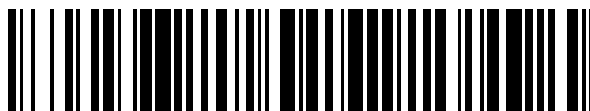


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 158**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/689** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2012 PCT/EP2012/076856**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13093106**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2012 E 12813030 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2794917**

54 Título: **Detección de cepas variantes mecA de Staphylococcus aureus resistentes a meticilina**

30 Prioridad:

**23.12.2011 EP 11306776**

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

**07.12.2018**

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX (100.0%)  
69280 Marcy-l'Etoile, FR**

72 Inventor/es:

**PAILLIER, FRANÇOIS;  
CHAMBON, CÉLINE y  
SAINT-PATRICE, CATHY**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 693 158 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Detección de cepas variantes *mecA* de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a la detección molecular de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina ("methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*", MRSA). Más en concreto, la invención se refiere a una detección mejorada de MRSA que incluye otras cepas que portan una variante del gen *mecA*.

**Antecedentes de la invención**

10 En 1961 se demostró por primera vez la existencia de una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a la metilicina. En la actualidad, *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina ("methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*", MRSA) es uno de los patógenos resistentes a antibióticos más extendidos que provocan infecciones hospitalarias y en colectividades. El surgimiento de cepas MRSA es debido a la adquisición e inserción de un elemento genético móvil, el módulo cromosómico estafilocócico *mec* ("Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*", *SCCmec*) en el cromosoma de cepas de *S. aureus* susceptibles. En efecto, este elemento *SCCmec* porta el gen *mecA*, que es responsable de la resistencia a la metilicina (módulo cromosómico estafilocócico *mec*, Ito *et al.*, 2001, Antimicrob. Agents Chemother., 45(5):1323-1336; Hiramatsu, *et al.*, 2001, Trends Microbiol., octubre, 9(10):486-493). El gen *mecA* codifica una proteína de unión a penicilina modificada denominada PBP2a o PBP2'. Al contrario que la PBP nativa, esta PBP2a tiene baja afinidad por los antibióticos de  $\beta$ -lactama y permite continuar la síntesis de la pared celular incluso en presencia de antibióticos de  $\beta$ -lactama.

20 El elemento *SCCmec* puede incorporarse en el cromosoma de *S. aureus* y otros estafilococos negativos a coagulasa, principalmente *S. epidermidis* y *S. haemolyticus*. El *SCCmec* se caracteriza por la presencia de repeticiones directas e invertidas terminales, un conjunto de genes recombinasa específicos de sitio (*ccrA* y *ccrB*), y el complejo génico *mecA* (Ito *et al.*, 1999, Antimicrob. Agents Chemother., 43:1449-1458; Katayama *et al.*, 2000, Antimicrob. Agents Chemother., 44:1549-1555). Se conoce el sitio de inserción de este módulo *SCCmec* del gen *mecA* en el genoma de *Staphylococcus aureus* y la secuencia se conserva (Ito *et al.*, 2001, