles de forma detectable están configurados para hibridarse con una región de ácido nucleico de micobacterias de diferenciar entre diferentes especies de MTBC. En algunas realizaciones, el uno o más pares de cebadores están configurados para amplificar una región de ácido nucleico de micobacterias que varía entre diferentes especies de MTBC. En algunas realizaciones, la región de ácido nucleico de micobacterias comprende el gen gyrB. En algunas realizaciones, uno o más conjuntos de sondas distinguibles de forma detectable comprenden SEQ ID NO: 61 y SEQ ID NO: 62, o tienen un 70 % o más de identidad con las mismas (por ejemplo, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %). En algunas realizaciones, el uno o más conjuntos de sondas distinguibles de forma detectable comprenden además SEQ ID NO: 59, o tienen un 70 % o más de identidad con la misma (por ejemplo, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %). En algunas realizaciones, el uno o más conjuntos de sondas distinguibles de forma detectable comprenden además SEQ ID NO: 60, o tienen un 70 % o más de identidad con la misma (por ejemplo, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %). En algunas realizaciones, el uno o más pares de cebadores comprenden SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 58, o tienen un 70 % o más de identidad con las mismas (por ejemplo, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %).

En algunas realizaciones, tres o más conjuntos de sondas distinguibles de forma detectable están configurados para hibridarse con una región de ácido nucleico de micobacterias para diferenciar entre micobacterias resistentes a la rifampicina y micobacterias sensibles a la rifampicina. En algunas realizaciones, uno o más pares de cebadores están configurados para amplificar una región de ácido nucleico de micobacterias que varía entre micobacterias resistentes a la rifampicina y micobacterias sensibles a la rifampicina. En algunas realizaciones, la región de ácido nucleico de micobacterias comprende el gen rpoB. En algunas realizaciones, los tres o más conjuntos de sondas distinguibles de forma detectable comprenden SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, y SEQ ID NO: 35, o tienen un 70 % o más de identidad con las mismas (por ejemplo, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %). En algunas realizaciones, el uno o más pares de cebadores comprenden SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29, o tienen un 70 % o más de identidad con las mismas (por ejemplo, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %).

En algunas realizaciones, uno o más conjuntos de sondas distinguibles de forma detectable están configurados para hibridarse con una región de ácido nucleico de micobacterias para diferenciar entre micobacterias resistentes al

- etambutol y micobacterias sensibles al etambutol. En algunas realizaciones, el uno o más pares de cebadores están configurados para amplificar una región de ácido nucleico de micobacterias que varía entre micobacterias resistentes al etambutol y micobacterias sensibles al etambutol. En algunas realizaciones, la región de ácido nucleico de micobacterias comprende el gen embB. En algunas realizaciones, el uno o más conjuntos de sondas distinguibles de forma detectable comprenden SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 70, o tienen un 70 % o más de identidad con las mismas (por ejemplo, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %). En algunas realizaciones, el uno o más pares de cebadores comprenden SEQ ID NO: 67 y SEQ ID NO: 68, o tienen un 70 % o más de identidad con las mismas (por ejemplo, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %).
- En algunas realizaciones, uno o más conjuntos de sondas distinguibles de forma detectable están configurados para hibridarse con una región de ácido nucleico de micobacterias que comprende el gen tlyA. En algunas realizaciones, el uno o más pares de cebadores están configurados para amplificar una región del ácido nucleico de tlyA de las micobacterias que varía entre las especies de micobacterias. En algunas realizaciones, el uno o más pares de cebadores comprenden SEQ ID NO: 71 y SEQ ID NO: 72, o tienen un 70 % o más de identidad con las mismas (por ejemplo, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %).
- En algunas realizaciones, el uno o más conjuntos de sondas distinguibles de forma detectable están configurados para hibridarse con una región de ácido nucleico de micobacterias para diferenciar entre micobacterias resistentes a la isoniazida y micobacterias sensibles a la isoniazida. En algunas realizaciones, el uno o más pares de cebadores están configurados para amplificar una región de ácido nucleico de micobacterias que varía entre micobacterias resistentes a la isoniazida y micobacterias sensibles a la isoniazida. En algunas realizaciones, la región de ácido nucleico de micobacterias comprende la región promotora mabA. En algunas realizaciones, el uno o más conjuntos de sondas distinguibles de forma detectable comprenden SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 48, o tienen un 70 % o más de identidad con las mismas (por ejemplo, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %). En algunas realizaciones, el uno o más pares de cebadores comprenden SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46, o tienen un 70 % o más de identidad con las mismas (por ejemplo, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %).
- En algunas realizaciones, uno o más conjuntos de sondas distinguibles de forma detectable están configurados para hibridarse con una región de ácido nucleico de micobacterias que comprende el gen ahpC. En algunas realizaciones, el uno o más pares de cebadores están configurados para amplificar una región del ácido nucleico de ahpC de las micobacterias que varía entre las especies de micobacterias. En algunas realizaciones, el uno o más pares de cebadores comprenden SEQ ID NO: 73 y SEQ ID NO: 74, o tienen un 70 % o más de identidad con las mismas (por ejemplo, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %).
- En algunas realizaciones, uno o más conjuntos de sondas distinguibles de forma detectable están configurados para hibridarse con una región de ácido nucleico de micobacterias que comprende el gen katG. En algunas realizaciones, el uno o más pares de cebadores están configurados para amplificar una región del ácido nucleico de katG de las micobacterias que varía entre las especies de micobacterias. En algunas realizaciones, el uno o más conjuntos de sondas distinguibles de forma detectable comprenden SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42, o tienen un 70 % o más de identidad con las mismas (por ejemplo, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %). En algunas realizaciones, el uno o más pares de cebadores comprenden SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40, o tienen un 70 % o más de identidad con las mismas (por ejemplo, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %).
- En algunas realizaciones, uno o más conjuntos de sondas distinguibles de forma detectable están configurados para hibridarse con una región de ácido nucleico de micobacterias para diferenciar entre las micobacterias resistentes a la fluoroquinolona y las micobacterias sensibles a la fluoroquinolona. En algunas realizaciones, el uno o más pares de cebadores están configurados para amplificar una región de ácido nucleico de micobacterias que varía entre las micobacterias resistentes a la fluoroquinolona y las micobacterias sensibles a la fluoroquinolona. En algunas realizaciones, la región de ácido nucleico de micobacterias comprende el gen gyrA.
- En algunas realizaciones, la identificación de una o más micobacterias en una muestra comprende: (a) diferenciar entre NTM y MTBC; (b) diferenciar entre diferentes especies de MTBC; (c) diferenciar entre micobacterias resistentes a la isoniazida y micobacterias sensibles a la isoniazida; (d) diferenciar entre micobacterias resistentes a la fluoroquinolona y micobacterias sensibles a la fluoroquinolona; (e) diferenciar entre micobacterias resistentes al etambutol y micobacterias sensibles al etambutol; y/o (f) diferenciar entre micobacterias resistentes a la rifampicina y micobacterias sensibles a la rifampicina. En algunas realizaciones, se realiza una reacción multiplexada (por ejemplo, en un solo tubo cerrado u otro recipiente de reacción), usando una pluralidad de cebadores y sondas para lograr uno o más de todos de (a) a (f). En algunas de dichas realizaciones, se emplean cuatro o menos (tres, dos o uno) marcadores distinguibles ópticamente en la reacción de multiplexación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, cada uno de (a) a (f) se realiza usando cuatro o menos "colores", de modo que se puede emplear un instrumento configurado para detectar hasta cuatro colores para extraer y analizar los datos.
- En algunas realizaciones, la diana que se desea detectar (por ejemplo, una cepa de micobacteria resistente a un determinado fármaco) está presente en una muestra que comprende una cantidad sustancial de ácido nucleico de fuentes no diana. Dichas fuentes no diana incluyen, pero sin limitación, ácido nucleico genómico humano, ácido nucleico de organismos patógenos no micobacterianos, otra micobacteria y micobacteria que tienen un perfil de resistencia a fármacos diferente. En algunas realizaciones, la diana está presente a menos del 20 % del ácido

nucleico total de la muestra (por número de copias) (por ejemplo, menos del 10 %, menos del 5 %, menos del 1 %, menos del 0,5 % o menos del 0,1 %).

En algunas realizaciones, en el presente documento, se proporcionan kits de reactivos para la identificación de uno o más tipos de micobacterias en una muestra, que comprenden: (a) al menos un par de cebadores, estando dichos cebadores configurados para unirse a regiones de ácido nucleico de micobacterias conservadas entre dos o más tipos de micobacterias, y estando los cebadores configurados para amplificar una región variable de ácido nucleico de micobacterias; y (b) al menos un conjunto de sondas distinguibles de forma detectable de dos sondas de hibridación que se hibridan con secuencias de ácido nucleico diana adyacentes dentro de la región variable del ácido nucleico de micobacterias, que comprende: (i) una sonda de desactivación marcada con un desactivador no fluorescente, y (ii) una sonda de señalización marcada con un colorante emisor de fluorescencia y un desactivador no fluorescente, en el que la sonda de señalización no emite fluorescencia por encima del fondo cuando no se hibrida con su secuencia diana, pero emite una señal de fluorescencia por encima del fondo tras la hibridación con su secuencia diana en ausencia de sonda de desactivación unida, en el que, si tanto la sonda de señalización como la sonda de desactivación se hibridan a sus secuencias de ácido nucleico diana adyacentes, el desactivador no fluorescente de la sonda de desactivación desactiva la señal de la sonda de señalización. En algunas realizaciones, la temperatura de fusión de la sonda de señalización de un conjunto de sondas es superior a la temperatura de fusión de la sonda de desactivación asociada. En algunas realizaciones, el colorante emisor de fluorescencia y dichos desactivadores no fluorescentes de cada conjunto de sondas son capaces de interactuar mediante FRET. En algunas realizaciones, cada conjunto de sondas es distinguible de forma detectable del resto de conjuntos de sondas de dicho kit de reactivos de detección por (1) la temperatura de fusión, (2) la longitud de onda de emisión de dicho colorante emisor de fluorescencia o (3) una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, los reactivos de detección comprenden 5 o más conjuntos de sondas. En algunas realizaciones, los reactivos de detección comprenden 10 o más conjuntos de sondas. En algunas realizaciones, se usa un conjunto de sondas para diferenciar entre micobacterias de diferente patogenicidad, especie o resistencia a los antibióticos. En algunas realizaciones, los cebadores se proporcionan en la proporción adecuada para la amplificación mediante LATE-PCR. En algunas realizaciones, las sondas de al menos un conjunto de sondas distinguible de forma detectable tienen temperaturas de fusión con sus secuencias de ácidos nucleicos diana inferiores a la temperatura de hibridación de al menos un cebador de la reacción de amplificación. En algunas realizaciones, los kits de reactivos comprenden uno o más conjuntos de sondas distinguibles de forma detectable que están configurados para hibridarse con una región de ácido nucleico de micobacterias para diferenciar entre NTM y MTBC. En algunas realizaciones, los kits de reactivos comprenden uno o más conjuntos de sondas distinguibles de forma detectable configurados para hibridarse con una región de ácido nucleico de micobacterias para diferenciar entre diferentes especies de MTBC. En algunas realizaciones, los kits de reactivos comprenden tres o más conjuntos de sondas distinguibles de forma detectable configurados para hibridarse con una región de ácido nucleico de micobacterias para diferenciar entre micobacterias resistentes a la rifampicina y micobacterias sensibles a la rifampicina. En algunas realizaciones, los kits de reactivos comprenden uno o más conjuntos de sondas distinguibles de forma detectable configurados para hibridarse con una región de ácido nucleico de micobacterias para diferenciar entre micobacterias resistentes al etambutol resistente y micobacterias sensibles al etambutol. En algunas realizaciones, los kits de reactivos comprenden uno o más conjuntos de sondas distinguibles de forma detectable configurados para hibridarse con una región de ácido nucleico de micobacterias para diferenciar entre micobacterias resistentes a la fluoroquinolona y micobacterias sensibles a la fluoroquinolona. En algunas realizaciones, los kits de reactivos comprenden cebadores y sondas configurados para: diferenciar entre NTM y MTBC; (b) diferenciar entre diferentes especies de MTBC; (c) diferenciar entre micobacterias resistentes a la isoniazida y micobacterias sensibles a la isoniazida; (d) diferenciar entre micobacterias resistentes a la fluoroquinolona y micobacterias y sensibles a la fluoroquinolona; (e) diferenciar entre micobacterias resistentes al etambutol y micobacterias sensibles al etambutol; y/o (f) diferenciar entre micobacterias resistentes a la rifampicina y micobacterias sensibles a la rifampicina. En algunas realizaciones, los kits de reactivos comprenden uno o más oligonucleótidos adicionales. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos adicionales están configurados para suprimir errores de cebado durante las reacciones de amplificación. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos adicionales están configurados para interrumpir elementos estructurales dentro de las secuencias de ácido nucleico diana durante las reacciones de amplificación o durante el sondeo de las secuencias amplificadas.

En algunas realizaciones, los kits de reactivos pueden comprender conjuntos de sondas, cebadores, reactivos de amplificación (por ejemplo, tampón de amplificación, ADN polimerasa, reactivos de control (por ejemplo, controles positivos y negativos) o cualquier otro componente que sea útil, necesario o suficiente para la práctica de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, así como las instrucciones, software de análisis (por ejemplo, que facilita la recogida, análisis, visualización y presentación de datos), dispositivos informáticos, instrumentos, u otros sistemas o componentes.

En algunas realizaciones, en el presente documento, se proporciona un procedimiento de ensayo homogéneo para el análisis de al menos una secuencia de ácido nucleico monocatenaria diana de micobacteria en una muestra, que comprende: (a) proporcionar una muestra que comprenda al menos una secuencia de ácido nucleico diana de micobacteria en forma monocatenaria y, para cada secuencia de ácido nucleico diana, al menos un conjunto distinguible de forma detectable de dos sondas de hibridación que interactúan, cada una de las cuales se hibrida con la al menos una diana, que comprende: (i) una sonda de desactivación marcada con un desactivador no fluorescente

y (ii) una sonda de señalización que, tras la hibridación con la al menos una secuencia diana de la muestra en ausencia de la sonda de desactivación, emite una señal por encima del fondo, de manera que, si ambas sondas se hibridan a la al menos una secuencia diana, el desactivador no fluorescente de la sonda de desactivación desactiva la señal de la sonda de señalización; y (b) analizar la hibridación de las sondas de señalización y de desactivación a la al menos una secuencia diana de micobacteria en función de la temperatura, incluyendo el análisis un efecto en cada sonda de señalización debido a su sonda de desactivación asociada, incluyendo, pero sin limitación, el análisis del aumento de la señal, la reducción de la señal, o ambos, de cada sonda de señalización.

En algunas realizaciones, las sondas de señalización comprenden fluoróforos desactivados. En algunas realizaciones, la temperatura de fusión de la sonda de señalización de un conjunto de sondas es superior a la temperatura de fusión de una sonda de desactivación asociada.

En algunas realizaciones, los procedimientos proporcionados en el presente documento se realizan en un solo recipiente de reacción. En algunas realizaciones, los procedimientos proporcionados en el presente documento se realizan en un ensayo de detección de un solo recipiente (por ejemplo, tubo, pocillo, etc.) para identificar qué secuencia o secuencias diana de ácido nucleico de micobacteria de un grupo de múltiples secuencias diana posibles está o están presentes en una muestra. En algunas realizaciones, el grupo de múltiples secuencias diana comprende una secuencia variable flanqueada por secuencias conservadas o al menos relativamente conservadas. En algunas realizaciones, se genera una muestra de secuencia diana en forma monocatenaria mediante un procedimiento de amplificación que genera amplicones monotaneros, por ejemplo, un procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa no simétrica (PCR), más preferentemente de LATE-PCR. En algunas realizaciones, solo se usan unos cuantos pares de cebadores, por lo general, no más de tres pares, preferentemente no más de dos pares y más preferentemente solo un único par de cebadores que se hibridan con las secuencias flanqueantes. En algunas realizaciones, los cebadores y al menos un conjunto de sondas de señalización y de desactivación (por ejemplo, dos conjuntos, tres conjuntos, etc.) se incluyen en la mezcla de reacción de amplificación.

En algunas realizaciones, los conjuntos de sondas (por ejemplo, sondas de señalización y de desactivación) están configurados para hibridarse con la secuencia variable de micobacteria y para diferenciar entre múltiples secuencias diana de micobacterias (por ejemplo, en una sola muestra o mezcla). En algunas realizaciones, las sondas se hibridan con diferentes Tf a las secuencias variables de las diferentes secuencias diana. En alguna realización, una o ambas sondas de un conjunto de sondas (por ejemplo, sondas de señalización y de desactivación) comprenden diferentes grados de complementariedad con las regiones variables de las diferentes secuencias diana. En algunas realizaciones, una sonda de señalización y/o una sonda de desactivación están configuradas para hibridarse con la secuencia variable (por ejemplo, solapando la diferencia real entre las secuencias) de múltiples secuencias diana (por ejemplo, con diferente Tf a las diferentes secuencias diana). En algunas realizaciones, una sonda de señalización está configurada para hibridarse con la secuencia variable de múltiples secuencias diana (por ejemplo, con diferente Tf a las diferentes secuencias diana). En algunas realizaciones, una sonda de desactivación está configurada para hibridarse con la secuencia variable de múltiples secuencias diana (por ejemplo, con diferente Tf a las diferentes secuencias diana).

En algunas realizaciones, se proporcionan cebadores y sondas para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento. En algunas realizaciones, los cebadores proporcionados en el presente documento incluyen: SEQ ID NO: 28, 29, 39, 40, 45, 46, 51, 52, 57, 58, 67, 68, 71, 72, 73, 74, partes de los mismos y secuencias complementarias a las mismas. En algunas realizaciones, los cebadores proporcionados en el presente documento incluyen oligonucleótidos con un 70 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 28, 29, 39, 40, 45, 46, 51, 52, 57, 58, 67, 68, 71, 72, 73 o 74 (por ejemplo, un oligonucleótido con 70 % ... 75 %... 80 %... 90 %... 95 %... 98 %... 99 % de identidad de secuencia), partes de las mismas y secuencias complementarias a las mismas. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona cebadores que funcionan de manera esencialmente similar a los cebadores proporcionados en el presente documento. En algunas realizaciones, las sondas proporcionadas en el presente documento incluyen: SEQ ID NO: 30, 31, 32, 33, 34, 35, 41, 42, 47, 48, 53, 54, 59, 60, 61, 62, 69, 70, partes de las mismas y secuencias complementarias a las mismas. En algunas realizaciones, las sondas proporcionadas en el presente documento incluyen oligonucleótidos con un 70 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 30, 31, 32, 33, 34, 35, 41, 42, 47, 48, 53, 54, 59, 60, 61, 62, 69, 70, partes de las mismas y secuencias complementarias a las mismas. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona sondas que funcionan de manera esencialmente similar a las sondas proporcionadas en el presente documento. En algunas realizaciones, las secuencias diana para los cebadores y las sondas proporcionadas en el presente documento comprenden: SEQ ID NO: 36, 37, 38, 43, 44, 49, 50, 55, 56, 63, 64, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, partes de las mismas y secuencias complementarias a las mismas. En algunas realizaciones, las secuencias diana comprenden regiones de ácido nucleico de micobacterias que comprenden regiones conservadas que flanquean una región variable de los genes o promotores de: rpoB, embB, mabA, ahpC, katG, gyrA, ARNr 16S y gyrB. En algunas realizaciones, los cebadores y las sondas se hibridan con dianas en micobacterias que incluyen, pero sin limitación: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. intracellulare*, *M. microti*, *M. bovis*, *M. Chelonae*, *M. Asiaticum*, *M. Avium*, *M. fortuitum*. En algunas realizaciones, las composiciones, los procedimientos y los kits proporcionados en el presente documento encuentran uso en la identificación y en la diferenciación de especies que incluyen: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. intracellulare*, *M. microti*, *M. bovis*, *M.*

*Chelonae, M. Asiaticum, M. Avium, M. fortuitum.*

En algunas realizaciones, los procedimientos de sondeo y de análisis proporcionados en el presente documento, se aplican a muestras que contienen secuencias diana de ácido nucleico monocatenarias de micobacteria. Los procedimientos incluyen el análisis de una sola secuencia, el análisis de dos o más secuencias de la misma cadena, el análisis de secuencias en diferentes cadenas y combinaciones de los anteriores. Una secuencia diana de ácido nucleico monocatenaria puede ser una secuencia de control añadida a una muestra. Una secuencia diana de ácido nucleico puede ser ADN, ARN o una mezcla de ADN y ARN. Puede proceder de cualquier fuente. Por ejemplo, se puede producir de forma natural o la secuencia diana se puede producir en forma bicatenaria, en cuyo caso la secuencia diana monocatenaria se obtiene mediante la separación de las cadenas y la purificación. Si la secuencia diana de ácido nucleico monocatenaria es una secuencia de ADNc, se obtiene de una fuente de ARN mediante transcripción inversa.

En muchos casos, una fuente natural no contendrá una secuencia diana con el suficiente número de copias para el sondeo y el análisis. En dichos casos, la secuencia diana monocatenaria se obtiene por amplificación, en general, un procedimiento de amplificación que incluye la amplificación exponencial. En algunas realizaciones, una reacción de amplificación genera la secuencia diana de ácido nucleico monocatenaria directamente. En algunas realizaciones, una reacción de amplificación genera la secuencia diana en forma bicatenaria, en cuyo caso la secuencia diana monocatenaria se obtiene mediante la separación de las cadenas y la purificación. Los procedimientos de amplificación útiles que se pueden emplear incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), incluyendo la PCR simétrica, PCR asimétrica y LATE-PCR, pudiéndose combinar cualquiera de ellas con la transcripción inversa para amplificar secuencias de ARN, NASBA, SDA, TMA y amplificación en círculo rodante. Si la secuencia diana de ácido nucleico monocatenaria es una secuencia de ADNc, el procedimiento de amplificación incluirá la transcripción inversa, por ejemplo, RT-PCR. En algunas realizaciones, cuando se utiliza la amplificación no simétrica (por ejemplo, LATE-PCR), los conjuntos de sondas se incluyen en la mezcla de reacción de amplificación antes de la amplificación para evitar la contaminación.

En algunas realizaciones, los conjuntos de sondas útiles en los procedimientos proporcionados en el presente documento incluyen una sonda de señalización y una sonda de desactivación asociada. La sonda de señalización es una sonda de hibridación que emite una señal detectable, preferentemente una señal fluorescente, cuando se hibrida con una secuencia diana de ácido nucleico monocatenaria en una muestra, siendo la señal desactivable mediante la sonda de desactivación asociada. La sonda de desactivación no emite energía de luz visible. En general, una sonda de señalización tiene una fracción fluorescente unida covalentemente. Las sondas de señalización incluyen sondas marcadas con fluoróforos u otras fracciones fluorescentes, por ejemplo, puntos cuánticos. En algunas realizaciones, se prefieren sondas marcadas con fluoróforo. Un tipo de sonda de señalización es una sonda ResonSense®. Una sonda ResonSense® es un oligonucleótido monocatenario marcado con un fluoróforo que acepta la fluorescencia de un colorante de ADN y vuelve a emitir luz visible a una longitud de onda más larga. El uso de una sonda ResonSense® implica el uso de un colorante de ADN bicatenario, una molécula que se vuelve fluorescente cuando se asocia con ADN bicatenario que, en este caso, es el híbrido formado cuando la sonda se hibrida con la secuencia diana de ácido nucleico monocatenaria. Para el uso de una sonda ResonSense®, se incluye un colorante de ADN, por ejemplo, SYBR Green o SYBR Gold, en la muestra que contiene la secuencia diana de ácido nucleico monocatenaria junto con el conjunto o los conjuntos de sondas. El análisis incluye excitar el colorante y detectar la emisión de la sonda o sondas ResonSense®. No es preciso eliminar las sondas de señalización no unidas, porque no se excitan directamente y siguen siendo monocatenarias. En algunas realizaciones, las sondas de señalización preferidas son sondas desactivadas; es decir, sondas que emiten poca o ninguna señal cuando están en solución, aunque se estimulen, pero están desactivadas y, por tanto, emiten una señal cuando se hibridan con una secuencia de ácido nucleico monocatenaria en una muestra que se esté analizando. Las sondas de Yin-Yang son sondas de señalización desactivadas. Una sonda de Yin-Yang es una sonda bicatenaria que contiene un fluoróforo en una cadena y un desactivador no fluorescente que interacciona en la otra cadena, que es una cadena más corta. Cuando una sonda de Yin-Yang está en solución a la temperatura de detección, el fluoróforo se desactiva. La secuencia diana de ácido nucleico monocatenaria supera a la cadena marcada con desactivador en la unión a la cadena marcada con fluoróforo. Por consiguiente, la cadena marcada con fluoróforo se hibrida con la secuencia diana de ácido nucleico monocatenaria y señala. Las sondas de señalización para algunas realizaciones proporcionadas en el presente documento son sondas de baliza molecular, oligonucleótidos monocatenarios en forma de horquilla que portan un agente fluorescente, normalmente un fluoróforo, en un extremo, y un desactivador, normalmente un cromóforo no fluorescente, en el otro extremo. En algunas realizaciones, en el presente documento, se proporcionan oligonucleótidos monocatenarios con cualquier tipo adecuado de estructura secundaria, que porta un colorante emisor de fluorescencia en un extremo y un desactivador en el otro extremo (sondas de tipo baliza molecular). Las diversas sondas de señalización para su uso en las realizaciones del presente documento comprenden diversos grados de estructura secundaria (por ejemplo, diferentes longitudes de horquilla (por ejemplo, 2 pares de bases, 3 pares de bases, 4 pares de bases, 5 pares de bases, etc.). Cuando las sondas de baliza molecular, y otros tipos similares de sondas, están en solución, adoptan una configuración en la que el desactivador interactúa con el agente fluorescente, y la sonda está oscura (por ejemplo, la configuración de horquilla, la configuración cerrada). Cuando la sonda se hibrida con su diana, sin embargo, se ve forzada a una configuración abierta en la que el agente fluorescente se separa del desactivador y la sonda señala.

En las sondas de señalización desactivadas, la desactivación se puede realizar mediante cualquier mecanismo, normalmente mediante FRET (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia) entre un fluoróforo y una fracción de desactivación no fluorescente, o mediante desactivación de contacto. En algunas realizaciones, las sondas de señalización preferidas están oscuras o casi oscuras en solución para reducir al mínimo la fluorescencia de fondo. En general, la desactivación de contacto alcanza este objetivo, aunque la desactivación mediante FRET es adecuada con algunas combinaciones de fluoróforo-desactivador y construcciones de sonda.

La sonda de desactivación de un conjunto de sondas consiste en una cadena de ácido nucleico que comprende un desactivador no fluorescente. En algunas realizaciones, el desactivador es, por ejemplo, un cromóforo no fluorescente tal como un DABCYL o un desactivador Black Hole (los desactivadores Black Hole, disponibles en Biosearch Technologies, son un conjunto de desactivadores, estando uno u otro recomendado por el fabricante para su uso con un fluoróforo en particular). En algunas realizaciones, las sondas de desactivación preferidas incluyen un cromóforo no fluorescente. En algunas realizaciones, los desactivadores son desactivadores Black Hole. La sonda de desactivación de un conjunto se hibrida con la secuencia diana de ácido nucleico monocatenaria adyacente o cercana a la sonda de señalización, de modo que cuando ambas se hibridan, la sonda de desactivación desactiva, u oscurece, la sonda de señalización. La desactivación puede ser mediante transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) o mediante contacto ("desactivación colisional" o "desactivación de contacto").

La FIG. 1 representa una realización que ilustra el funcionamiento del conjunto de sondas en los procedimientos analíticos proporcionados en el presente documento. En dicha realización, hay dos conjuntos de sondas, las sondas 2 y 4, y las sondas 6 y 8. La sonda 2 es una sonda de señalización, una sonda de tipo baliza molecular que porta el fluoróforo 3. La sonda 6 también es una sonda de señalización, una sonda de tipo baliza molecular que porta el fluoróforo 7. Los fluoróforos 3 y 7 son iguales. Las sondas 4 y 8 son sondas de desactivación solo marcadas con los desactivadores Black Hole 5 y 9, respectivamente. Las temperaturas de fusión (Tf) de los híbridos de sonda-diana (sondas hibridadas con la secuencia diana de ácido nucleico monocatenaria 1) son las siguientes: Tf de la sonda 2 > Tf de la sonda 4 > Tf de la sonda 6 > Tf de la sonda 8. A medida que la temperatura de la muestra se reduce desde una temperatura alta a la que no hay sondas unidas, las sondas de 2, 4, 6 y 8 se unen a la secuencia diana de ácido nucleico monocatenaria 1 de acuerdo con sus características de hibridación. Primero se une la sonda 2, una sonda de señalización. La FIG. 1, panel A, representa la sonda 2 hibridada con la secuencia 1. Cuando la temperatura de la muestra sigue siendo baja, la siguiente en unirse es la sonda de desactivación 4, adyacente a la sonda 2, de manera que el desactivador 5 y el fluoróforo 3 están cerca o se tocan. La FIG. 1, panel B, representa la sonda 4 hibridada con una secuencia diana de ácido nucleico monocatenaria 1 adyacente a la sonda 2. En este momento, la sonda 2 está oscura o al menos casi oscura. Sin embargo, si la sonda de señalización 6 ha empezado a unirse, emitirá fluorescencia independientemente de las sondas 2 y 4. La FIG. 1, Panel C, representa la sonda 6 hibridada con la secuencia diana monocatenaria 1 adyacente a la sonda 4. Finalmente, cuando la temperatura sigue siendo baja, la sonda 8 se unirá, y su desactivador 9 apagará la emisión de fluorescencia del fluoróforo 7 de la sonda 6. La FIG. 1, Panel D, representa la sonda 8 hibridada adyacente a la sonda 6. El análisis por hibridación se muestra en la FIG. 1, Panel E, que representa el aumento y la reducción de la fluorescencia de los fluoróforos 3 y 7 en función de la temperatura. Dichas curvas se pueden obtener como curvas de hibridación a medida que disminuye la temperatura, o se pueden obtener como curvas de fusión a medida que aumenta la temperatura. A medida que la temperatura de la muestra se reduce desde 70 °C, la curva de fluorescencia 10 del panel E primero se eleva cuando la sonda 2 se hibrida con la secuencia de ácido nucleico monocatenario 1, a continuación, disminuye cuando la sonda 4 se une, luego, aumenta de nuevo cuando la sonda 6 se hibrida, y finalmente, disminuye hasta un nivel muy bajo cuando la sonda 8 se hibrida. Se puede deducir de la curva 10 que cada sonda de señalización tiene una Tf superior a su sonda de desactivación asociada.

Las sondas de señalización y de desactivación útiles en los procedimientos proporcionados en el presente documento normalmente son tolerantes a los desapareamientos (capaces de hibridarse a las secuencias diana de ácido nucleico monocatenarias que contienen uno o más nucleótidos desapareados, o deleciones o adiciones). En algunas realizaciones, las micobacterias se diferencian en los distintivos únicos de fluorescencia dependientes de la temperatura, generados por el desapareamiento entre sondas y secuencias diana. En algunas realizaciones, las sondas pueden ser específicas del alelo (capaces de hibridarse solo con una secuencia diana de ácido nucleico monocatenaria perfectamente complementaria en el procedimiento). En algunas realizaciones, una sonda de un conjunto puede ser específica del alelo; y la otra sonda, puede ser tolerante al desapareamiento. Los experimentos realizados durante el desarrollo de las realizaciones proporcionadas en el presente documento demostraron que la estructura secundaria de una cadena diana fuera de las secuencias a las que se hibridan las sondas puede afectar a los resultados del análisis de hibridación o de fusión. Por consiguiente, en algunas realizaciones, no todos los nucleótidos de una secuencia diana de ácido nucleico han de hibridarse con una sonda. Por ejemplo, si la secuencia diana contiene una horquilla, la sonda correspondiente, en algunos casos, se puede diseñar para hibridarse a través de la base de la horquilla, excluyendo la secuencia de horquilla. En realizaciones preferidas, tanto la sonda de señalización como la sonda de desactivación de un conjunto de sondas son tolerantes a los desapareamientos. En algunas realizaciones, un conjunto de sondas puede incluir una sonda de señalización específica del alelo y una sonda de desactivación específica del alelo, una sonda de señalización tolerante al desapareamiento y una sonda de desactivación tolerante al desapareamiento, una sonda de señalización específica del alelo y una sonda de desactivación tolerante al desapareamiento o una sonda de señalización tolerante al desapareamiento y una sonda de desactivación específica del alelo. Una sonda tolerante al desapareamiento puede ser perfectamente

complementaria a una variante de una secuencia diana variable, o puede ser una sonda de consenso que no sea perfectamente complementaria a ninguna variante. Los conjuntos de múltiples sondas pueden incluir combinaciones de conjuntos de cualquiera de los tipos anteriores. Además, los procedimientos analíticos proporcionados en el presente documento pueden utilizar uno o más conjuntos de sondas de señalización/desactivación en combinación con una o más sondas convencionales que señalizan tras la hibridación con su diana, por ejemplo, sondas de baliza molecular.

En algunas realizaciones, los oligonucleótidos no marcados se configuran para unirse a las regiones en o cerca de las secuencias diana para los cebadores, las sondas de señalización o sondas de desactivación. En algunas realizaciones, estas sondas silenciosas interrumpen la estructura secundaria de dentro de o cerca de las secuencias diana y ayudan a otras sondas en la unión a las secuencias diana a  $T_f$  adecuada para el análisis posterior. En algunas realizaciones, se proporcionan oligonucleótidos no marcados que sirven como "abridores" de elementos estructurales (por ejemplo, elementos estructurales secundarios).

Las sondas útiles en los procedimientos proporcionados en el presente documento pueden ser ADN, ARN o una combinación de ADN y ARN. Pueden incluir nucleótidos no naturales, por ejemplo, PNA, LNA o 2'-o-metil-ribonucleótidos. Pueden incluir enlaces internucleotídicos no naturales, por ejemplo, enlaces de fosforotioato. La longitud de una determinada sonda depende de su temperatura de fusión deseada ( $T_f$ ), ya sea específica del alelo o tolerante al apareamiento, y de su composición, por ejemplo, del contenido de GC de una sonda de ADN.

En algunas realizaciones, cada sonda de señalización tiene una sonda de desactivación separada asociada a ella. En algunas realizaciones, sin embargo, una sonda puede ser una parte de dos conjuntos de sondas. Por ejemplo, una sonda de desactivación puede marcarse con un desactivador en cada extremo, mediante lo que los extremos interactúan con diferentes sondas de señalización, en cuyo caso tres sondas comprenden dos conjuntos de sondas. Además, algunas realizaciones pueden utilizar ambos extremos de una sonda de señalización desactivada, por ejemplo, una sonda de señalización de baliza molecular que tiene un fluoróforo en un extremo y un desactivador en el otro extremo. El fluoróforo interactúa con una sonda de desactivación, que comprende un conjunto, y el desactivador interactúa con una sonda de señalización, que comprende otro conjunto.

Para el análisis de una muestra que contiene uno o más tipos de micobacterias o se sospecha que contiene uno o más tipos de micobacterias, los conjuntos de sondas que se usan son distinguibles de forma detectable, por ejemplo, por la longitud de onda de emisión (color) o la temperatura de fusión ( $T_f$ ). La fabricación de un conjunto de sondas distinguible por la  $T_f$  de otros conjuntos de sondas se realiza de cualquier modo adecuado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, todas las sondas de señalización de un ensayo tienen diferentes  $T_f$ . Como alternativa, en algunas realizaciones, todas las sondas de señalización tienen la misma  $T_f$ , pero las sondas de desactivación tienen diferentes  $T_f$ . En algunas realizaciones, los conjuntos de sondas se distinguen por una combinación de la  $T_f$  de la sonda de señalización y la  $T_f$  de la sonda de desactivación. Los detectores de fluorescencia pueden resolver proporcionado de 1 a 10 fluoróforos de diferentes colores. Por lo tanto, los ensayos que utilizan el procedimiento proporcionado en el presente documento pueden hacer uso de hasta 10 fluoróforos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más si los detectores de la fluorescencia lo permiten). El mismo emisor de fluorescencia, por ejemplo, el mismo fluoróforo, se puede usar en más de una sonda de señalización para una muestra, si las sonda de señalización se pueden diferenciar para la detección por sus temperaturas de fusión. En los ensayos proporcionados en el presente documento, las  $T_f$  se deben separar en al menos 2 °C, preferentemente en al menos 5 °C y, en ciertas realizaciones, en el menos 10 °C. El espacio disponible para la temperatura se limita al uso de múltiples sondas de señalización que tienen el mismo fluoróforo. Si se diseña un ensayo para el análisis de hibridación y/o de fusión en un intervalo de 80 °C a 20 °C, por ejemplo, se pueden utilizar más conjuntos de sondas que compartan un color de lo que se pueden usar en un ensayo diseñado para dicho análisis en un intervalo de 70 °C a 40 °C, para el que solo se pueden usar de 3 a 5 conjuntos de sondas que comparten un color. Usando cuatro colores y solo dos conjuntos de sondas que comparten cada color, un detector de cuatro colores se vuelve equivalente a un detector de ocho colores usado con ocho sondas distinguibles solo por el color. Usando tres conjuntos de sondas que comparten cada uno de los cuatro colores, se vuelven distinguibles doce conjuntos de sondas diferentes.

En algunas realizaciones, se prefiere que las sondas de desactivación tengan  $T_f$  inferiores a las de sus sondas de señalización asociadas. Con esta relación, la sonda de señalización emite una señal dependiente de la temperatura a lo largo del intervalo de temperaturas de hibridación de ambas sondas del conjunto a medida que la temperatura de la solución disminuye durante un análisis de la curva de hibridación, y a lo largo del intervalo de temperaturas de fusión de ambas sondas del conjunto a medida que aumenta la temperatura de la solución durante un análisis de la curva de fusión. Si, por otra parte, la sonda de desactivación de un conjunto de sondas tiene una  $T_f$  superior a la de su sonda de señalización asociada, la emisión de la sonda de señalización se desactiva a lo largo del intervalo de temperaturas de hibridación y el intervalo de temperaturas de fusión de ambas sondas del conjunto, y no se emite señal fluorescente para la detección. Esto se puede discernir mediante el examen de la curva de hibridación o la curva de fusión. La ausencia de señal proporciona menos información acerca de la secuencia diana de ácido nucleico monocatenaria de la que proporciona una curva de fluorescencia de la sonda en función de la temperatura. En algunas realizaciones, cuando se usan sondas tolerantes al apareamiento para el análisis de una secuencia variable, se usan sondas de desactivación con  $T_f$  inferiores a las de sus sondas de señalización asociadas con respecto a todas o a todas menos una de las variantes de la secuencia diana. Si una sonda de desactivación tiene una  $T_f$  superior frente a solo una variante, el fallo de la señal revelará esta variante, siempre que el fallo de la

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

Temperatura de fusión,  $T_f$ , significa la temperatura a la que un híbrido de ácido nucleico, por ejemplo, un híbrido de sonda-diana o un híbrido de cebador-diana, es un 50 % bicatenario y un 50 % monocatenario. Para un determinado ensayo, se puede medir la  $T_f$  relevante. La  $T_f$  también se puede calcular utilizando técnicas conocidas. En algunas realizaciones, las técnicas preferidas se basan en el procedimiento del "vecino más próximo" (Santa Lucia, J. (1998), PNAS (EE.UU.) 95: 1460-1465; y Allawi, H. T. y Santa Lucia, J. (1997), *Biochem.* 36: 10581-10594).

Los documentos WO200407447 A2 y EP2116614A1 describen procedimientos de amplificación y detección de secuencias diana de una manera dependiente de la temperatura usando sondas marcadas que interaccionan. Los programas informáticos que utilizan la fórmula del "vecino más próximo" están disponibles para su uso en el cálculo de las  $T_f$  de la sonda y del cebador frente a sus secuencias diana perfectamente complementarias y frente a las secuencias diana con desapareamiento. En la presente solicitud, la  $T_f$  de un cebador o sonda se proporciona algunas veces con respecto a una secuencia a la que se hibrida. Sin embargo, si no se proporciona dicha secuencia, para las sondas tolerantes al desapareamiento que son perfectamente complementarias a una variante de una secuencia diana de ácido nucleico monocatenaria, la  $T_f$  es la  $T_f$  frente a la variante perfectamente complementaria. En muchas realizaciones, existirá una secuencia diana que sea perfectamente complementaria a la sonda. Sin embargo, los procedimientos pueden utilizar uno o más cebadores o sondas tolerantes al desapareamiento que sean "cebadores consenso" o "sondas consenso". Un cebador o una sonda consenso es un cebador o una sonda que no es complementario a ninguna secuencia diana variante o, si no se conocen todas las posibles secuencias diana, para cualquier secuencia esperada o conocida. Un cebador consenso es útil para cebar múltiples variantes de una secuencia diana a una temperatura de hibridación de la amplificación seleccionada. Una sonda consenso es útil para encoger el espacio de temperatura necesario para el análisis de múltiples variantes. Para una sonda o un cebador consenso, si no se proporciona la secuencia diana correspondiente, la  $T_f$  se refiere a la  $T_f$  más elevada frente a las variantes conocidas, lo que permite la posibilidad de que una variante desconocida puede ser más complementaria al cebador o a la sonda y, por tanto, tiene una  $T_f$  de cebador-diana o  $T_f$  de sonda-diana superior.

Los ensayos proporcionados en el presente documento pueden utilizar concentraciones de sondas que son superiores o inferiores a la concentración del ácido nucleico diana. Las concentraciones de las sondas se conocen basándose en la información proporcionada por el fabricante de la sonda. En el caso de las secuencias diana que no están amplificadas, las concentraciones diana se conocen basándose en el recuento directo o indirecto del número de células, núcleos, cromosomas o moléculas que están presentes en la muestra, así como conociendo el número esperado de secuencias diana que están presentes normalmente por célula, núcleo, cromosoma o molécula. En el caso de las secuencias diana que están amplificadas, existe una serie de maneras de establecer cómo se han generado muchas copias de una secuencia diana en el curso de una reacción de amplificación. Por ejemplo, en el caso de una reacción de amplificación de LATE-PCR, el número de amplicones monocatenarios se puede calcular de la siguiente manera: usando una sonda de señalización sin un desactivador (en el caso de una sonda de señalización desactivada, lo que significa la sonda menos el desactivador) a una concentración limitante tal como de 50 nM y su correspondiente sonda de desactivación en una cantidad en exceso tal como 150 nM, el número de ciclos que se requieren para disminuir la fluorescencia a cero (o, en términos prácticos, a su nivel de fondo mínimo) es proporcional a la velocidad de amplificación de los amplicones monocatenarios. Cuando la fluorescencia alcanza el cero (nivel de fondo mínimo), todas las sondas de señalización han alcanzado sus dianas, y la concentración de los amplicones supera la de la sonda de señalización. En determinadas realizaciones puede continuarse una reacción de amplificación hasta que el amplicón que se ha producido alcanza una "concentración terminal". Los experimentos realizados durante el desarrollo de las realizaciones proporcionadas en el presente documento han demostrado que una amplificación por LATE-PCR iniciada con diferentes cantidades de dianas tiende a producir finalmente la misma concentración máxima de amplicón (la "concentración terminal"), incluso aunque la amplificación comience con un elevada cantidad inicial de diana, se alcanza este máximo en menos ciclos que cuando la amplificación comienza con una baja cantidad inicial de diana. Conseguir que la concentración terminal comience con una cantidad baja de diana puede requerir prolongar la amplificación a lo largo de 70 o incluso 80 ciclos.

Algunas realizaciones utilizan conjuntos de sondas en los que la concentración de la sonda de señalización es inferior a la concentración de su sonda de desactivación asociada. Esto garantiza que, cuando ambas sondas se hibridan a su al menos una secuencia diana de ácido nucleico, la sonda de señalización se desactiva hasta el mayor grado posible, reduciendo al mínimo así la fluorescencia de fondo. Se apreciará que la fluorescencia de fondo en un ensayo es el fondo acumulado de cada sonda de señalización de un color dado y que las sondas de diferente color pueden contribuir más a la señal de fondo.

Los procedimientos proporcionados en el presente documento incluyen analizar la hibridación de los conjuntos de sondas con las secuencias diana de ácido nucleico de micobacteria monocatenarias. En los procedimientos proporcionados en el presente documento, se analiza la hibridación de las sondas de señalización y de las sondas

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

En algunas realizaciones, las lecturas de fluorescencia usando un determinado conjunto de sondas en un intervalo de temperaturas generan un distintivo de fluorescencia dependiente de la temperatura. Un distintivo de fluorescencia dependiente de la temperatura puede comprender curvas, puntos de datos, picos u otros medios de visualización y/o de análisis de un ensayo o de una muestra. En algunas realizaciones, el análisis de los distintivos de fluorescencia dependiente de la temperatura identifica y/o diferencia micobacterias. En algunas realizaciones, el análisis es realizado por un usuario. En algunas realizaciones, el análisis se realiza mediante el software de análisis en un ordenador u otro dispositivo.

En algunas realizaciones, los procedimientos proporcionados en el presente documento incluyen la amplificación del ácido nucleico. Algunos procedimientos preferidos son aquellos que generan la secuencia o secuencias diana en forma monocatenaria. En algunas realizaciones, se prefiere en especial la amplificación por LATE-PCR de secuencias de ADN o secuencias de ARN (RT-LATE-PCR). Por ejemplo, en la patente europea EP 1.468.114 y la patente correspondiente de los Estados Unidos 7.198.897; la solicitud de patente europea publicada EP 1805199 A2; Sanchez y col., (2004) *Proc. Nat. Acad. Sci.* (EE.UU.) 101: 1933-1938; y Pierce y col. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci.* (EE.UU.) 102: 8609-8614, se describen amplificaciones y análisis de amplificación por LATE-PCR. La LATE-PCR es un procedimiento de amplificación del ADN no simétrico que emplea el procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando un cebador de oligonucleótido (el "cebador en exceso") en un exceso de al menos cinco veces con respecto al otro cebador (el "cebador limitante"), que se utiliza a baja concentración, de hasta 200 nM, de manera que se agota en ciclos de PCR apenas suficientes para producir un amplicón bicatenario detectable de manera fluorescente. Una vez agotado el cebador limitante, la amplificación continúa durante un número deseado de ciclos para producir un producto monocatenario usando solo el cebador en exceso, denominado en el presente documento cadena del cebador en exceso. La LATE-PCR tiene en cuenta la temperatura de fusión ajustada a la concentración del cebador limitante al inicio de la amplificación,  $T_{f_{[0]L}}$ , la temperatura de fusión ajustada a la concentración del cebador en exceso al inicio de la amplificación,  $T_{f_{[0]X}}$ , y la temperatura de fusión del producto de amplificación monocatenario ("amplicón"),  $T_{f_A}$ . Para los cebadores de LATE-PCR,  $T_{f_{[0]}}$  se puede determinar empíricamente, según sea necesario cuando se usan nucleótidos no naturales, o calcularse de acuerdo con el procedimiento del "vecino más próximo" (Santa Lucia, J. (1998), *PNAS* (EE.UU.) 95: 1460-1465; y Allawi, H. T. y Santa Lucia, J. (1997), *Biochem.* 36:10581-10594) usando un ajuste de la concentración salina, que, en las presentes amplificaciones, es en general la concentración de cationes monovalentes 0,07 M. Para la LATE-PCR, la temperatura de fusión del amplicón se calcula utilizando la fórmula:  $T_f = 81,5 + 0,41 (\%G+\%C) - 500/L + 16,6 \log [M]/(1 + 0,7 [M])$ , donde L es la longitud en nucleótidos y [M] es la concentración molar de los cationes monovalentes. Las temperaturas de fusión de las sondas lineales o con superenrollamiento aleatorio se pueden calcular como para los cebadores. Las temperaturas de fusión de las sondas estructuradas, por ejemplo, de las sondas de baliza molecular, se pueden determinar empíricamente o se pueden aproximar como la  $T_f$  de la parte (el bucle o el bucle más una parte del tallo) que se hibrida al amplicón. En la reacción de amplificación por LATE-PCR,  $T_{f_{[0]L}}$  preferentemente no es superior a 5 °C por debajo de  $T_{f_{[0]X}}$ , más preferentemente es al menos tan alta, e incluso más preferentemente es 3-10 °C superior, y la  $T_{f_A}$  preferentemente no es superior a 25 °C más alta que  $T_{f_{[0]X}}$ , y para algunas realizaciones preferidas, preferentemente, no es superior a aproximadamente 18 °C más. La LATE-PCR es una amplificación de PCR no simétrica que, entre otras ventajas, proporciona un gran "espacio de temperatura" en el que pueden emprenderse acciones. Véase el documento WO 03/054233 y Sanchez y col. (2004), citados anteriormente. Determinadas realizaciones de las amplificaciones por LATE-PCR incluyen el uso de sondas de hibridación, en este caso, de conjuntos de sondas de señalización y de desactivación, cuyas  $T_f$  están por debajo, más preferentemente al menos 5 °C por debajo, de la temperatura de hibridación media del cebador durante la amplificación exponencial tras los primeros ciclos. Los conjuntos de sondas de señalización y de desactivación se incluyen en las mezclas de amplificación de LATE-PCR antes del inicio de la amplificación. También se puede incorporar un colorante de ADN, si se usa, a la mezcla de reacción antes del inicio de la amplificación.

En algunas realizaciones, las muestras que encuentran uso en la presente invención incluyen muestras clínicas, muestras de diagnóstico, muestras de investigación, muestras ambientales, etc. En algunas realizaciones, las muestras requieren un procesamiento mediante una o más técnicas conocidas en la materia antes de su uso en los procedimientos descritos en el presente documento.

## 5 **Breve descripción de las figuras**

- La FIG. 1, Paneles A-D, son esquemas que muestran la hibridación de dos conjuntos de sondas de señalización y de desactivación con una secuencia diana de ácido nucleico monocatenaria en una muestra en función de la temperatura; y la FIG. 1, Panel E, muestra la fluorescencia frente a la temperatura de la muestra.
- La FIG. 2 ilustra las posibles mutaciones neutras que pueden existir en la diana de gen *rpoB*.
- 10 La FIG. 3 ilustra mutaciones de resistencia a fármacos en la diana de gen *rpoB*. La FIG. 4 ilustra la relación filogenética de algunas especies de NTM y la especie de MTBC.
- La FIG. 5 ilustra la detección diana de punto final, usando cuatro, u opcionalmente, cinco colorantes en un intervalo de temperaturas.
- La FIG. 6A ilustra la ubicación de los conjuntos de sondas utilizados para el gen *rpoB* diana descrito en la Tabla 1. La FIG. 6B ilustra la ubicación de un grupo alternativo de conjuntos de sondas en el que la mayoría de las mutaciones dentro de la diana de gen *rpoB* caen por debajo de las sondas de desactivación.
- 15 Las FIG. 7A y 7B ilustran los distintivos fluorescentes de la diana del gen *rpoB* para los conjuntos de sondas 5A y 5B, respectivamente.
- La FIG. 8 ilustra la detección de amplificación de 1.000, 100 o 10 moléculas de la diana de *rpoB* en presencia de 10.000 genomas humanos.
- 20 La FIG. 9 es una representación esquemática de una secuencia de ácido nucleico monocatenaria del Ejemplo 1 que muestra las ubicaciones de unión de la sonda y las ubicaciones de unión al cebador.
- Las FIG. 10A y 10B presentan análisis de curvas de fusión de amplificaciones descritos en el Ejemplo 1 para varias cepas.
- 25 Las FIG. 11A-4D presentan curvas de fusión derivadas para mezclas de cepas de TB en diversas proporciones según lo descrito en el Ejemplo 2.
- La FIG. 12 es una representación esquemática de una secuencia de ácido nucleico monocatenaria del Ejemplo 3 que muestra las ubicaciones de unión de la sonda y las ubicaciones de unión al cebador.
- 30 La FIG. 13 es una representación esquemática de otra secuencia de ácido nucleico monocatenaria del Ejemplo 3 que muestra las ubicaciones de unión de la sonda y las ubicaciones de unión al cebador.
- La FIG. 14A-14C son gráficos de fluorescencia frente a la temperatura para cada uno de los fluoróforos de la muestra del Ejemplo 3.
- La FIG. 15 muestra las alineaciones de secuencia ilustrativas usadas en el cebador, la sonda y en el diseño de la secuencia diana.
- 35 La FIG. 16 muestra gráficos que muestran la diferenciación de las especies y la detección de la resistencia a los fármacos entre los miembros del género *Mycobacterium*.
- La FIG. 17 muestra gráficos que muestran la resistencia a múltiples fármacos y la identificación de especies de *M. tuberculosis* en una muestra mixta sin *Mycobacterium*.
- 40 La FIG. 18 muestra derivados de fusión media de: (A) conjunto de sondas de girasa B con miembros del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), (B) sondas 16s con especies de MTBC y NTM, (C) sondas de girasa B y 16s.

## **Descripción detallada**

En el presente documento, se proporcionan composiciones (por ejemplo, reactivos, mezclas de reacción, etc.), procedimientos (por ejemplo, de investigación, detección, diagnóstico) y sistemas (por ejemplo, kits, recogida y análisis de datos) para el análisis de micobacterias. En particular, en el presente documento, se proporcionan composiciones, procedimientos y sistemas que permiten la detección sensible y específica de una o más moléculas de ácido nucleico de *Mycobacterium* deseadas en muestras simples y complejas, incluyendo muestras que contienen múltiples especies diferentes de micobacterias de perfiles de resistencia a fármacos mixtos. En algunas realizaciones, se proporcionan reacciones de multiplexación, en un solo tubo, que pueden identificar y distinguir múltiples especies de micobacterias diferentes y perfiles de resistencia a fármacos de manera simultánea en muestras complejas usando ensayos rápidos y eficientes, y equipos de detección.

Por ejemplo, en el presente documento, se proporciona un conjunto de ensayos multiplexados homogéneos, en un solo tubo, para la detección y el análisis de diversas especies de micobacterias, incluyendo diversas cepas de *M. tuberculosis*, así como de si dichas especies y cepas son sensibles o resistentes a una variedad de antibióticos. En algunas realizaciones, los ensayos proporcionados en el presente documento utilizan LATE-PCR (patente de EE.UU. n.º 7.198.897; incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad), PRIMESAFE II (PRIMESAFE es una marca registrada de Smiths Detection Inc.) (solicitud de patente de EE.UU. n.º 20080193934; y los conjuntos de sondas Lights-On/Lights-Off (documento WO2011/050173).

Los procedimientos, las composiciones y los kits proporcionados en el presente documento proporcionan información relevante para el diagnóstico, así como una base para el tratamiento de pacientes que presentan infecciones pulmonares que se pueden deber a infecciones por micobacterias. En algunas realizaciones, los

ensayos proporcionados en el presente documento determinan si una muestra contiene *Mycobacterium*. En algunas realizaciones, los ensayos proporcionados en el presente documento determinan si una infección pulmonar contiene *Mycobacterium*. En algunas realizaciones, los ensayos proporcionados en el presente documento determinan si una micobacteria en una muestra o infección es un miembro del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) o micobacterias no tuberculosas (NTM). En algunas realizaciones, los ensayos proporcionados en el presente documento determinan si una NTM es *M. intracellulare*, *M. avium*, *M. kansasii* o *M. leprae*, o algunas otras especies. En algunas realizaciones, los ensayos proporcionados en el presente documento determinan si un MTBC es *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. microti* o *M. tuberculosis*. En algunas realizaciones, los ensayos proporcionados en el presente documento determinan si una muestra contiene, o una infección se debe a, una mezcla de NTM y MTBC. En algunas realizaciones, los ensayos proporcionados en el presente documento determinan si una muestra contiene *M. tuberculosis* sensible a los antibióticos, *M. tuberculosis* resistentes a los antibióticos, o ambos. En algunas realizaciones, los ensayos proporcionados en el presente documento determinan a qué antibióticos son resistentes las *M. tuberculosis* en una muestra, y a qué dosis.

Las composiciones, los kits y los procedimientos proporcionados en el presente documento proporcionan la amplificación sensible y robusta comenzando con bajos números iniciales de secuencias diana (por ejemplo, ya sea en valores absolutos o relativos con respecto a secuencias no diana). En algunas realizaciones, las secuencias diana amplificadas que son esencialmente más largas que las sondas de hibridación fluorescentes individuales se analizan usando conjuntos de sondas que usan el mismo fluoróforo de color. En algunas realizaciones, las mutaciones neutras que no causan resistencia a los fármacos se distinguen de las mutaciones que sí causan resistencia a los fármacos. En algunas realizaciones, cada una de las diferentes mutaciones posibles que causan resistencia a los fármacos se distingue de los demás. En algunas realizaciones, los mutantes de resistencia a fármacos que se detectan en las mezclas de ADN genómico comprenden genomas de tipo silvestre sensibles a fármacos y mutantes resistentes a fármacos mutantes.

En algunas realizaciones, se proporcionan sondas de señalización y de desactivación para su uso con ensayos de identificación de micobacterias. Las sondas de señalización y las sondas de desactivación normalmente son tolerantes a los desapareamientos. Una sonda tolerante al desapareamiento se hibrida en el ensayo, no solo con una secuencia diana que sea perfectamente complementaria a la sonda, sino también con variaciones de la secuencia diana que contienen uno o más desapareamientos debido a las sustituciones, adiciones o deleciones. Para las sondas tolerantes al desapareamiento, cuanto mayor es la variación de la diana de la complementariedad perfecta, menor es la  $T_f$  del híbrido de sonda-diana. En algunas realizaciones, se emplean sondas específicas de la secuencia. Una sonda específica de la secuencia se hibrida en el ensayo solo con una secuencia diana que es perfectamente complementaria a la sonda (por ejemplo, a una temperatura dada). En algunas realizaciones, las combinaciones de las sondas específicas de la secuencia y tolerantes al desapareamiento se pueden emplear en un ensayo. Si una sonda es específica de la secuencia, su falta de hibridación se mostrará en la curva de fusión y en la curva derivada. Por ejemplo, si una sonda de señalización se hibrida, produciendo un aumento de la fluorescencia, pero su sonda de desactivación asociada no se hibrida, la fluorescencia no disminuirá a medida que disminuye la temperatura a lo largo de las  $T_f$  de la sonda de desactivación, lo que revela que la sonda de desactivación no se ha hibridado e indica una mutación diana en la secuencia complementaria a la sonda de desactivación. Mientras que este resultado indica una mutación en la secuencia diana para la sonda de desactivación, no permite determinar cuán de las diversas mutaciones posibles de esa secuencia está presente. En algunas realizaciones, es preferible que la sonda de desactivación asociada sea tolerante al desapareamiento, si el ensayo es para proporcionar la diferenciación de diferentes mutaciones, que se distinguen por sus diferentes efectos en la curva de fusión (y en la curva derivada) debido a diferentes efectos de la  $T_f$  de diferentes mutaciones.

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

Los procedimientos proporcionados en el presente documento incluyen el uso de un solo conjunto de sondas de señalización y de desactivación que interaccionan. Los procedimientos también incluyen el uso de múltiples conjuntos de sondas de señalización y de desactivación que interaccionan, en los que cada sonda de señalización es distinguible de forma detectable de las otras. La distinción de las sondas fluorescentes puede ser por el color (longitud de onda de emisión), por la  $T_f$  o por una combinación de color y  $T_f$ . Se pueden usar múltiples conjuntos de sondas que interaccionan para cuestionar una sola secuencia diana o múltiples secuencias diana en una muestra, incluyendo múltiples secuencias diana en la misma cadena diana o múltiples secuencias diana en diferentes

5 cadenas. La detección multiplexado de múltiples secuencias diana puede utilizar, por ejemplo, uno o más conjuntos de sondas de señalización/desactivación específicas de cada secuencia diana. En algunas realizaciones, los procedimientos multiplexados utilizan un color fluorescente diferente para cada secuencia diana. Algunas realizaciones utilizan el mismo color para dos secuencias diana diferentes, lo que permite disponer de un espacio de temperatura.

10 En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden analizar la hibridación de los conjuntos de sondas de señalización/de desactivación con una o más secuencias diana de ácido nucleico de micobacteria monocatenarias en función de la temperatura. La señal, preferentemente la señal fluorescente, procedente de la sonda o sondas de señalización puede adquirirse a medida que disminuye (hibridación) o aumenta (fusión) la temperatura de la muestra. El análisis puede incluir la adquisición de una curva de hibridación o fusión completa, incluyendo las señales tanto de aumento como de disminución procedentes de cada sonda de señalización, como se ilustra en la FIG. 1, Panel E. Como alternativa, el análisis puede basarse solo en el aumento de la señal o en la disminución de la señal. El análisis puede utilizar solamente señales a temperaturas seleccionadas en lugar de todas las temperaturas pertinentes a la hibridación o a la fusión. El análisis puede incluir la comparación de la hibridación de una secuencia diana de un ácido nucleico monocatenaria desconocida con la hibridación de secuencias diana conocidas que se han establecido previamente, por ejemplo, una compilación de curvas de fusión de especies conocidas o una tabla de datos digitalizados de especies conocidas.

20 En los procedimientos proporcionados en el presente documento, se pueden proporcionar una o más secuencias diana de ácido nucleico de micobacteria monocatenarias que se vayan a analizar mediante la amplificación del ácido nucleico, en general, una amplificación exponencial. Se puede usar cualquier procedimiento de amplificación del ácido nucleico adecuado. Los procedimientos de amplificación preferidos son aquellos que generan un producto amplificado (amplicón) en forma monocatenaria de manera que no se requiera la eliminación de las cadenas complementarias de las secuencias diana monocatenarias que se van a analizar. Los conjuntos de sondas se pueden incluir en dichas mezclas de la reacción de amplificación antes del inicio de la amplificación, de forma que los recipientes de reacción que contienen el producto amplificado no necesiten abrirse. Cuando la amplificación tiene lugar en presencia de conjuntos de sondas, se prefiere que el sistema esté diseñado de manera que las sondas no interfieran con la amplificación. En algunas realizaciones, se utiliza un procedimiento de PCR no simétrica tal como una PCR asimétrica o, se utiliza la LATE-PCR para generar copias monocatenarias. Puede combinarse la amplificación por PCR con la transcripción inversa para generar amplicones a partir de dianas de ARN. Por ejemplo, la transcripción inversa puede combinarse con la LATE-PCR para generar amplicones de ADN que correspondan a dianas de ARN o a los complementos de dianas de ARN. En algunas realizaciones, no se prefieren los procedimientos de amplificación que solo generan amplicones bicatenarios, porque se requiere el aislamiento de secuencias diana en forma monocatenaria, y el análisis de la curva de fusión es más difícil con amplicones bicatenarios debido a la tendencia de los dos amplicones a colapsar y eyectar las sondas de hibridación. En algunas realizaciones, los procedimientos proporcionados en el presente documento no utilizan la generación de señales detectables mediante la digestión de las sondas de señalización, como se produce en los ensayos de amplificación de la nucleasa 5'. En la reacción de amplificación por PCR, por ejemplo, se puede conseguir evitar la digestión de la sonda usando tanto sondas cuyas Tf están por debajo de la temperatura de extensión del cebador, usando sondas tales como las que comprenden 2'-O-metil-ribonucleótidos que resisten la degradación por las ADN polimerasas, o usando ADN polimerasas que carezcan de actividad 5'-exonucleasa. La evitación de la interferencia de la sonda con las reacciones de amplificación se realiza utilizando sondas cuyas Tf están por debajo de la temperatura de extensión del cebador, de manera que las sondas eliminan por fusión sus secuencias complementarias durante la extensión del cebador y, lo más preferentemente, durante la hibridación del cebador, al menos la hibridación del cebador tras los primeros ciclos de amplificación. Por ejemplo, en el procedimiento de ensayo de amplificación del Ejemplo 1, el procedimiento de amplificación por LATE-PCR utiliza la PCR en dos etapas con una temperatura de hibridación del cebador/extensión del cebador de 75 °C en presencia de un conjunto de sondas de baliza molecular tolerantes al desapareamiento que tienen Tf frente a las secuencias diana de tipo silvestre (con las que las sondas eran perfectamente complementarias) que variaban de 75 °C a 50 °C, lo que garantizaba que ninguna de las sondas interfiriera significativamente con la amplificación de la secuencia diana.

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

En algunas realizaciones, los ensayos proporcionados en la presente en el presente documento utilizan

PRIMESAFE II (descrito en la solicitud de patente de EE.UU. n.º 20080193934; incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad). PRIMESAFE II es una clase de reactivos añadidos a las reacciones de PCR para suprimir los errores de cebado. Los reactivos PRIMESAFE II están compuestos de oligonucleótidos lineales que se modifican químicamente en sus extremos 5' y o 3'. En algunas realizaciones, los reactivos PRIMESAFE usados en el presente documento incluyen SEQ ID NO: 65 y SEQ ID NO: 66. En algunas realizaciones, los ensayos descritos en el presente documento hacen uso de una formulación de PRIMESAFE II que tiene dos cadenas, cuya primera cadena está modificada tanto en el extremo 5' como en el extremo 3' mediante enlace covalente de fracciones de DABCYL, cuya segunda cadena es complementaria a dicha primera cadena y se modifica químicamente mediante la adición de fracciones de DABCYL, tanto en el extremo 3' como en el extremo 5'.

Un aspecto de las realizaciones proporcionadas en el presente documento es la capacidad para identificar cepas de micobacterias resistentes a fármacos, que se diferencian de las cepas sensibles a fármacos que pueden contener mutaciones neutras. La FIG. 2 ilustra las posibles mutaciones neutras que puedan existir en el gen *rpoB* diana de *M. tuberculosis*, pero que no causan resistencia a los fármacos. La FIG. 3 ilustra algunas de las mutaciones del gen *rpoB* diana que se sabe que causan resistencia a los fármacos. Se puede encontrar información acerca de los genes adicionales y sus mutaciones causantes de resistencia a fármacos en *M. tuberculosis* en Sandgren A., Strong M., Muthukrishnan P., Weiner B. K., Chruch, G. M., Murray M. B. (2009) "Tuberculosis Drug Resistance Mutation Database". *PLoS Med* 6(2).

En la FIG. 4, se ilustra la relación filogenética de algunas especies de NTM y las especies de MTBC. En algunas realizaciones, los cebadores limitantes y los cebadores en exceso de LATE-PCR empleados en los ensayos descritos en el presente documento se construyeron para que fueran complementarios a las dianas de ADN del genoma de *M. tuberculosis*. Dada la divergencia evolutiva observada entre las especies de micobacterias, dichos cebadores limitantes y cebadores en exceso son imperfectamente complementarios a secuencias diana relacionadas en algunas otras especies de NTM. Dichos cebadores tienen más probabilidades de ser totalmente complementarios a las dianas de genes entre otras especies de MTBC cuyos miembros están más estrechamente relacionados con *M. tuberculosis*. El MTBC incluye *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. microti* y *M. tuberculosis*.

La Tabla 1 resume las dianas y las sondas empleadas en un ensayo nonaplexado en términos de los efectos de cada amplicón, las dianas de genes específicos, las longitudes de las regiones diana sondeadas y el número de sondas utilizadas.

30

Tabla 1

Antibióticos	Diana génica	Longitud de la diana	Número de sondas
Rifampicina	<i>rpoB</i>	101	3 activadas/ 3 desactivadas
Etambutol	<i>embB</i>	29	1 activadas/1 desactivada + 1 oligo sin marcar
Isoniazida	<i>inhA</i>	36	1 activada/1 desactivada
Isoniazida	<i>ahpC</i>	93	2 activadas/ 2 desactivadas
Isoniazida	<i>katG</i>	40	1 activada/1 desactivada
Fluoroquinolona	<i>gyrA</i>	45	1 activada/1 desactivada + 1 oligo sin marcar
NTM frente a MTBC	ARN r 16s	63	2 activadas/ 2 desactivadas
Especies de MTBC	<i>gyrB</i>	31	2 activadas/1 desactivada + 1 oligo sin marcar
Control de sistemas	??	~30	1 activada/1 desactivada

35

Los amplicones de *gyrA*, *gyrB* y *embB* tienen horquillas importantes que tienden a evitar las interacciones de sonda-diana. En estos casos, se añade un oligonucleótido sin marcar de alta Tf (por ejemplo, una sonda silenciosa) para inhibir la formación de la horquilla y así la unión de las sondas de señalización y/o de desactivación. La diana de ARNr 16s se usó para distinguir el MTBC de las NTM. En las realizaciones descritas en la Tabla 1, se emplea un conjunto de sondas para distinguir todos los MTBC de todas las NTM, así como para distinguir muchas de las NTM entre sí.

40

La FIG. 5 ilustra cómo las dianas de la Tabla 1 se detectan en el punto final usando cuatro colores (por ejemplo, Quasar 670, Cal Red 610, Cal Orange 570 y FAM) en un intervalo de temperaturas entre 25 °C y 75 °C. Como el experto en la materia apreciará, algunos termocicladores fluorescentes tienen capacidades de más de cuatro colores fluorescentes. Se contempla la utilización de uno o más colores adicionales para la amplificación y detección de uno o más amplicones que se detectan con una o más sondas o conjuntos de sondas. Dichos amplicones adicionales se podrían construir en ensayos a petición de un usuario final que desee detectar una determinada secuencia diana,

que tenga una importancia clínica particular. En algunas realizaciones, los amplicones detectados o analizados mediante otros procedimientos se multiplexan con los ensayos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, dichos amplicones se analizan por secuenciación con el uso de un procedimiento tal como la secuenciación "Dilute-N-Go", que es conveniente para la secuenciación de una o más cadenas de ADN generadas en un ensayo de LATE-PCR multiplexado (Jia Y., Osborne A., Rice, J. E. y Wangh, L. J. (2010) "Dilute-'N'-Go Dideoxy Sequencing of All DNA Strands Generated in Multiplex LATE-PCR Assays, Nucleic Acids Research").

La FIG. 5 muestra una realización en la que se analiza una sola diana (rpoB) con múltiples conjuntos de sondas que juntos generan señales fluorescentes de materiales compuestos en un amplio intervalo de temperaturas, que se denominan de aquí en adelante distintivo de fluorescencia dependiente de la temperatura.

La FIG. 5 ilustra además realizaciones, en las que se visualiza más de un diana usando conjuntos de sondas del mismo color mediante el diseño de las señales para un conjunto de sondas en un intervalo de temperaturas que es diferente del intervalo de temperaturas para un diana separada (por ejemplo, gyrB y 16s). Las señales de los dos dianas se funden en un distintivo de fluorescencia dependiente de la temperatura de material compuesto que da información sobre la presencia/ausencia o las características de más de una diana.

En algunas realizaciones, se emplean conjuntos de sondas para cada diana en un ensayo multiplexado para conseguir la máxima cobertura de todas las posibles diferencias de secuencia entre las secuencias relacionadas, así como la resolución máxima entre dichas variantes de secuencia. La FIG. 6A ilustra la ubicación de los conjuntos de sondas usados para la diana de gen rpoB que se describe en la Tabla 1 y la FIG. 5. La mayoría de las mutaciones de la diana de gen rpoB están en las sondas de señalización y, por lo tanto, reducen la correspondiente Tf de la sonda de señalización a la diana. Por consiguiente, se observa la señal fluorescente de la sonda de señalización a temperatura inferior. La FIG. 6B ilustra la ubicación de un conjunto de sondas alternativo en el que la mayoría de las mutaciones de la diana de gen rpoB están bajo las sondas de desactivación. Por consiguiente, la señal fluorescente de la sonda adyacente activada solo es activada por su sonda desactivada apareada a temperatura inferior. Las FIG. 7A y 7B ilustran los distintivos fluorescentes de la diana de gen rpoB para el conjunto de sondas de las FIG. 6A y 6B, respectivamente. En este ejemplo, el conjunto de sondas de la FIG. 6B presentó mayor poder de resolución que el conjunto de sondas de 6A.

Las muestras de esputo son la fuente más usada de muestras para el análisis de la TB, porque el esputo humano tiene una alta concentración de ADN genómico humano. Los ensayos de LATE-PCR, que se usan para ilustrar realizaciones ilustrativas en el presente documento, son altamente específicos para sus dianas previstas, a pesar de la presencia de altas concentraciones de ADN humano por las siguientes razones: 1) La química de la LATE-PCR es inherentemente más específica que la química de la PCR convencional; 2) los genomas de micobacterianas tienen un contenido muy alto de GC, lo que significa que se pueden emplear cebadores de alta Tf para la amplificación junto con altas temperaturas para la hibridación y la extensión; 3) se pueden emplear PRIMESAFE II con cuatro dabcyls y una alta Tf para suprimir los errores de cebado a todas las temperaturas inferiores a la temperatura de hibridación-extensión. En algunas realizaciones, se usan cebadores que presentan un sesgo para la amplificación de las secuencias deseadas (por ejemplo, un sesgo para la tuberculosis). La FIG. 8 ilustra que 1.000, 100 o 10 moléculas de la diana de rpoB se amplifican de manera eficiente en presencia de 10.000 genomas humanos. La Tabla 2 ilustra el diseño de una reacción multiplexada en la que se añadieron 10.000 genomas humanos y PRIMESAFE II para todas las reacciones.

Tabla 2

		<i>M. intracellulare</i>	<i>M. tuberculosis</i>
<b>rpoB</b>		<b>Tipo silvestre</b>	<b>Mutante</b>
<b>mabA</b>		<b>Tipo silvestre</b>	<b>Tipo silvestre</b>
<b>katG</b>		<b>Tipo silvestre</b>	<b>Mutante</b>
<b>16s</b>		<b>NTM</b>	<b>MTBC</b>
<b>gyrB</b>		<b>-</b>	<b>TB</b>
<b>100,0</b>	<b>0,00</b>	<b>20,000</b>	<b>0</b>
<b>99,9</b>	<b>0,10</b>	<b>19,980</b>	<b>20</b>
<b>99,5</b>	<b>0,50</b>	<b>19,900</b>	<b>100</b>
<b>99,0</b>	<b>1,00</b>	<b>19,800</b>	<b>200</b>
<b>95,0</b>	<b>5,00</b>	<b>19,000</b>	<b>1000</b>
<b>90,0</b>	<b>10,00</b>	<b>18,000</b>	<b>2000</b>
<b>0,0</b>	<b>100,0</b>	<b>0</b>	<b>20,000</b>

(Continuación)

	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. tuberculosis</i>
<b>Genoma humano</b>	<b>10.000 copias en todas las reacciones</b>	
<b>PrimeSafe</b>	<b>Sí</b>	

Las infecciones de TB y muestras clínicas comúnmente están compuestas de más de una cepa de una micobacteria, así como otros organismos, por ejemplo, una cepa resistente a los fármacos mezclada con una cepa sensible a los fármacos, o dos especies diferentes de micobacterias. En cualquier caso, los componentes separados de dicha mezcla pueden estar presentes en un amplio intervalo de proporciones, por ejemplo, de tan poco como del 0,1 % al 99,9 %, hasta del 50 % al 50 %. En algunas realizaciones, el ensayo descrito en la Tabla 2 proporciona una reacción pentaplexada capaz de detectar niveles bajos de *M. tuberculosis* en presencia de niveles excesivos de NTM, *M. intracellulare*. Los resultados resumidos en la Tabla 3 demuestran que se puede detectar tan poco como del 0,1 % al 0,5 % de *M. tuberculosis* en la presencia del 99,9 al 99,5 % de *M. intracellulare*. En algunas realizaciones, se obtienen resultados similares en ensayos configurados para detectar otros subgrupos de micobacterias (por ejemplo, *M. tuberculosis* resistentes a la rifampicina entre *M. tuberculosis* sensible a la rifampicina en exceso). La sensibilidad de este ensayo se extiende a cualquier MTBC en presencia de un exceso de cualquier NTM, porque los cebadores utilizados para cada una de las dianas amplificadas son totalmente complementarios a los genotipos de MTBC, pero solo parcialmente complementarios a los genotipos de NTM.

Tabla 3

Eficiencia de amplificación relativa de MTBC frente a NTM		LOD para <i>M. tb</i>	Eficiencia de amplificación relativa de Mutante frente a tipo silvestre		LOD para Mutante o especie*
rpoB	Por determinar	Por determinar	rpoB	1	10 %
mabA	x 100.000	0,1-0,5 %	inhA	1	10 %
katG	x 10.000	0,1-0,5 %	katG	1	10 %
gyrB	> x 40	0,1-0,5 %	gyrB*	1	10 %
16s	1	10 mol	16s*	1	10 %

La Tabla 3 también resume los hallazgos para la sensibilidad de dicho ensayo para detectar una cepa resistente a fármacos de un MTBC en presencia de un exceso de una cepa sensible a fármacos de tipo silvestre de dicho MTBC; en este caso, los cebadores son igualmente complementarios a ambos genomas diana, y la diferenciación de la resistencia a los fármacos en presencia de sensibilidad a los fármacos depende por completo de las sondas usadas para visualizar las distintivos fluorescentes de las cepas resistentes a los fármacos y las cepas sensibles a los fármacos. La estimación de una resistencia a fármacos del 10 % en presencia de sensibilidad a los fármacos del 90 % en la Tabla 3 se basa en la observación empírica empleando las sondas mostradas en la FIG. 6A para la diana de rifampicina. Basándose en los resultados ilustrados en la FIG. 7, es probable que el límite inferior de detección sea una resistencia al fármaco del 1 % en sensibilidad al fármaco del 99 % usando el conjunto de sondas mostrado en la Figura 6B.

### **Parte experimental**

Las características y las realizaciones de los procedimientos proporcionados en el presente documento se ilustran en los ejemplos que se exponen más adelante en combinación con las figuras adjuntas. Los ejemplos deben considerarse ilustrativos y no limitantes del alcance.

### **Ejemplo 1**

#### **Detección de la resistencia a fármacos en el gen rpoB de cepas de *M. tuberculosis***

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

Las sondas de la combinación abarcaban los 101 pares de bases de la secuencia diana de ácido nucleico monocatenaria. Tres de las sondas eran sondas de señalización. Las sondas de señalización eran sondas de baliza

5 molecular desactivadas con tallos de dos nucleótidos de longitud. Cada una incluía marcadores unidos covalentemente: el fluoróforo Quasar 670 en un extremo y un desactivador Black Hole 2, BHQ2, (Biosearch Technologies, Novato CA), en el otro extremo. Las otras tres sondas eran sondas de desactivación marcadas en el extremo solo con BHQ2, sin fluoróforo. En el presente ejemplo, las Tf de las sondas de señalización con respecto a la cepa sensible al fármaco resultaron diferir entre sí, y las Tf de las sondas de desactivación con respecto a la cepa sensible al fármaco resultaron diferir entre sí. Los tres conjuntos de sondas fueron distinguibles de forma detectable.

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

10 Cebador limitante: 5' CTCCAGCCAGGCACGCTCACGTGACAGACCG (SEQ ID NO. 1)  
 Cebador en exceso: 5' CCGGTGGTCGCCGCGATCAAGGAG (SEQ ID NO: 2)  
 Diana: Cepa 13545

5'CCGGTGGTCGCCGCGATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGAGCC  
 AATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACCCACAAGCGCCGA  
 CTGTCGGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTACGTGAGCGTGCCGGGCTGGA  
 G (SEQ ID No.3)

Diana: Cepa 18460

5'CCGGTGGTCGCCGCGATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGAGCC  
 AATTCATGGTCCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACCCACAAGCGCCGA  
 CTGTCGGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTACGTGAGCGTGCCGGGCTGGA  
 G (SEQ ID No.4)

15 Diana: Cepa 9249

20 5' CCGGTGGTCGCCGCGATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGAGCC AATTCATGGACCAGAACAAC-  
 CCGCTGTCGGGGTTGACCCACAAGCGCCGA CTGTTGGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTACGTGAGCGT-  
 GCCGGGCTGGA G (SEQ ID No: 5). El subrayado de la secuencia de cada una de las cepas 18460 y 9249  
 denota la situación del cambio de nucleótido en la cepa 13545 sensible al fármaco.

Sonda 1:

5'- BHQ2-CTGGTTGGTGCAGAAG-C<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 6)

Sonda 2:

5'-BHQ2-TCAGGTCCATGAATTGGCTCAGA-Quasar 670 (SEQ ID NO: 7)

25 Sonda 3:

5'- BHQ2-CAGCGGGTTGTT-C<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 8)

Sonda 4:

5'-BHQ2-ATGCGCTTGTGGATCAACCCGAT-Quasar 670 (SEQ ID NO: 9)

Sonda 5:

30 5'-Quasar 670-AAGCCCCAGCGCCGACAGTCGTT BHQ2 (SEQ ID NO: 10)

Sonda 6:

5'-ACAGACCGCCGG BHQ2 (SEQ ID NO: 11).

Un enlazador de tres átomos de carbono se indica como C<sub>3</sub>, mientras que un desactivador Black Hole 2 se indica

como BHQ2 (Biosearch Technologies, Novato CA).

5 Las amplificaciones por LATE-PCR se llevaron a cabo en un volumen de 25  $\mu$ l que consistía en 1 x tampón de PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA),  $MgCl_2$  2 mM, dNTP 200 nM, cebador limitante 50 nM, cebador en exceso 1000 nM, 1,25 unidades de ADN polimerasa Platinum Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA), 500 nM de sondas 1, 3 y 6, y 200 nM de sondas 2, 4 y 5. Para cada cepa analizada se usaron aproximadamente 1.000 genomas equivalentes. Las reacciones de amplificación de cada cepa se realizaron por triplicado.

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

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

20 La FIG. 9 ilustra la unión de los tres conjuntos de sondas (Sondas 1/Sonda 2, Sonda 3/Sonda 4, y Sonda 5/Sonda 6) a la secuencia diana de ácido nucleico monocatenaria, utilizando la cepa 13545 susceptible al fármaco como diana. En la FIG. 9, la cadena 21 es la cadena diana, la cadena 23 es el cebador en exceso y la cadena 22 es el cebador limitante. Con fines ilustrativos, las sondas 1-6 se muestran hibridadas a la cadena 21 en una orientación 3' a 5' con sus extremos desapareados anteriores. Los desapareamientos entre las sondas y la cadena 21, y entre el cebador limitante y la cadena 21 se muestran en negrita. Los marcadores de fluoróforo y desactivador se han omitido en la FIG. 9, pero se han dado anteriormente en las descripciones de la secuencia. Algunos de los nucleótidos de las secuencias de sonda se desaparearon de forma deliberada con la cepa 13545 sensible tal como la Sonda 1, que contiene desapareamientos en las posiciones 31 (A a G) y 38 (T a G) con respecto al extremo 5' de la cadena 21. Otros desapareamientos están en la Sonda 2, posición 62 (A a A), Sonda 4, posición 86 (A a C). Dentro del cebador limitante, en la posición 142 (A a G) hay un desapareamiento que se incluyó para reducir una horquilla que aparece en la cadena diana original. Además de estos desapareamientos en la cepa sensible 13545, la cepa 18460 tiene un desapareamiento de nucleótido en la posición 59 (T a T) mientras que la cepa 9249 tiene un desapareamiento en la posición 104 (G a T).

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

40 La FIG. 10A presenta los resultados del análisis de dos cepas diferentes de *M. tuberculosis*, la cepa 13545 y la cepa 18460. Los datos del análisis por triplicado de muestras de amplificaciones diferentes de las dos cepas están superpuestos con fines ilustrativos. El círculo 311 representa la cepa resistente a fármacos 18460 (D516V, un ácido aspártico situado en la posición del aminoácido 516 se cambió por valina), pero al mismo tiempo, el círculo 312 muestra las réplicas de la cepa sensible a fármacos 13545 (V146F, una valina situada en la posición del aminoácido 146 se cambió por fenilalanina). La FIG. 10B presenta los resultados de la cepa resistente a fármacos 9249 y la cepa sensible a fármacos 13545, mientras que el círculo 313 muestra las réplicas de la cepa resistente a fármacos 9249 (S531L, una serina situada en la posición de aminoácido 513 se cambió por leucina) y el círculo 314 muestra tres réplicas de la cepa sensible a fármacos 13545 (V146F).

## Ejemplo 2

### 50 Detección de una cepa resistente a fármacos de *M. tuberculosis* en una mezcla mixta

55 Se realizaron amplificaciones mediante LATE-PCR para proporcionar secuencias diana de ácido nucleico monocatenarias usando la cepa 18640 de *M. tuberculosis* resistente (D516V, un ácido aspártico situado en el aminoácido 516 cambió a valina) y la cepa sensible 13545 en diferentes proporciones para determinar el nivel de sensibilidad en una muestra mixta. Los componentes y las condiciones de la reacción son las descritas en el Ejemplo 1, a excepción de las secuencias diana iniciales estaban incluidas en las mezclas de reacción. Los amplicones generados a partir de la cepa 18640 y la cepa 13545 usando los cebadores del Ejemplo 1 comprenden una sola variación de nucleótidos dentro de la secuencia de hibridación de la sonda 2. En la presente realización, la sonda 2 es una sonda de señalización. Como alternativa, en algunas realizaciones, se puede emplear una sonda de

desactivación que se hibrida con la región del amplicón que contiene el nucleótido variable, y una sonda de señalización correspondiente está diseñada para hibridarse de manera adyacente. Una mezcla de reacción contenía solo la cepa 18460, y otra mezcla de reacción solo incluía la cepa 13545. Cada uno de estos controles del 100 % contenía aproximadamente 100.000 copias del ADN genómico de la correspondiente cepa. Las mezclas de reacción de una primera muestra mixta contenían un 20 % (aproximadamente 20.000 genomas) de la cepa resistente 18460 con el 80 % (aproximadamente 80.000 genomas) de la cepa sensible 13545. La mezcla de reacción de una segunda muestra mixta contenía un 10 % de la cepa 18460 (10.000 genomas) con el 90% de la cepa 13545 (90.000 genomas). La mezcla de reacción de una tercera muestra mixta el 5 % de la cepa 18460 (5.000 genomas) con el 95 % de la cepa 13545 (95.000 genomas). La mezcla de reacción de una cuarta muestra mixta contenía el 1 % de la cepa 18460 (1.000 genomas) con el 99 % de la cepa 13545 (99.000 genomas). Las reacciones de amplificación se realizaron por triplicado.

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

Los datos usados en el análisis gráfico de la hibridación de las seis sondas fue la media de cada réplica de los últimos tres perfiles de fusión. A estos valores medios, se restó la fluorescencia a 35 °C, y los valores resultantes se normalizaron mediante la división de todos los valores con la fluorescencia a 78 °C. A continuación, se generó la primera derivada de los datos resultantes y se normalizaron dividiendo todos los valores usando el mayor valor positivo.

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

Las FIG. 11A-11D muestran los análisis resultantes. Muestran la señal de diversos porcentajes de la cepa resistente 18460 en un fondo creciente de la cepa sensible 13545. La Fig. 11A muestra esta señal con una mezcla mixta de un 20 % de la cepa resistente 18460 en un fondo del 80 % de la cepa sensible 13545, mientras que el círculo 410 identifica la contribución de la cepa resistente en las réplicas de la mezcla, y el círculo 411 identifica la distribución entre las réplicas de la cepa sensible pura. La Fig. 11B muestra la señal con la mezcla del 10 %, con el círculo 412 representando la contribución de la cepa resistente en las réplicas de la mezcla, y el círculo 413 representando la distribución entre las réplicas de la cepa sensible pura. La Fig. 11C muestra la señal de la mezcla con un 5 % de réplicas de cepa resistente (círculo 414 que identifica la contribución de la cepa resistente en réplicas de la mezcla, y el círculo 415 identifica la distribución entre las réplicas de la cepa sensible pura). La Fig. 11D muestra la señal de la mezcla de la cepa resistente al 1 %. El círculo 416 identifica la contribución de la cepa resistente en las réplicas de la mezcla, y el círculo 417 identifica la distribución entre las réplicas de la cepa sensible pura.

### Ejemplo 3

#### Detección de la resistencia a múltiples fármacos en cepas de *M. tuberculosis*

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

Los componentes y las condiciones de reacción fueron los siguientes:

#### Para el gen *gyrA*

Cebador limitante: 5' ACCAGGGCTGGGCCATGCGCACCA (SEQ ID NO: 12)  
Cebador en exceso: 5' GGACCGCAGCCACGCCAAGTC (SEQ ID NO: 13)  
Diana: Cepa 13545

5'GGACCGCAGCCACGCCAAGTCGGCCCGGTCGGTTGCCGAGACCATGGG  
CAACTACCACCCGCACGGCGACGCGTCGATCTACGACAGCCTGGTGC  
TGGCCCAGCCCTGGT (SEQ ID No. 14)

Diana: Cepa 202626  
Idéntica a la cepa 13545  
Diana: Cepa 15552

5'GGACCGCAGCCACGCCAAGTCGGCCCGGTCGGTTGCCGAGACCATGGG  
CAACTACCACCCGCACGGCGACGTGTCGATCTACGACAGCCTGGTGC  
TGGCCCAGCCCTGGT (SEQ ID No.15)

5

Sonda 1:

5' CGACCGGGCC-BHQ2 (SEQ ID NO: 16)

Sonda 2:

5' Cal Red 610-AACCCATGGTCTCGGCAACTT-BHQ2 (SEQ ID NO: 17)

10

Sonda 3:

5' Cal Red 610-AATCGCCGTGCGGGTGGTAGTT- BHQ2 (SEQ ID NO: 18)

Sonda 4:

5'GCTGTCGTAGATCGACGCG-BHQ2 (SEQ ID NO: 19)

Para el gen katG

15

Cebador limitante: 5' AGCGCCCACTCGTAGCCGTACAGGATCTCGAGGAAAC (SEQ ID NO: 20)  
Cebador en exceso: 5' TCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCAC (SEQ ID NO: 21)  
Diana: Cepa 202626

GCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCGGAACCGGTAAGGACGCGATC  
ACCAGCGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACGAAATGGGACA  
ACAGTTTCCTCGAGATCCTGTACGGCTACGAGTGGGAGCT (SEQ ID No. 22)

Diana: Cepa 13545

GCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCGGAACCGGTAAGGACGCGATC  
ACCACCGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACGAAATGGGACA  
ACAGTTTCCTCGAGATCCTGTACGGCTACGAGTGGGAGCT (SEQ ID No. 23)

20

Diana: Cepa 15552

GCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCGGAACCGGTAAGGACGCGATC  
ACCAACGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACGAAATGGGACA  
ACAGTTTCCTCGAGATCCTGTACGGCTACGAGTGGGAGCT (SEQ ID No. 24)

Sonda 1:

5' Cal Orange 560-AAGTGATCGCGTCCTTACCTT-BHQ2 (SEQ ID NO: 25)

Sonda 2:

5' GACCTCGATGCAGCTG-BHQ2 (SEQ ID NO: 26)

5 Para el gen rpoB

Cebador limitante: el mismo que en el Ejemplo 1  
 Cebador en exceso: el mismo que en el Ejemplo 1  
 Diana: Cepa 202626

5'CCGGTGGTCGCCGCGATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGAGCC  
 AATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTCGGGGTTGACCGACAAGCGCCGA  
 CTGTCTGGCGCTGGGGCCCGCGGTCTGTACGTGAGCGTGCCGGGCTGGA  
 G (SEQ ID No. 27)

10 Diana: Cepa 15552  
 El mismo que la cepa 9249 definida en el Ejemplo 1  
 Diana: Cepa 13545  
 Expuesta en el Ejemplo 1  
 Sondas usadas para el gen rpoB:  
 15 Sondas 1-6 expuestas en el Ejemplo 1.

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

20 Las ampliificaciones por LATE-PCR se realizaron en un volumen de 25 µl que consistía en 1 x tampón de PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA), MgCl<sub>2</sub> 2 mM, dNTP 200 nM, cebador limitante 50 nM, cebador en exceso 1000 nM para cada conjunto de cebadores, 1,25 unidades de ADN polimerasa Platinum Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA), 500 nM de sondas 1 y 3, con 200 nM de sondas 2 y 4 para las sondas de katG, 200 nM de sonda 1 y 500 nM de sonda 2, y para las sondas de rpoB, se usaron las concentraciones expuestas en el Ejemplo 1. Para todas las cepas ensayadas se usaron aproximadamente 1.000 genomas equivalentes de diana previamente amplificada, y las reacciones de amplificación de cada cepa se realizaron por triplicado.

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

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

**Tabla 1**

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

La FIG. 12 ilustra la unión a la sonda de cebadores y de sondas de la cadena 51, la diana *gyrA* de la cepa 13545, que, debido a que los cebadores eran perfectamente complementarios a la cadena diana original, es idéntica a la cadena del cebador en exceso. En la FIG. 12 la parte subrayada 53 de la secuencia 51 corresponde a los nucleótidos del cebador en exceso y la secuencia 52 es el cebador limitante. Las sondas 1-4 se muestran hibridadas a la cadena 51 en una orientación de 3' a 5' con sus extremos desapareados anteriores. Las sondas están marcadas con sus respectivos desactivadores o fluoróforos (no mostrados) como se ha descrito anteriormente. La cepa 15552 difiere con respecto al extremo 5' en la posición 72, un nucleótido T de ambas cepas 13545 y 202626 que tiene un nucleótido C en dicha posición.

La FIG. 13 ilustra la unión a sondas de cebadores y sondas a la cadena 61, la diana de *katG* de la cepa 202626, que, debido a que los cebadores eran perfectamente a de la cadena diana original, es idéntica a la cadena del cebador en exceso; es decir, uno de los tres productos monocatenarios de la reacción de amplificación por LATE-PCR. En la FIG. 13, la secuencia subrayada 63 corresponde a los nucleótidos del cebador en exceso, y la secuencia subrayada 62 es el cebador limitante. Las sondas 1, 2 se muestran hibridadas a la cadena 61 en la orientación 3' a 5' con sus extremos desapareados anteriores. Con respecto al extremo 5' de la cadena 61, las tres cepas se diferencian en la posición 56 (G, en negrita) con respecto a la Sonda 2. En la posición 54 hay una "G" como se muestra para la cepa 202626, pero es una "C" en la cepa 13545 y una "A" en la cepa 15552. El cebador en exceso contiene un desapareamiento deliberado en el extremo 5' (una "T" en lugar de la "G" en cada una de las dianas) para reducir el cebado incorrecto potencial durante la fase lineal de la amplificación por LATE-PCR.

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

La FIG. 14A presenta las lecturas de fluorescencia normalizadas de a las seis sondas del gen *rpoB* en tres cepas diferentes de *M. tuberculosis* en función de la temperatura. El círculo 711 representa las réplicas para la cepa 202626, mientras que el círculo 712 muestra las réplicas para la cepa 15552 y el círculo 713 son las réplicas para la cepa 13545. La FIG. 14B muestra los resultados de las sondas de *gyrA*, que distinguen las cepas sensibles 202626 y 13545 (círculo 714) de la cepa resistente a fármacos 15552 (círculo 715). Los resultados de las sondas del gen *katG* se muestran en la FIG. 14C, en la que los tres derivados de fusión son diferentes, el círculo 716 son réplicas de la cepa sensible 202626, mientras que las cepas resistentes 13545 y 15552 están representadas por el círculo 717 y el círculo 718, respectivamente.

#### Ejemplo 4

##### **Diferenciación de las especies y la detección de la resistencia a los fármacos entre los miembros del género *Mycobacterium***

Se usó un ensayo de LATE-PCR multiplexado para proporcionar múltiples ácidos nucleicos diana monocatenarios para detectar la resistencia a fármacos para la isoniazida usando *katG* más la región promotora del gen *mabA* y la resistencia para la rifampicina determinada con el gen *rpoB*. También el ensayo identifica de forma única *M. tuberculosis* de otros miembros del género *Mycobacterium* usando una combinación de dos genes, el ribosomal 16S y los genes girasa B.

Cebadores, sondas y secuencias diana fueron el resultado de un extenso análisis de alineaciones de secuencias (véase la FIG. 15) y el ensayo empírico para producir secuencias que, cuando se usa en ensayos proporciona resultados ricos en información. Los componentes y las condiciones de reacción fueron las siguientes:

Las secuencias de los cebadores para el gen *rpoB*;  
 cebador limitante de *rpoB*: 5' CTCCAGCCAGGCACGCTCACGTGACAGACCG (SEQ ID NO: 28)  
 cebador en exceso de *rpoB*: 5'CCGGTGGTCGCCGCGATCAAGGAG (SEQ ID NO: 29).

##### Las secuencias de sonda para el gen *rpoB*:

Sonda desactivada de *rpoB* 1

5'-BHQ2-CTGTTGGTGCAGAAG-C3 (SEQ ID NO: 30)

Sonda activada de *rpoB* 1

5'-Quasar 670-TCAGGTCCATGAATTGGCTCAGA BHQ2 (SEQ ID NO: 31)

Sonda desactivada de *rpoB* 2

5'-BHQ2-CAGCGGGTTGTT-C3 (SEQ ID NO: 32)

Sonda activada de *rpoB* 2

5'-Quasar 670-ATGCGCTTGTGGATCAACCCCGAT BHQ2 (SEQ ID NO: 33)

Sonda activada de rpoB 3

5'-Quasar 670-AAGCCCCAGCGCCGACAGTCGTT BHQ2 (SEQ ID NO. 34)

Sonda desactivada de rpoB 3

5 5'-ACAGACCGCCGG BHQ2 (SEQ ID NO: 35)

Secuencias diana de rpoB:

cepa 8094 de *M. tuberculosis*;

5'CCGGTGGTCGCCGCGATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTG  
AGCCAATTCATGGGCCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACCCAC  
AAGCGCCGACTGTCGGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTCACGTGAG  
CGTGCCTGGCTGGAG (SEQ ID No.36)

cepa 8545 de *M. tuberculosis*;

5'CCGGTGGTCGCCGCGATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTG  
AGCCCATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACCCACA  
AGCGCCGACTGTCGGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTCACGTGAGC  
GTGCCTGGCTGGAG (SEQ ID No.37)

10

*M. africanum*;

5'CCGGTGGTCGCCGCGATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTG  
AGCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACCCAC  
AAGCGCCGACTGTCGGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTCACGTGAG  
CGTGCCGGGCTGGAG (SEQ ID No.38)

*M. intracellulare*;

No disponible.

15 Las secuencias de cebador para el gen katG:

Cebador limitante de katG: 5' AGCGCCCACTCGTAGCCGTACAGGATCTCGAGGAAAC (SEQ ID NO: 39)

Cebador en exceso de katG: 5' TCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCAC (SEQ ID NO: 40).

Las secuencias de sonda para el gen katG:

Sonda activada de *katG*

20 5' Cal Orange 560-GTATCGCGTCCTTACCGTTCCAC-BHQ2 (SEQ ID NO: 41)

Sonda desactivada de *katG*

5' CTCGATGCTGCTGGTG-BHQ2 (SEQ ID NO: 42)

Las secuencias diana de katG:

cepas 8545 y 8094 de *M. tuberculosis*;

5'GCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCGGAACCGGTAAGGAC  
GCGATCACCACCGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACG  
AAATGGGACAACAGTTTCCTCGAGATCCTGTACGGCTACGAGTGGG  
AGCT (SEQ ID No.43)

*M. intracellulare*;

5'GGCTGGGCTGGAAGAGCTCGTACGGCACCGGTTCTGGGCAAGGAT  
GCGATCACCAGCGGCCTCGAGGTGGTCTGGACGCCACCCCGACG  
AAGTGGGACAACAGCTTCCTGGAGACGCTGTACGGCTACGAATGG  
GAGCT (SEQ ID No.44)

5

*M. africanum*;  
No disponible.

Las secuencias de cebador para la región promotora de mabA

10 Cebador limitante de mabA: 5'TTCCGGTAACCAGGACTGAACGGGATACGAATGGGGGTTTGG (SEQ ID NO: 45)

Cebador en exceso de mabA: 5' TCGCAGCCACGTTACGCTCGTGGACATAC (SEQ ID NO: 46).

Las secuencias de sonda para la región promotora de mabA:

Sonda activada de mabA:

5'Cal Red 610-TTACAACCTATCGTCTCGCCGCAA-BHQ2 (SEQ ID NO: 47)

15 Sonda desactivada de mabA:

5' GCAGTACCCCG-BHQ2 (SEQ ID NO: 48)

Secuencias diana del promotor de mabA

Cepa 8094 de *M. tuberculosis*;

5'TCGCAGCCACGTTACGCTCGTGGACATACCGATTTCGGCCCCGGCC  
GCGGCGAGACGATAGGTTGTCGGGGTGACTGCCACAGCCACTGAA  
GGGGCCAAACCCCATTCGTATCCCGTTCAGTCCTGGTTACCGGAG  
GAAACCGGGGGATCGGGCTGGCGATCGCACAGCGGCTGGCTGCCG  
A (SEQ ID No.49)

20 Cepa 8545 de *M. tuberculosis*;

5'TCGCAGCCACGTTACGCTCGTGGACATAACCGATTTCGGCCCCGGCC  
GCGGCGAGATGATAGGTTGTCGGGGTGACTGCCACAGCCACTGAA  
GGGGCCAAACCCCATTCGTATCCCGTTCAGTCCTGGTTACCGGAG  
GAAACCGGGGGATCGGGCTGGCGATCGCACAGCGGCTGGCTGCCG  
A (SEQ ID No.50)

*M. intracellulare*;  
No disponible.

5 *M. africanum*;  
No disponible.

Las secuencias de cebador para 16s:

Cebador limitante de 16s: 5'-ACACCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCG (SEQ ID NO: 51)

Cebador en exceso de 16s: 5'-GAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACG (SEQ ID NO: 52).

Las secuencias de sonda para 16s:

10 Sonda activada de 16s: 5'-BHQ1 TTGGCTCATCCCACACCGCTAAAGTGCTTTAA-FAM (SEQ ID NO: 53)

Sonda desactivada de 16s: 5'-BHQ1 CCACCACAAGATATGCGTCTCGTGTTCTAT-C3 (SEQ ID NO: 54).

Secuencias diana de 16s:

Cepas 8545, 8094 de *M. tuberculosis* y *M. africanum*;

5'GAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCAC  
TTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCA  
CGGGATGCATGTCTTGTGGTGGAAAGCGCTTTAGCGGTGTGGGATG  
AGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGACGGCCTACCAAGG  
CGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGT (SEQ ID No.55)

15 *M. intracellulare*

5'GAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCAC  
TTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCTT  
TAGACGCATGTCTTTTGGTGGAAAGCTTTTGCAGGTGTGGGATGGGC  
CCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGACGGCCTACCAAGGCGA  
CGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGT (SEQ ID No.56)

Las secuencias de cebador para el gen girasa B:

Cebador en exceso de girasa B: 5' ATACGGGCTTGCGCCGAGGACAC (SEQ ID NO: 57)

Cebador limitante de girasa B: 5' GTCAGCGAACCGCAGTTCGAGGGCCAGACCAAGACC (SEQ ID NO: 58).

El oligo sin marcar para el gen girasa B gene:

Oligo-gyrB: 5'-CCACTGGTTTGAAGCCAACCCCA-C3 (SEQ ID NO: 59)

Las secuencias de sonda para el gen girasa B:

Sonda activada de girasa B: 5' BHQ1 AGGACGCGAAAGTCGTTGCT-C3- FAM (SEQ ID NO: 61)

5 Sonda desactivada de girasa B: 5' BHQ1 TGAACAAGGCT-C3 (SEQ ID NO: 62).

Secuencias diana de girasa B

Cepas 8545 y 8094 de *M. tuberculosis*;

5'GTCAGCGAACCGCAGTTCGAGGGCCAGACCAAGACCAAGTTGGG  
CAACACCGAGGTCAAATCGTTTGTGCAGAAGGTCTGTAACGAACA  
GCTGACCCACTGGTTTGAAGCCAACCCACCGACGCGAAAGTCGTT  
GTGAACAAGGCTGTGTCCTCGGCGCAAGCCCGTAT (SEQ ID No.63)

*M. africanum*;

5'GTCAGCGAACCGCAGTTCGAGGGCCAGACCAAGACCAAGTTGGG  
CAACACCGAGGTCAAATCGTTTGTGCAGAAGGTCTGTAACGAACA  
GCTGACCCACTGGTTTGAAGCCAACCCACCGACTCGAAAGTCGTT  
GTGAACAAGGCTGTGTCCTCGGCGCAAGCCCGTAT (SEQ ID No.64)

10

*M. intracellulare*  
No disponible.

La secuencia para PRIMESAFE 046:

5'DabcyI-GGAGCAGACTAGCACTGAGGTA-DabcyI (SEQ ID NO: 65)

15 5'DabcyI-TACCTCAGTGCTAGTCTGCTCC-DabcyI (SEQ ID NO: 66).

Un enlazador de tres carbonos se indica con C<sub>3</sub>, mientras que los desactivadores Black Hole 1 o 2 se indican con BHQ1 o BHQ2 respectivamente. (Biosearch Technologies, Novato CA).

20 Las amplificaciones por LATE-PCR se realizaron por triplicado, y se llevaron a cabo en un volumen de 25 µl que consistía en 1 x tampón de PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA), MgCl<sub>2</sub> 2 mM, dNTP 300 nM, cebador limitante 50 nM, cebador en exceso 1000 nM, 1,5 unidades de Platinum Taq ADN polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA), 500 nM de cada sonda desactivada, 200 nM de cada sonda activada y 100 nM de PRIMESAFE 046.

25 El perfil térmico para la reacción de amplificación fue el siguiente: 98 °C/3 min para 1 ciclo, seguido de 98 °C/10 s-75 °C/45 s para 60 ciclos, seguido de 10 min a 75 °C, seguido de 10 min a 25 °C con una fusión partiendo de 25 °C con incrementos de 1 °C en intervalos de 45 s a 81 °C con la adquisición de fluorescencia a cada grado. Las hibridaciones de sonda-diana se analizaron mediante el análisis de la curva de fusión usando la primera derivada para cada fluoróforo por separado para las temperaturas de entre 25 °C y 80 °C.

El ensayo anterior proporciona medios para la diferenciación de las micobacterias, según lo evidencian los gráficos derivados de los distintivos de fluorescencia dependientes de la temperatura en la FIG. 16A-D.

### Ejemplo 5

30 **Detección de una resistencia a múltiples fármacos e identificación de especies de *M. tuberculosis* en una muestra mixta sin micobacterias**

Se realizaron amplificaciones por LATE-PCR para proporcionar secuencias diana de ácido nucleico monocatenarias usando la cepa 8094 de *M. tuberculosis* resistente a múltiples fármacos (el gen rpoB tiene D516G, un ácido

aspártico situado en el aminoácido 516 cambiado a una glicina, el gen katG tiene S315T, una serina situada en el aminoácido 315 cambiada a una treonina, el promotor de mabA no tiene mutación, teniendo así una secuencia de tipo silvestre) y el *M. intracellulare* (que no se había caracterizado para estos genes) en diferentes proporciones para determinar el nivel de sensibilidad dentro de una muestra mixta. Una mezcla de reacción solo contenía la cepa 8094, y la otra mezcla de reacción solo contenía *M. intracellulare*. Cada uno de estos controles del 100 % contenía aproximadamente 20.000 copias de ADN genómico de la cepa pertinente. Las mezclas de reacción para una primera muestra mixta contenían un 10 % (aproximadamente 2.000 genomas) de la cepa resistente 8094 con un 80 % (aproximadamente 18.000 genomas) de *M. intracellulare*. La mezcla de reacción para una segunda muestra mixta contenía un 5 % de la cepa 8094 (1.000 genomas) con un 95 % de *M. intracellulare* (19.000 genomas). La mezcla de reacción para una tercera muestra mixta contenía un 1 % de la cepa 8094 (200 genomas) con un 99 % de *M. intracellulare* (19.800 genomas). La mezcla de reacción para una cuarta muestra mixta contenía un 0,5 % de la cepa 8094 (100 genomas) con 99,5 % de *M. intracellulare* (19.900 genomas). La mezcla de reacción para una quinta muestra mixta contenía un 0,1 % de la cepa 8094 (20 genomas) con un 99,9 % de *M. intracellulare* (19.980 genomas). Los componentes de reacción y las condiciones de PCR se describen en el Ejemplo 1, y las reacciones de amplificación se realizaron por triplicado.

Los datos usados para el análisis gráfico de la hibridación para los cinco genes y sus respectivos conjuntos de sondas fue la primera derivada de la media de las tres repeticiones del perfil de fusión.

Las FIG. 17A-17D muestran el análisis resultante. En ellas se muestran la señal de cada uno de los diferentes porcentajes de la cepa resistente 8094 en un fondo creciente de *M. intracellulare*, así como los controles sin molde. La FIG. 17A muestra los derivados fluorescentes combinados de genes 16s y girasa B en los que *M. intracellulare* al 100 % y 100 % de cepa resistente 8094 son claramente diferentes. A medida que la mezcla de la cepa 8094 se reduce del 10 %, 5 %, 1 %, 0,5 %, estos distintivos fluorescentes se vuelven más similares a *M. intracellulare* al 100 %; sin embargo, incluso al 0,1 % de la cepa 8094, la diferencia es discernible. La FIG. 17B muestra los derivados de fusión del gen katG, donde *M. intracellulare* al 100 % es divergente del 100 % de la cepa resistente 8.094. Para katG esta diferencia en los patrones distintivos proporciona una detección inequívoca de todos los porcentajes de cepa resistente 8094. La FIG. 17C muestra los derivados de la región promotora de mabA y es el caso en el que tanto el *M. intracellulare* como el 100 % de cepa resistente 8094 tienen la misma forma de distintivo. Los porcentajes decrecientes de la cepa 8094 muestran una reducción similar en la señal hacia *M. intracellulare* al 100 %. La FIG. 17D muestra los derivados de gen rpoB con distintivos fluorescentes diferentes para *M. intracellulare* y 100 % de la cepa resistente 8094. Como es el caso de 16s y girasa B, los diferentes porcentajes de la cepa 8094 de 10 %, 5 %, 1 %, 0,5 % y 0,1 %, estos distintivos fluorescentes se vuelven más similares a *M. intracellulare* al 100 %, pero siguen siendo distintos y siguen siendo únicos.

### Ejemplo 6

#### Identificación de especies de *M. tuberculosis* de otras micobacterias

Las secuencias de cebador y sonda para girasa B son las mismas que en el Ejemplo 4 con la adición de:

Sonda activa de girasa B: 5' FAM CGTGTAATGAATAGCTGCG-BHQ1 (SEQ ID NO: 60)

Secuencias diana de gyrB:

*M. tuberculosis*

5'GTCAGCGAACCGCAGTTCGAGGGCCAGACCAAGACCAAGTTGGG  
 CAACACCGAGGTCAAATCGTTTGTGCAGAAGGTCTGTAACGAACA  
 GCTGACCCACTGGTTTGAAGCCAACCCACCGACGCGAAAGTCGTT  
 GTGAACAAGGCTGTGTCCTCGGCGCAAGCCCGTAT (SEQ ID No.63)

*M. microti*

5'GTCAGCGAACCGCAGTTCGAGGGCCAGACCAAGACCAAGTTGGG  
CAACACCGAGGTCAAATCGTTTGTGCAGAAGGTCTGTAACGAACA  
GCTGACCCACTGGTTTGAAGCCAACCCACCGACTCGAAAGTCGTT  
GTGAACAAGGCTGTGTCCTCGGCGCAAGCCCGTAT (SEQ ID No.75)

*M. bovis*

5'GTCAGCGAACCGCAGTTCGAGGGCCAGACCAAGACCAAGTTGGG  
CAACACCGAGGTCAAATCGTTTGTGCAGAAGGTCTGTAATGAACAG  
CTGACCCACTGGTTTGAAGCCAACCCACCGACTCGAAAGTCGTTG  
TGAACAAGGCTGTGTCCTCGGCGCAAGCCCGTAT (SEQ ID No.76)

*M. chelonae*

5'GTCGGCGAACCTCAGTTCGAGGGTCAAACCAAGACCAAGCTGGG  
CAACACCGAGGTCAAGTCGTTTGTGCAGAAGGTGTGCAACGAGCA  
GCTGCAGCACTGGTTCGACTCGAACCCCGCCGA (SEQ ID No.77)

5

*M. intracellulare*

5'GTCAGCGAACCGCAGTTCGAGGGTCAGACCAAGACCAAGCTGGG  
CAACACCGAAGTGAAGTCGTTTCGTGCAGAAGGTCTGCAACGAACA  
GCTCACCCACTGGTTCGAGGCCAACCCCGCGGA (SEQ ID No.78)

*M. asiaticum*

5'GTCGCCGAACCCAGTTCGAGGGCCAGACAAAGACCAAGCTGGG  
CAACACCGAGGTCAAGTCGTTTCGTGCAGAAGGTGTGCAACGAACA  
GCTCACCCACTGGTTCGAGGCCAATCCGTCGGA (SEQ ID No.79)

10

*M. avium*

5'GTGAGCGAACCGCAGTTCGAGGGCCAGACCAAGACCAAAGTGGG  
CAACACCGAGGTGAAGTCGTTTCGTGCAGAAGGTGTGCAACGAACA  
GCTCACCCACTGGTTCGAAGCCAACCCCGCAG (SEQ ID No.80)

Las secuencias de cebador y de sonda para 16 s son las mismas que en el Ejemplo 4.

Secuencias diana de 16s:

*M. chelonae*

5'GAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCAC  
TCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCA  
CACACTTCATGGTGAGTGGTGCAAAGCTTTTGCGGTGTGGGATGAG  
CCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCCACCAAGGCG  
ACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGA (SEQ ID No.81)

*M. asiaticum*

5'GAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCAC  
TTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCA  
CGGGATGCATGTCCTGTGGTGGAAAGCTTTTGCGGTGTGGGATGGG  
CCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGACGGCCTACCAAGGCG  
ACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGT (SEQ ID No.82)

5 *M. avium*

5'GAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCAC  
TTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCTC  
AAGACGCATGTCTTCTGGTGGAAAGCTTTTGCGGTGTGGGATGGGC  
CCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGACGGCCTACCAAGGCGA  
CGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGT (SEQ ID No.83)

*M. intracellulare*

Igual que el Ejemplo 4

*M. fortuitum*

5'GAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCAC  
TCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGAATAGGACCG  
CGCTCTTCATGTGGGGTGGTGGAAAGCTTTTGCGGTGTGGGATGGG  
CCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCG  
ACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGT (SEQ ID No.84)

10

Los miembros del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. microti*, *M. bovis*).  
Igual que el Ejemplo 4.

Las amplificaciones por LATE-PCR se realizaron en un volumen de 25 µl que consistía en 1 x tampón de PCR

(Invitrogen, Carlsbad, CA), MgCl<sub>2</sub> 2 mM, dNTP 200 nM, cebador limitante 50 nM, cebador en exceso 1000 nM y 1,25 unidades de ADN polimerasa Platinum Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se prepararon tres mezclas separadas; la primera tenía 200 nM de cada sonda activada de girasa B, 500 nM de sonda desactivada de girasa B y 1 μM de oligo de *gyrB* sin marcar; la segunda mezcla tenía 200 nM de sonda activada de 16s y 500 nM de sonda desactivada de 16s; mientras que la tercera combinaba todas las sondas y oligonucleótidos sin marcar tanto para girasa B como para 16s.

El perfil térmico para la reacción de amplificación fue el siguiente: 98 °C/3 min durante 1 ciclo, seguido de 98 °C/10 s-75 °C/45 s durante 60 ciclos, seguido de 10 min a 75 °C, seguidos de 10 min en 25 °C, iniciándose la fusión a 25 °C con incrementos de 1 °C en intervalos de 45 s a 81 °C con la adquisición de fluorescencia a cada grado. Las hibridaciones de sonda-diana se analizaron mediante el análisis de la curva de fusión usando la primera derivada para cada flúor por separado para temperaturas de 25 °C a 80 °C.

Las FIG. 18 A-C muestran los resultados de los derivados de fusión medios para cada conjunto de mezcla. La FIG. 18A son distintivos fluorescentes de los conjuntos de sondas de girasa B con los miembros del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC); cepa 10460 de *M. tuberculosis*, cepa 15601, *M. bovis*, *M. microti*. Las especies de micobacterias no tuberculosas (NTM) son *M. fortuitum*, *M. avium*, *M. chelonae*, *M. intracellulare*, *M. asiaticum* y controles sin molde. Los resultados de los distintivos fluorescentes separan claramente las NTM de los miembros del MTBC, mostrando todas las NTM resultados similares a NTC. Para los miembros del MTBC, los distintivos también son diferentes entre sí; *M. tuberculosis* tiene un pico marcado a 61 °C, y luego, un pico negativo a 49 °C, *M. microti* tiene un pico a 54 °C y un pico menor a 49 °C, y *M. bovis* tiene picos positivos a 54 °C y 42 °C con un pico negativo menor a 49 °C. La FIG. 18B muestra los resultados de las sondas de 16s, en los que todos los miembros de MTBC tienen distintivos fluorescentes idénticos, mientras que todas las especies de NTM tienen sus propios distintivos únicos. En la FIG. 18C, los conjuntos de sondas están combinados y los resultados muestran que todas las especies ensayadas tienen sus propios distintivos fluorescentes únicos.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de identificación de uno o más tipos de micobacterias en una muestra, que comprende:

(a) proporcionar:

(i) una muestra que se sospecha que comprende una o más micobacterias e

(ii) reactivos de detección que comprenden al menos un par de cebadores configurados para hibridarse con regiones de ácido nucleico de micobacteria conservadas entre dos o más tipos de micobacterias y en el que dichos cebadores están configurados para amplificar una región variable de ácido nucleico de micobacteria y al menos dos conjuntos de sondas distinguibles de forma detectable de una sonda de señalización y una sonda de desactivación asociada que se hibridan a secuencias de ácido nucleico adyacentes en el ácido nucleico de micobacterias amplificado,

emitiendo la sonda de señalización una señal fluorescente cuando se hibrida con una secuencia diana de ácido nucleico monocatenario, señal que es desactivable por la sonda de desactivación asociada, y la sonda de señalización no emite fluorescencia por encima del fondo cuando no se hibrida con su secuencia diana, comprendiendo la sonda de desactivación un desactivador no fluorescente, de modo que cuando las sondas de señalización y de desactivación se hibridan con las secuencias de ácido nucleico adyacentes, el desactivador no fluorescente de la sonda de desactivación desactiva la señal fluorescente de la sonda de señalización asociada, formando parte al menos una sonda de ambos de los dos conjuntos de sondas, siendo dicha sonda:

una sonda de desactivación marcada con un desactivador en cada extremo, interactuando los extremos con diferentes sondas de señalización o

teniendo un fluoróforo en un extremo y un desactivador en el otro extremo, interactuando el fluoróforo con una sonda de desactivación e interactuando el desactivador con una sonda de señalización;

b) amplificar el ácido nucleico de dicha una o más micobacterias con dichos cebadores;

c) detectar la fluorescencia de dicho fluoróforo emisor de fluorescencia desde cada conjunto de sondas distinguibles de forma detectable a un intervalo de temperaturas;

d) generar distintivos de fluorescencia dependientes de la temperatura para cada fluoróforo emisor de fluorescencia; y

e) analizar dichos distintivos de fluorescencia dependientes de la temperatura para identificar una o más micobacterias en dicha muestra.

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la sonda de señalización está marcada con un fluoróforo emisor de fluorescencia y un desactivador no fluorescente.

3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que al menos uno de los al menos dos conjuntos de sondas distinguibles de forma detectable de dos sondas de hibridación se hibrida con secuencias de ácido nucleico diana adyacentes de la región variable de ácido nucleico de micobacteria.

4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho distintivo de fluorescencia dependiente de la temperatura comprende una curva de fusión y una curva de hibridación,

- comprendiendo el análisis de dicho distintivo de fluorescencia dependiente de la temperatura preferentemente la comparación con una curva de fusión o curva de hibridación establecida previamente y/o

- siendo el análisis preferentemente realizado por un ordenador.

5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la amplificación es mediante un procedimiento de amplificación no simétrica que incluye la extensión de cebadores y una temperatura media de hibridación del cebador tras los primeros ciclos de amplificación,

- siendo dicha amplificación preferentemente una amplificación por LATE-PCR y/o

- teniendo las sondas de dicho al menos un conjunto de sondas distinguibles de forma detectable preferentemente temperaturas de fusión con sus secuencias de ácido nucleico diana por debajo de la temperatura de hibridación de al menos un cebador de la reacción de amplificación.

6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la temperatura de fusión de la sonda de señalización de un conjunto de sondas es superior a la temperatura de fusión de la sonda de desactivación asociada.

7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho colorante emisor de fluorescencia y dichos desactivadores no fluorescentes de cada conjunto de sondas son capaces de interactuar mediante FRET.

8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dichos reactivos de detección comprenden 5 o más conjuntos de sondas, preferentemente 10 o más conjuntos de sondas.

9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que:

- dos o más conjuntos de sondas comprenden diferentes colorantes emisores de fluorescencia que emiten a longitudes de onda detectablemente diferentes o
  - dos o más conjuntos de sondas comprenden los mismos colorantes emisores de fluorescencia, hibridándose dichos mismos colorantes emisores de fluorescencia preferentemente con sus secuencias de ácido nucleico diana a temperaturas de fusión diferentes detectablemente con sus secuencias de ácido nucleico diana y/o
  - en el que cada uno de dichos dos o más conjuntos de sondas se distingue de manera detectable del resto de conjuntos de sondas de dichos reactivos de detección mediante (1) la temperatura de fusión, (2) la longitud de onda de emisión de dicho colorante emisor de fluorescencia o (3) una combinación de los mismos.
- 5
10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se usa un conjunto de sondas para diferenciar entre micobacterias de diferente patogenicidad, especie o resistencia a antibióticos, comprendiendo una o ambas sondas de dicho conjunto de sondas preferentemente diferentes grados de complementariedad con sus secuencias diana en dos o más micobacterias diferentes, dando lugar preferentemente dichos diferentes grados de complementariedad a diferentes distintivos fluorescentes dependientes de la temperatura generados por dicho conjunto de sondas y dichas secuencias diana, usándose preferentemente dichos diferentes distintivos fluorescentes dependientes de la temperatura para diferenciar las diferentes micobacterias de una muestra.
- 10
- 15
11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que:
- la identificación de una o más micobacterias en una muestra comprende:
- a) diferenciar entre NTM y MTBC,
- estando los al menos dos conjuntos de sondas distinguibles de manera detectable configurados para hibridarse con una región de ácido nucleico de micobacteria que comprende ARNr de 16s, comprendiendo dichos al menos dos conjuntos de sondas distinguibles de manera detectable SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54, o teniendo un 70 % o más de identidad con las mismas,
  - estando el al menos un par de cebadores configurado para amplificar dicha región de ácido nucleico de micobacteria que comprende ARNr de 16s, comprendiendo dicho al menos un par de cebadores SEQ ID NO: 51 y SEQ ID NO:52, o teniendo un 70 % o más de identidad con las mismas; o
- 20
- 25
- b) diferenciar entre diferentes especies de MTBC,
- estando los al menos dos conjuntos de sondas distinguibles de forma detectable configurados para hibridarse con una región de ácido nucleico de micobacteria que comprende el ácido del gen gyrB, comprendiendo dichos al menos dos conjuntos de sondas distinguibles de manera detectable SEQ ID NO: 61 y SEQ ID NO: 62, o teniendo un 70 % o más de identidad con las mismas, comprendiendo dichos al menos dos conjuntos de sondas distinguibles de manera detectable además SEQ ID NO: 59 o teniendo un 70 % o más de identidad con la misma, comprendiendo dichos al menos dos conjuntos de sondas distinguibles de manera detectable además SEQ ID NO: 60, o teniendo un 70 % o más de identidad con la misma,
  - estando el al menos un par de cebadores configurado para amplificar dicha región de ácido nucleico de micobacteria que comprende el gen gyrB, comprendiendo dicho al menos un par de cebadores SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 58, o teniendo un 70 % o más de identidad con las mismas; o
- 30
- 35
- c) diferenciar entre micobacterias resistentes a isoniazida y sensibles a isoniazida,
- estando los al menos dos conjuntos de sondas distinguibles de manera detectable configurados para hibridarse con una región de ácido nucleico de micobacteria que comprende la región promotora de mabA, el gen ahpC o el gen katG, comprendiendo dichos al menos dos conjuntos de sondas distinguibles de manera detectable SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 48, o teniendo un 70 % o más de identidad con las mismas, o SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42, o teniendo un 70 % o más de identidad con las mismas,
  - estando el al menos un par de cebadores configurado para amplificar dicha región de ácido nucleico de micobacteria que comprende la región promotora de mabA, el gen ahpC o el gen katG, comprendiendo dicho al menos un par de cebadores SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46 o teniendo un 70 % o más de identidad con las mismas, o SEQ ID NO: 73 y SEQ ID NO: 74, o teniendo un 70 % o más de identidad con las mismas, o SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40, o teniendo un 70 % o más de identidad con las mismas;
- 40
- 45
- o
- d) diferenciar entre micobacterias resistentes a fluoroquinolona y sensibles a fluoroquinolona,
- estando los al menos dos conjuntos de sondas distinguibles de manera detectable configurados para hibridarse con una región de ácido nucleico de micobacteria que comprende el gen gyrA,
  - estando el al menos un par de cebadores configurado para amplificar dicha región de ácido nucleico de micobacteria que comprende el gen gyrA,
- 50
- 55
- o
- e) diferenciar entre micobacterias resistentes a etambutol y sensibles a etambutol,

- estando los al menos dos conjuntos de sondas distinguibles de manera detectable configurados para hibridarse con una región de ácido nucleico de micobacteria que comprende el gen embB, en el que los al menos dos conjuntos de sondas distinguibles de manera detectable comprenden SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 70, o tienen un 70 % o más de identidad con las mismas;

5 - estando el al menos un par de cebadores configurado para amplificar dicha región de ácido nucleico de micobacteria que comprende el gen embB,  
o

f) diferenciar entre micobacterias resistentes a rifampicina y sensibles a rifampicina,

10 - estando tres o más conjuntos de sondas distinguibles de manera detectable configurados para hibridarse con una región de ácido nucleico de micobacteria que comprende el gen rpoB, comprendiendo dichos tres o más conjuntos de sondas distinguibles de manera detectable SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 35, o teniendo un 70 % o más de identidad con las mismas;

15 - estando el al menos un par de cebadores configurado para amplificar dicha región de ácido nucleico de micobacteria que comprende el gen rpoB, comprendiendo dicho al menos un par de cebadores SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29, o teniendo un 70 % o más de identidad con las mismas.

12. Kit de reactivos para identificar uno o más tipos de micobacterias en una muestra que comprende:

20 a) al menos un par de cebadores, en el que dichos cebadores están configurados para hibridarse con regiones de ácido nucleico de micobacteria conservadas entre dos o más tipos de micobacterias, en el que dichos cebadores están configurados para amplificar una región variable de ácido nucleico de micobacteria; y

b) al menos dos conjuntos de sondas distinguibles de forma detectable de una sonda de señalización y una sonda de desactivación asociada que se hibridan con secuencias de ácido nucleico adyacentes en el ácido nucleico de micobacteria amplificado,

25 emitiendo la sonda de señalización una señal fluorescente cuando se hibrida con una secuencia diana de ácido nucleico monocatenario, siendo la señal desactivable por la sonda de desactivación asociada, y no emitiendo la sonda de señalización fluorescencia por encima del fondo cuando no se hibrida con su secuencia diana, comprendiendo la sonda de desactivación un desactivador no fluorescente de modo que cuando tanto la sonda de señalización como la sonda de desactivación se hibridan con las secuencias de ácido nucleico adyacentes, el desactivador no fluorescente de la sonda de desactivación desactiva la señal fluorescente de la sonda de  
30 señalización asociada,  
siendo al menos una sonda parte de ambos de los dos conjuntos de sondas, siendo dicha sonda:

35 una sonda de desactivación marcada con un desactivador en cada extremo, interactuando el extremo con diferentes sondas de señalización o teniendo un fluoróforo en un extremo y un desactivador en el otro extremo, interactuando el fluoróforo con una sonda de desactivación e interactuando el desactivador con una sonda de señalización.

13. Kit de reactivos de acuerdo con la reivindicación 12, en el que

40 - dichos cebadores se proporcionan en una proporción adecuada para la amplificación mediante LAT-PCR y/o  
- las sondas de dicho al menos un conjunto de sondas distinguibles de forma detectable tienen temperaturas de fusión con sus secuencias de ácido nucleico diana por debajo de la temperatura de hibridación de al menos un cebador de la reacción de amplificación.

14 Kit de reactivos de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende además uno o más oligonucleótidos adicionales,

45 - estando dichos oligonucleótidos adicionales preferentemente configurados para suprimir el cebado incorrecto durante las reacciones de amplificación o  
- estando dichos oligonucleótidos adicionales preferentemente configurados para interrumpir elementos estructurales de las secuencias de ácido nucleico diana durante las reacciones de amplificación o durante el sondeo de las secuencias amplificadas.

Figura 1

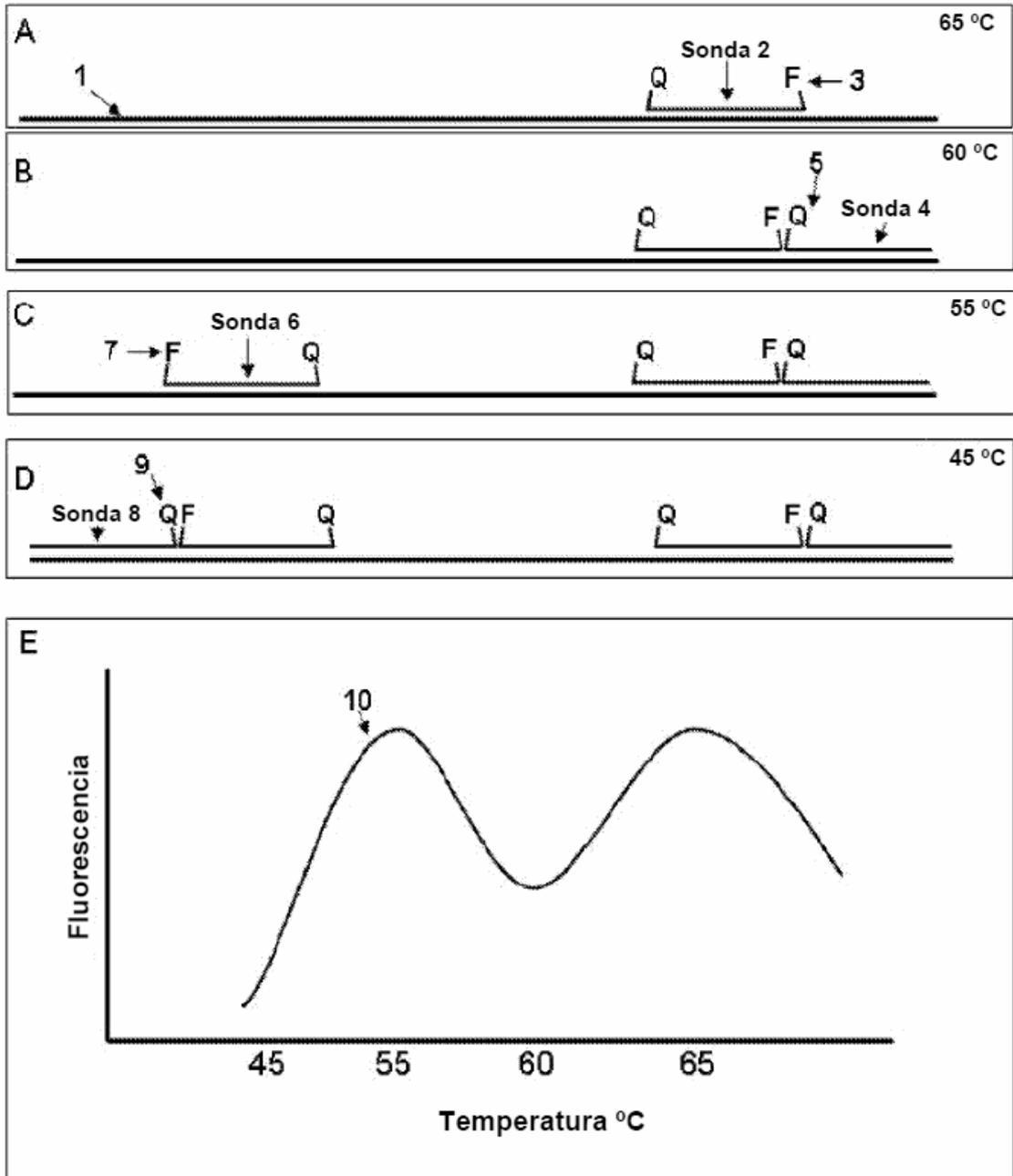




Figura 3

Mutaciones de resistencia a la rifampicina en el gen rpoB

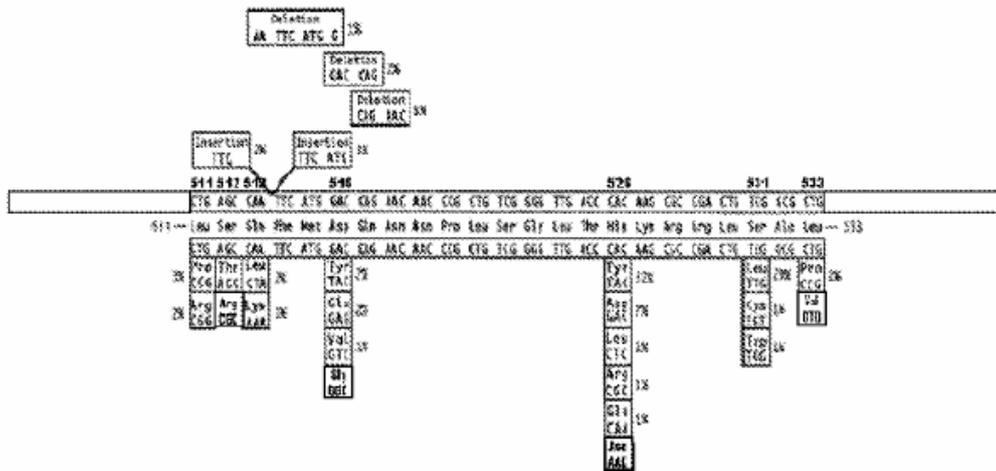




Figura 5

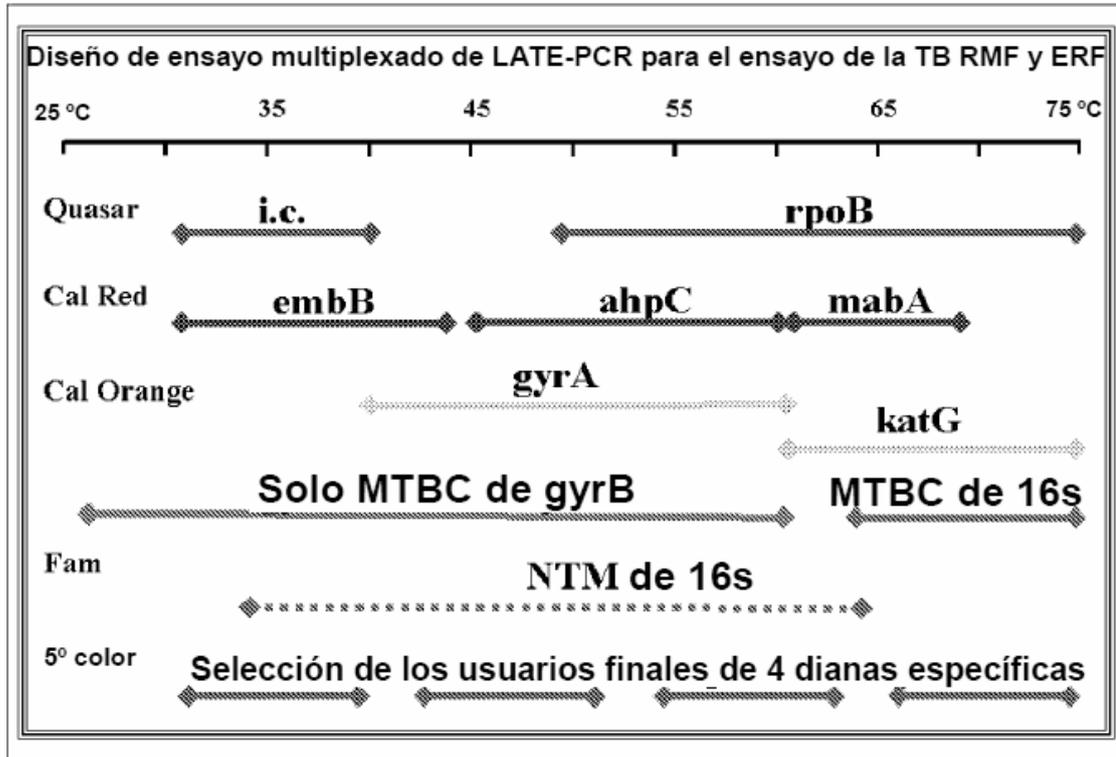


Figura 6

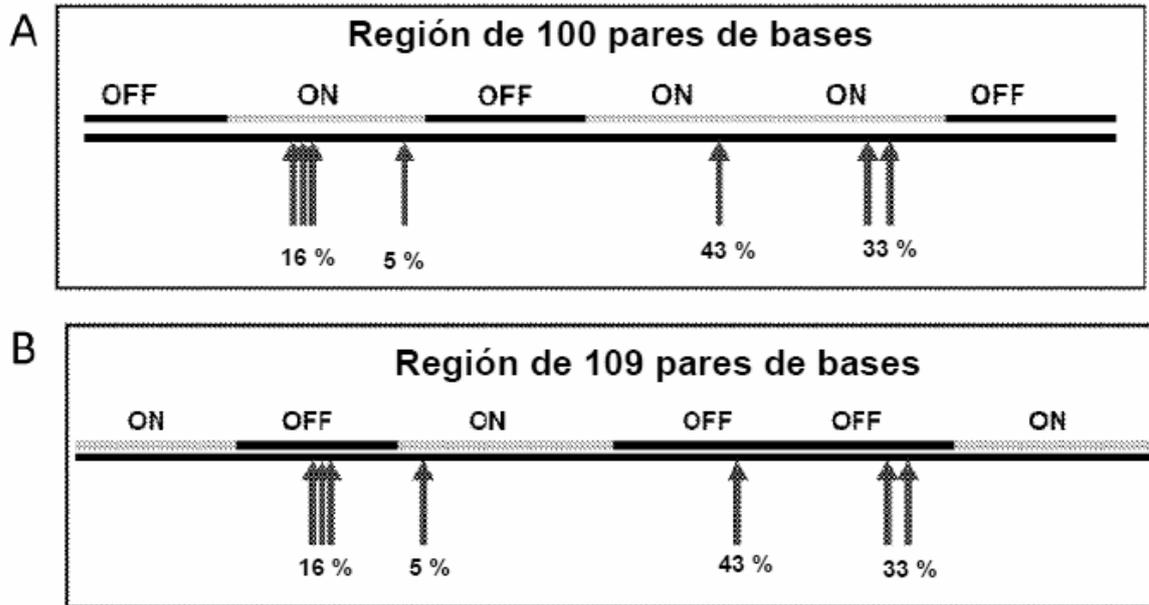


Figura 7

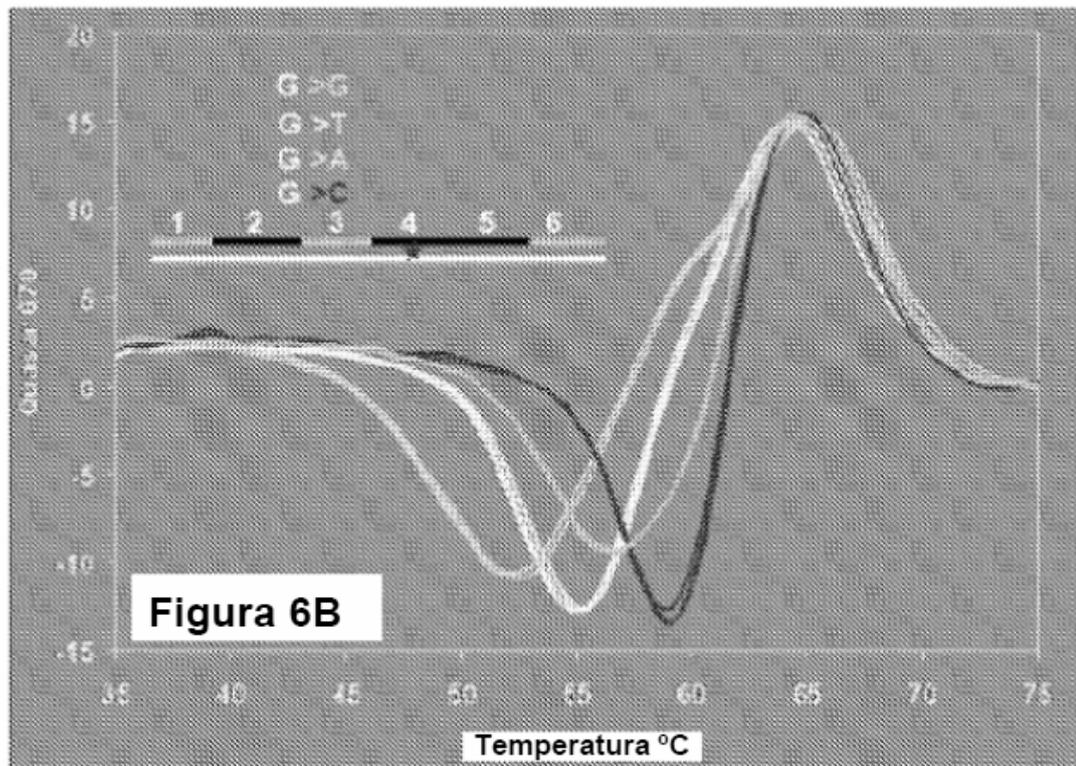
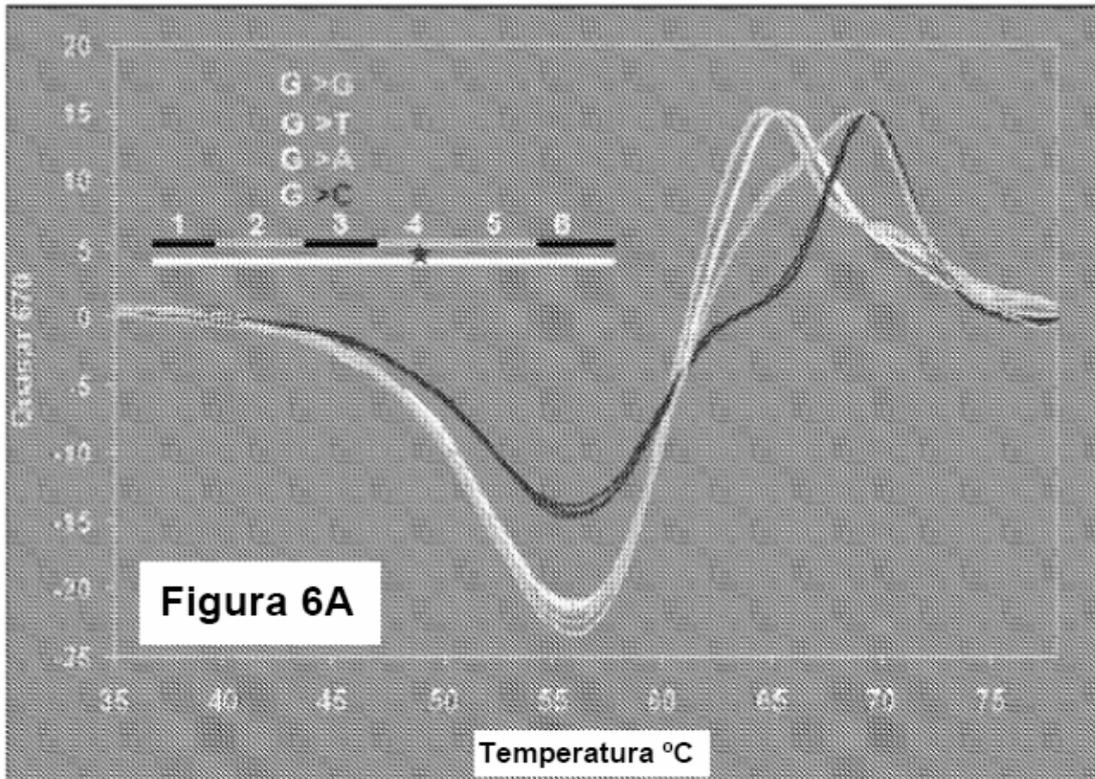


Figura 8

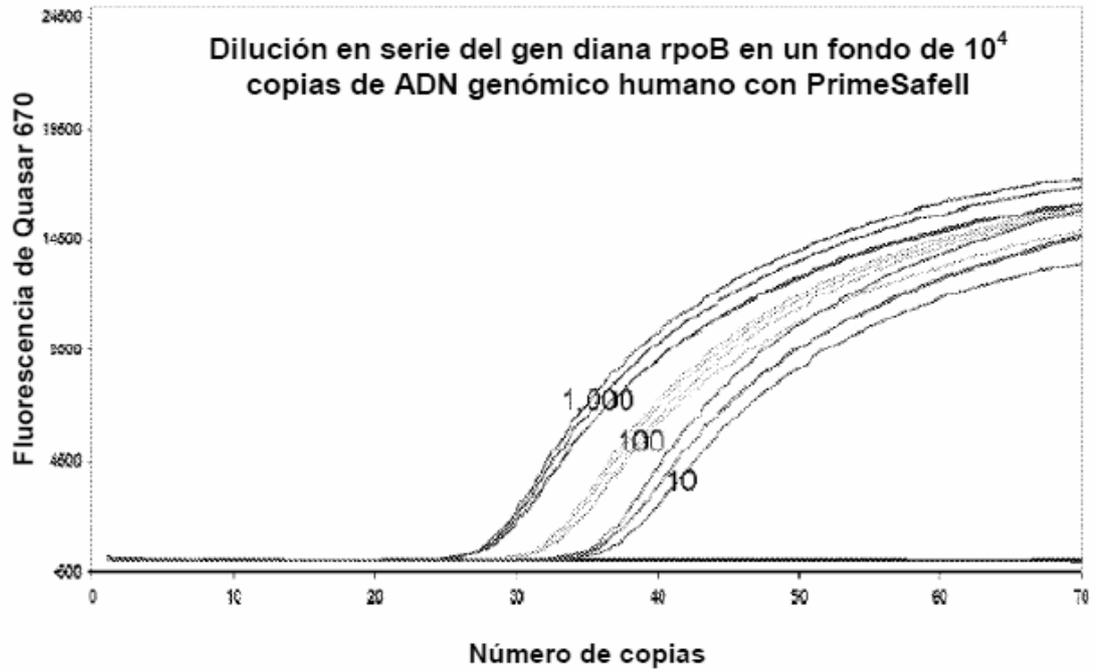


Figura 9

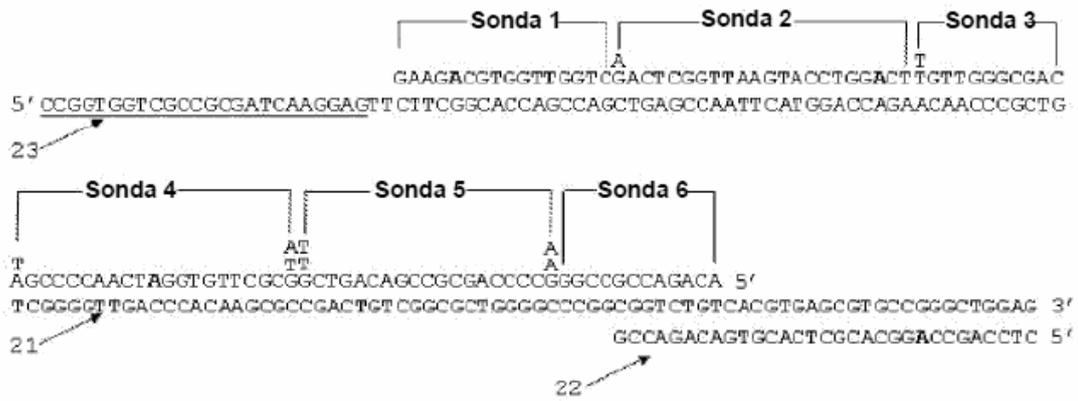


Figura 10A

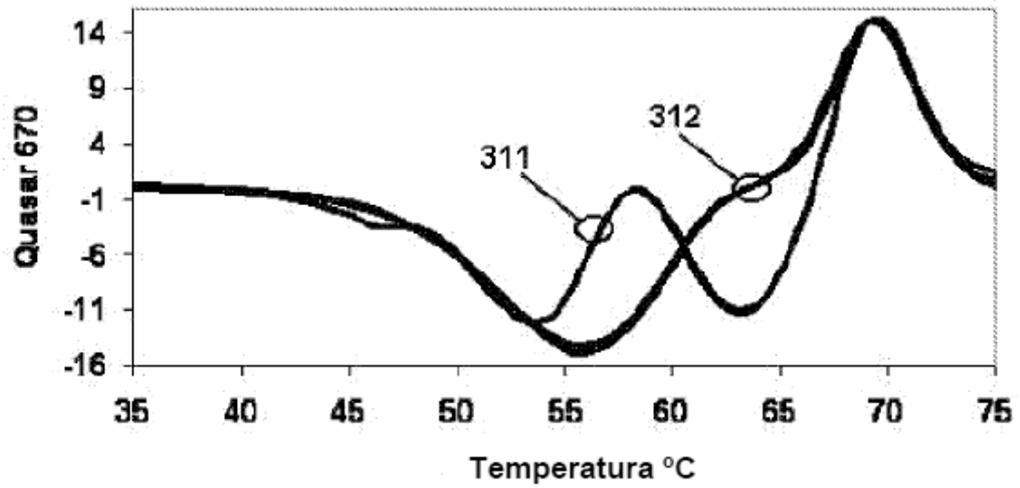


Figura 10B

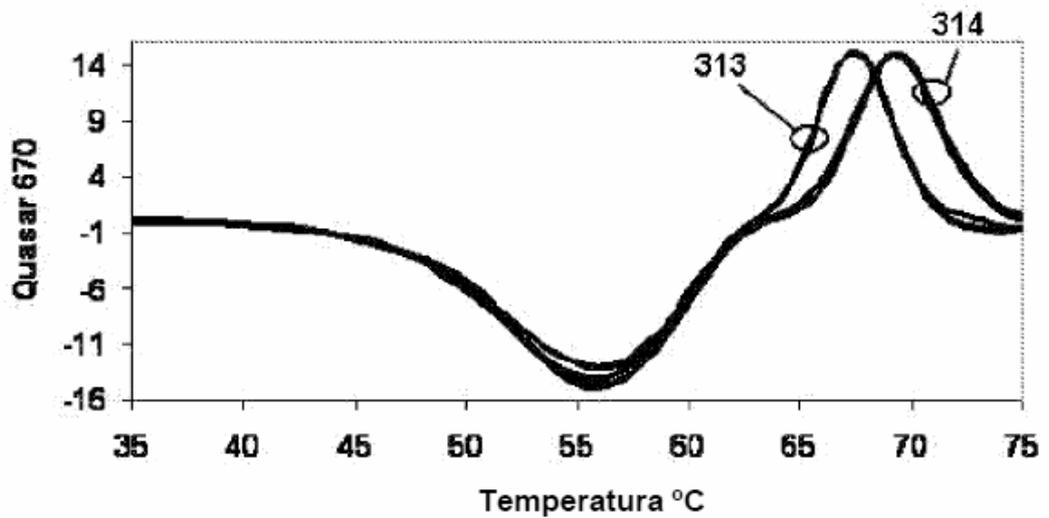


Figura 11A

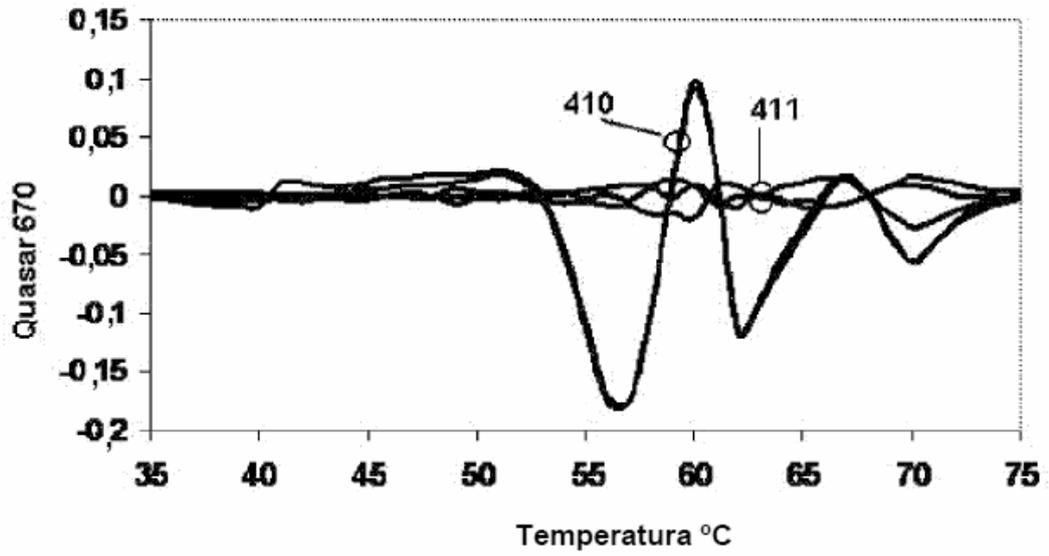


Figura 11B

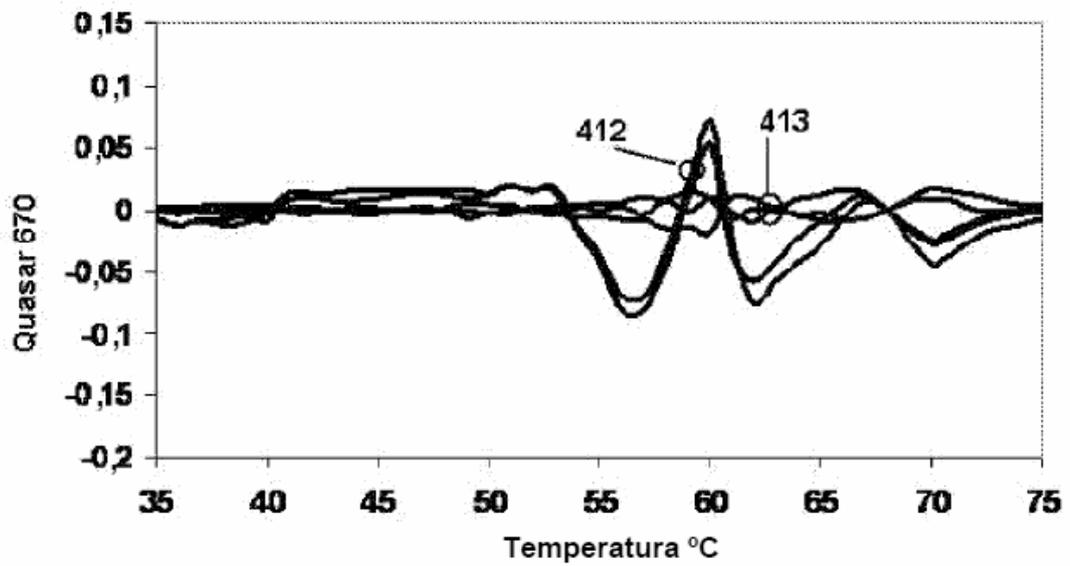


Figura 11C

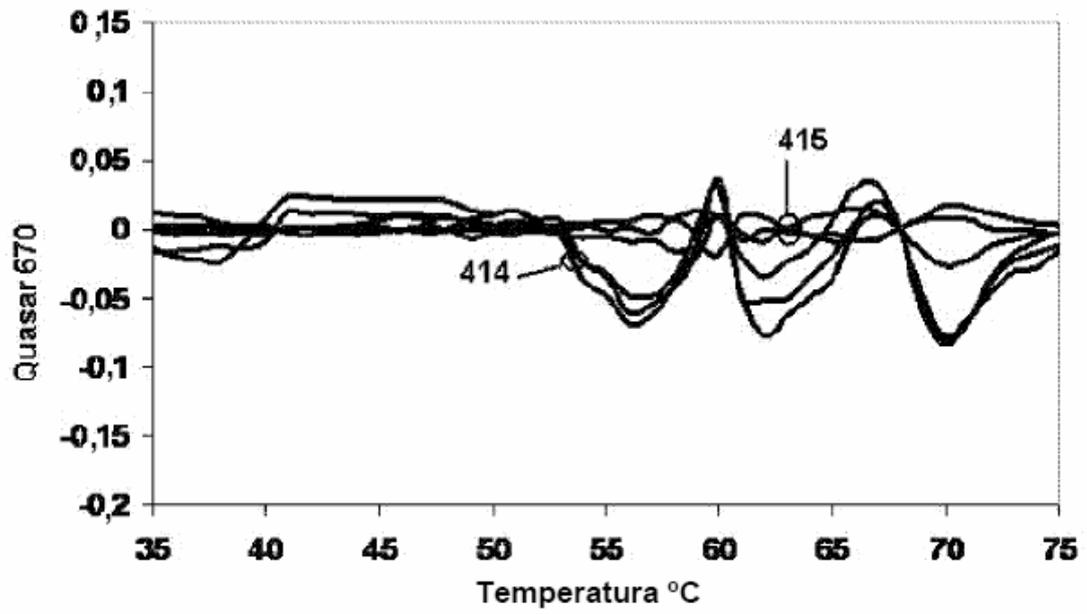


Figura 11D

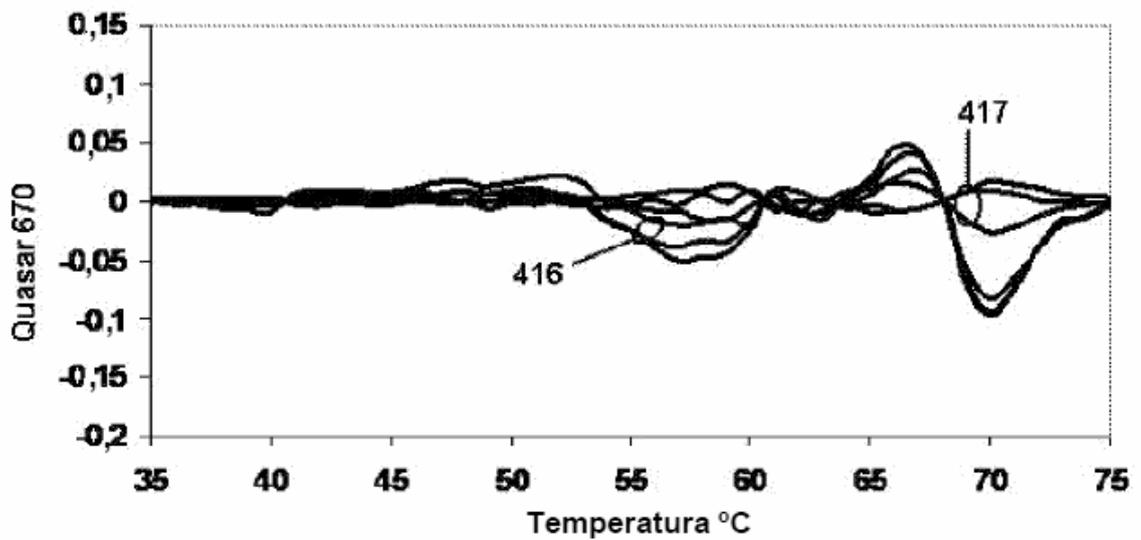


Figura 12



**Figura 13**



Figura 14A

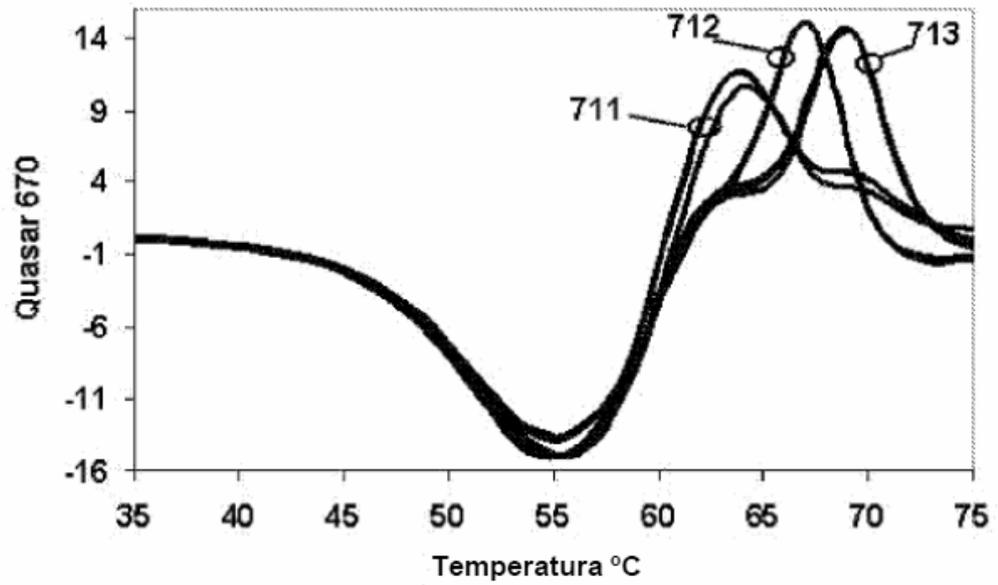


Figura 14B

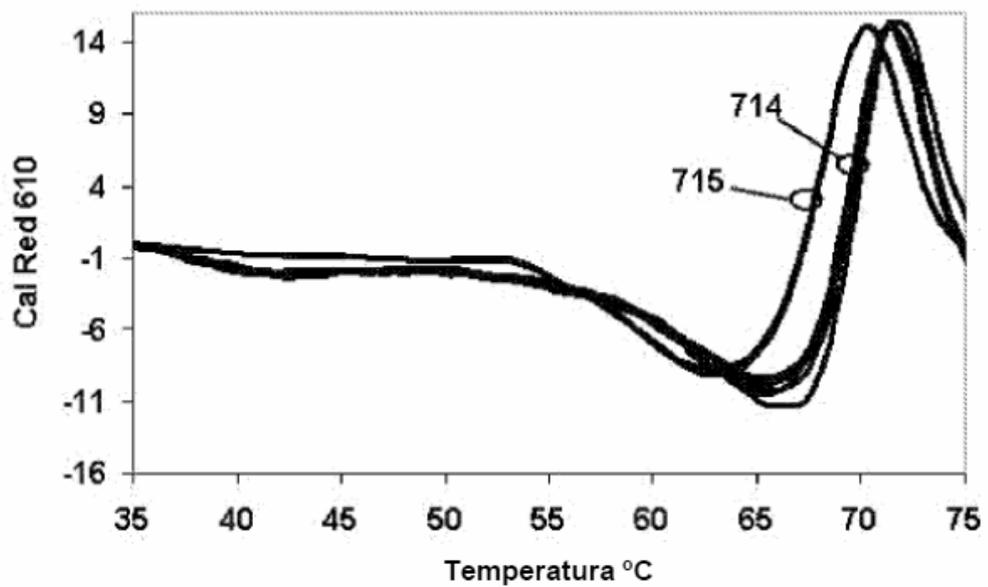
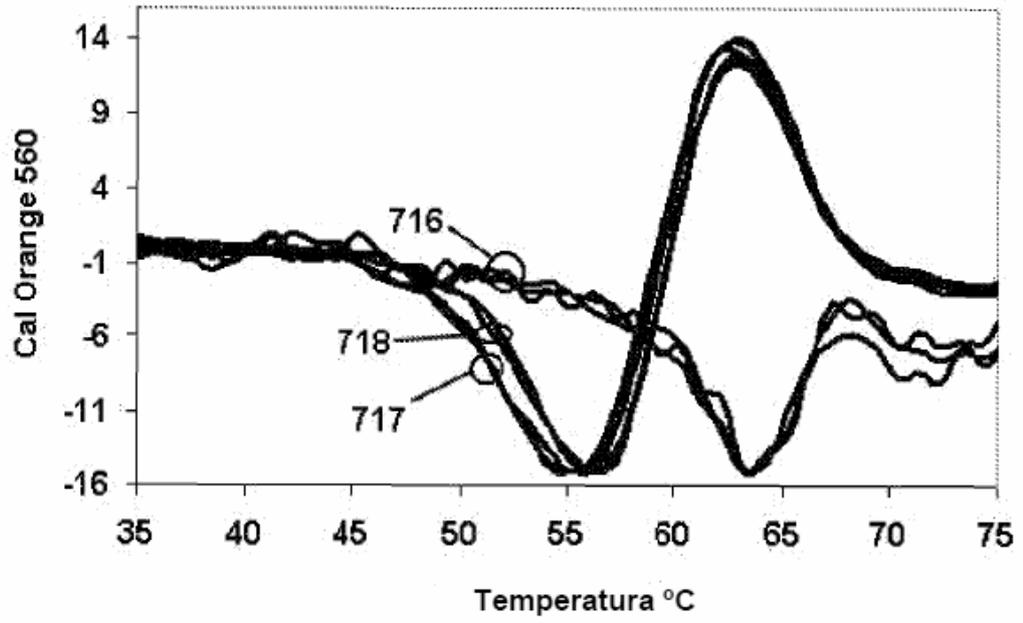


Figura 14C





**Figura 16A**

Derivada de la media para el gen rpoB en pentaplexación

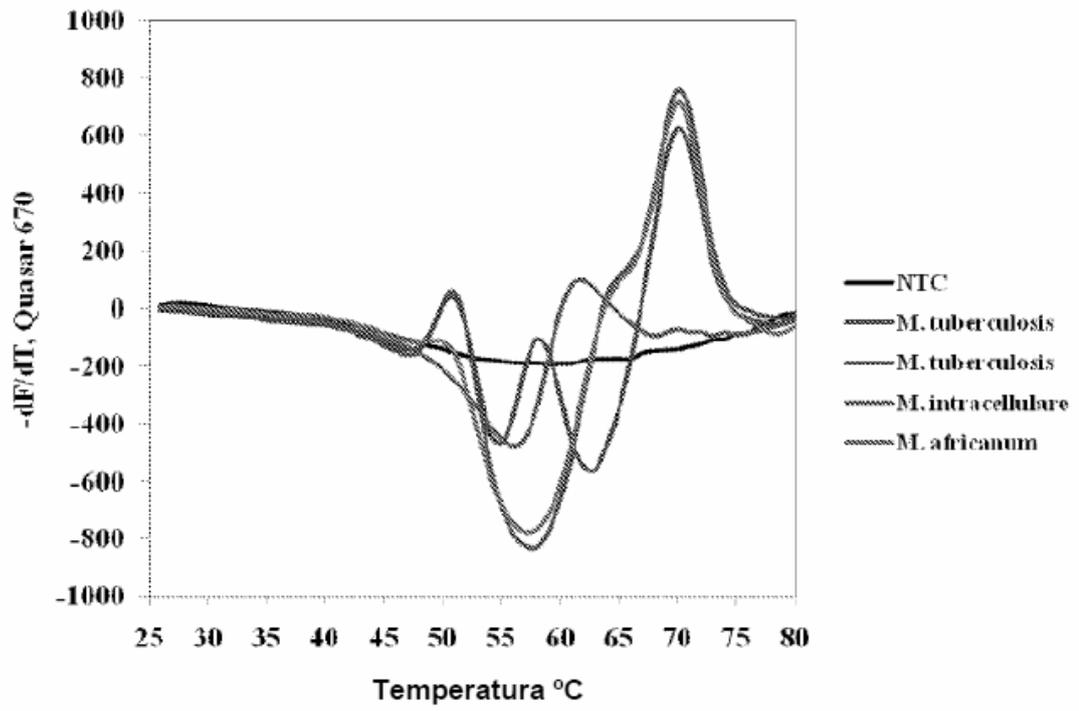


Figura 16B

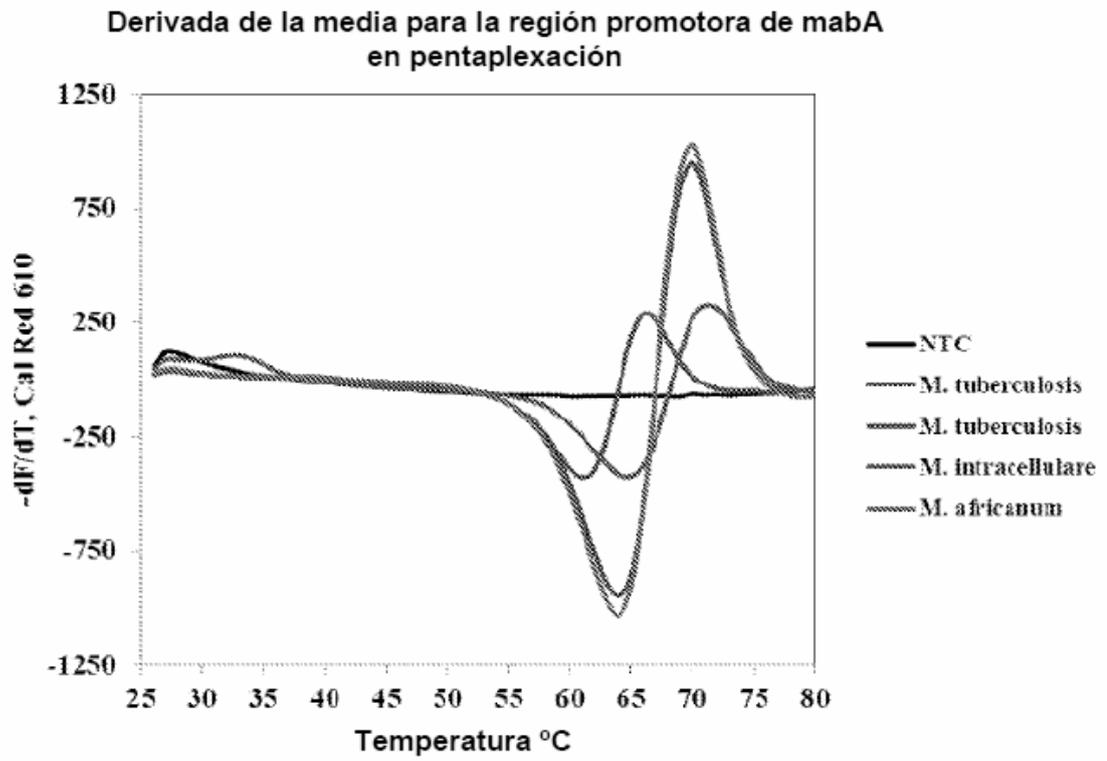


Figura 16C

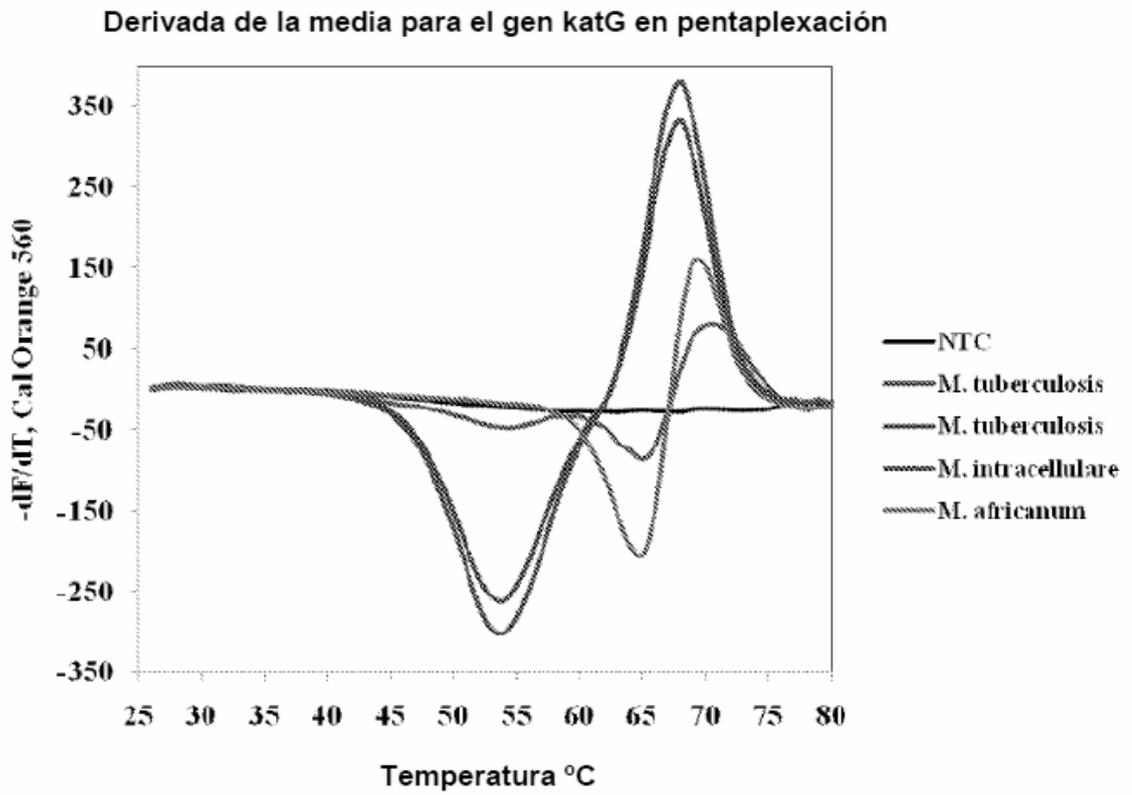


Figura 16D

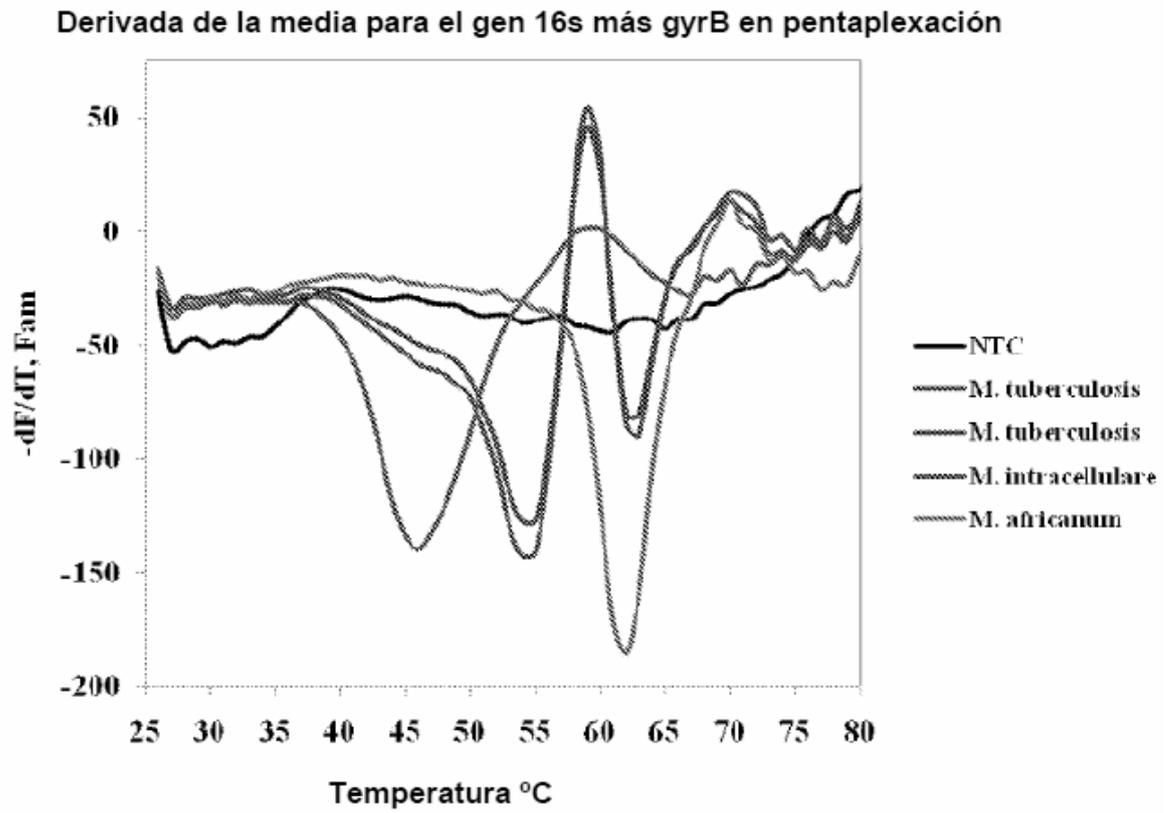


Figura 17A

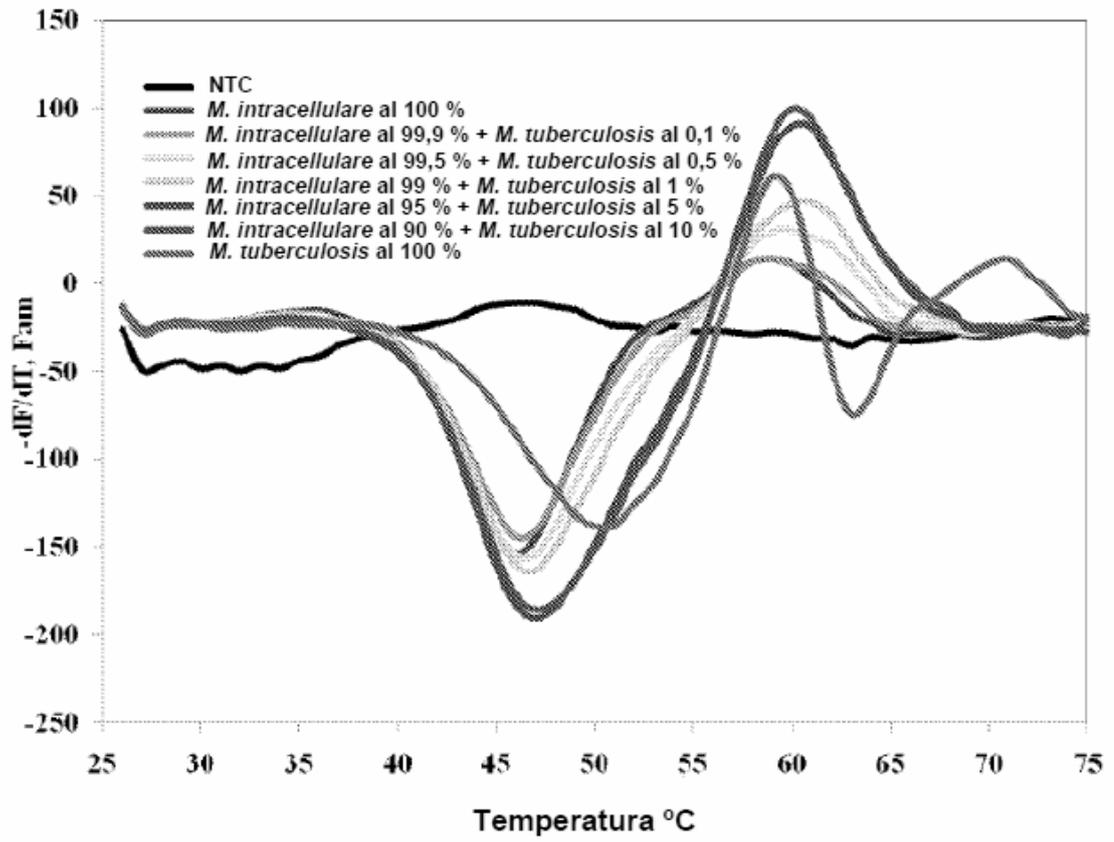


Figura 17B

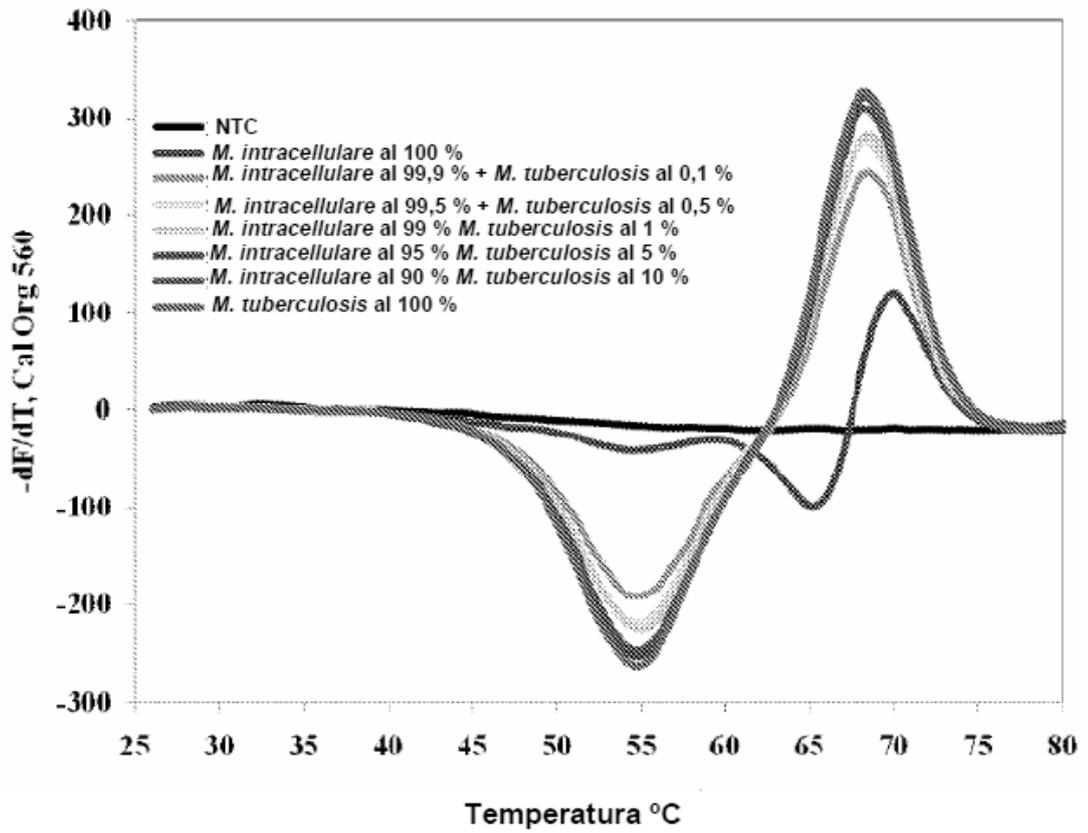


Figura 17C

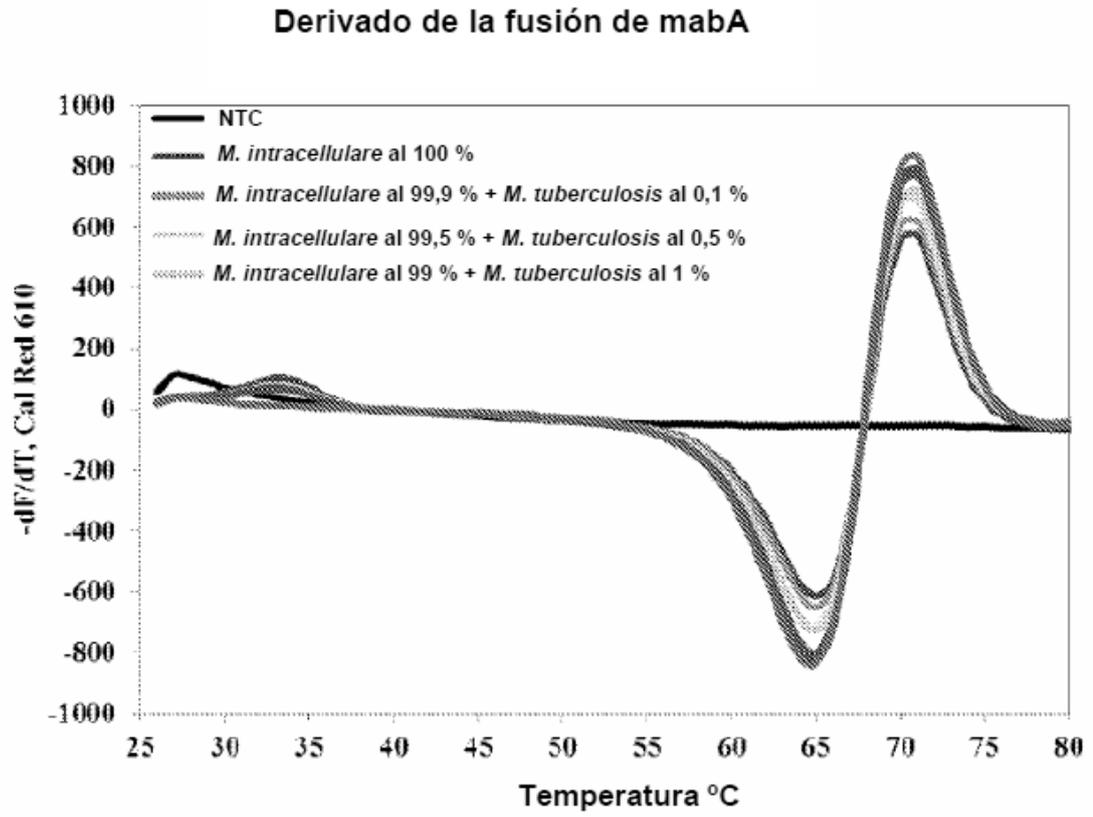
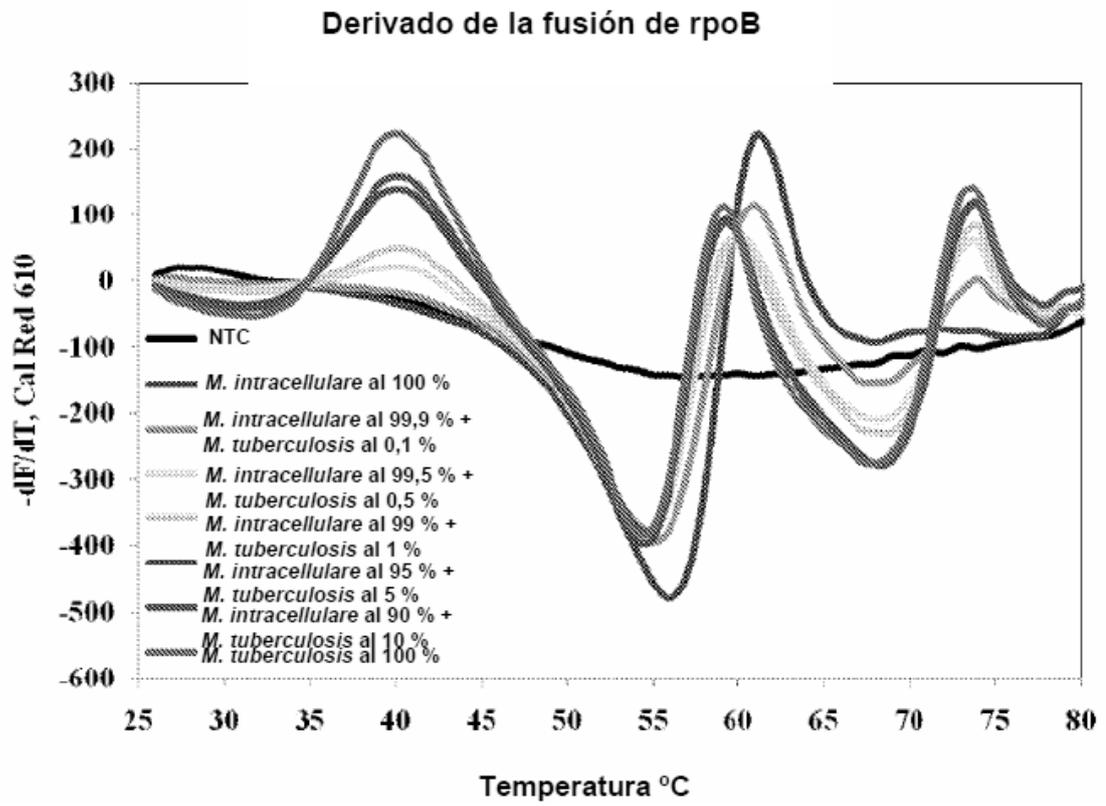


Figura 17D



**Figura 18A**

Derivado de la fusión solo de gyrB

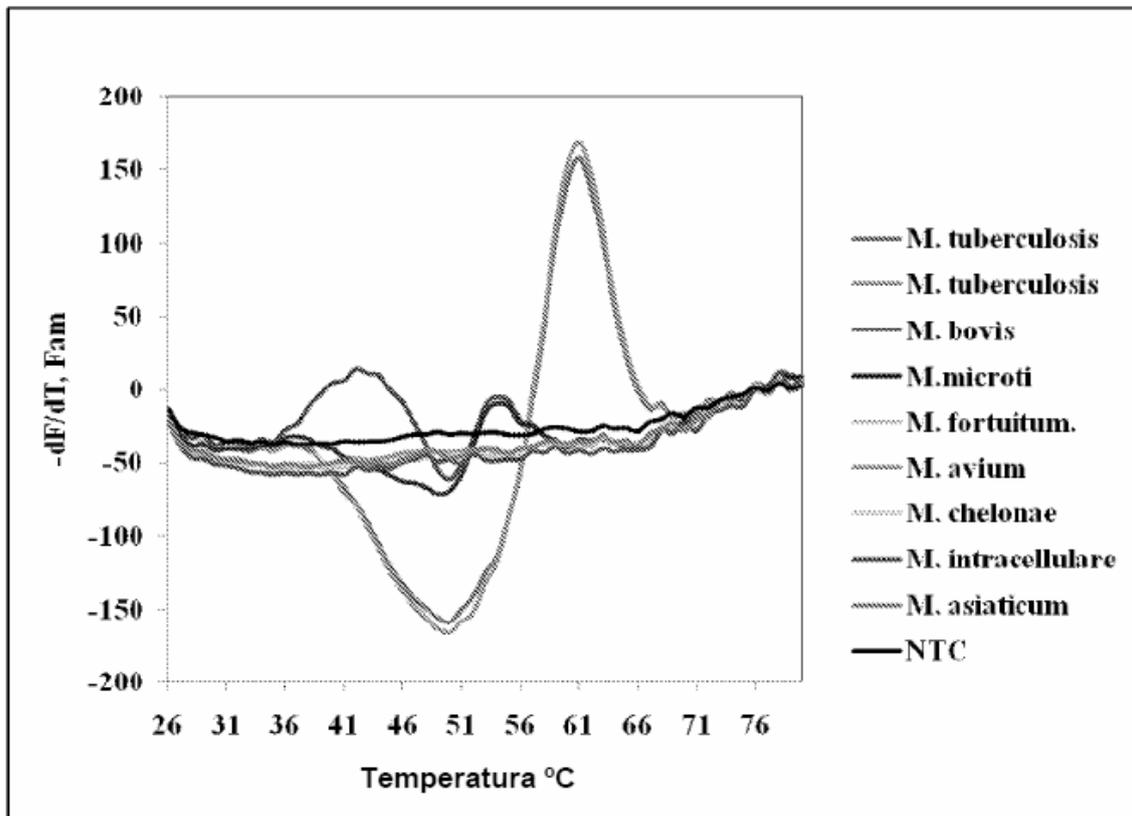


Figura 18B

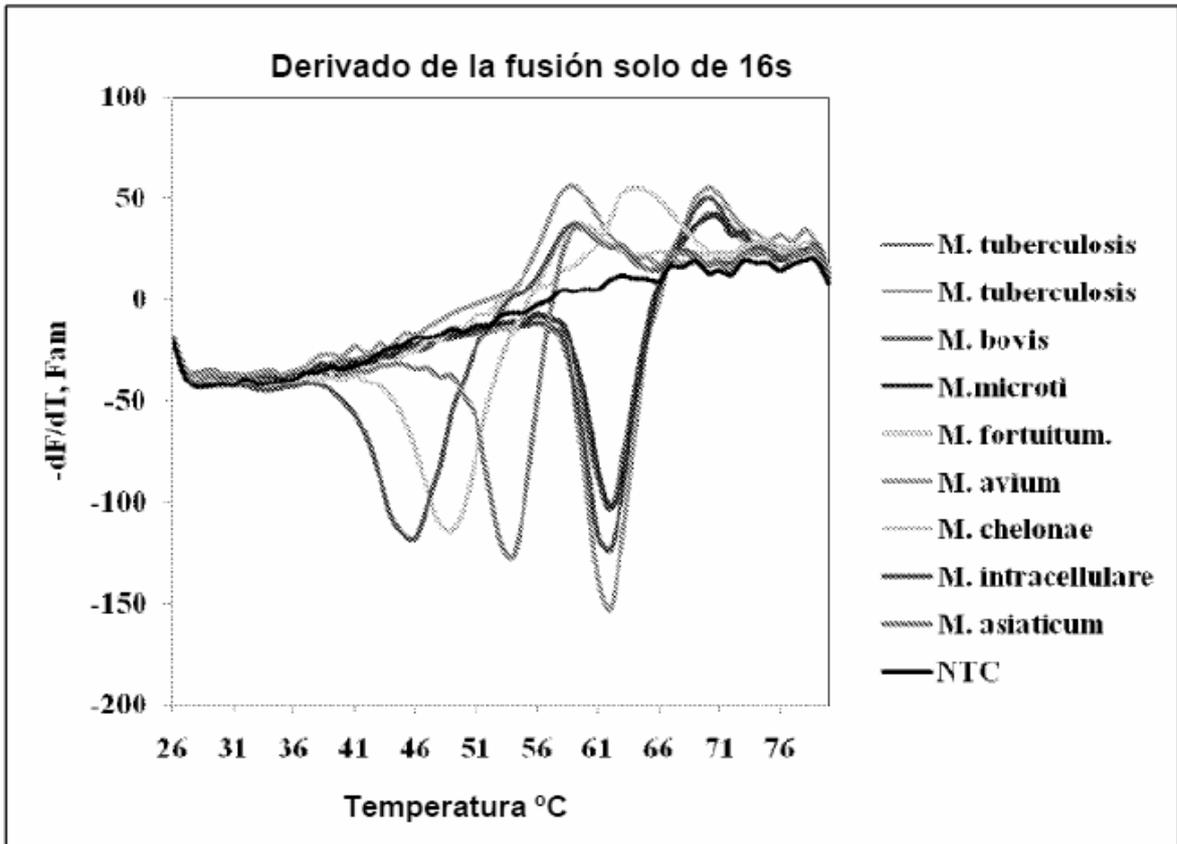


Figura 18C

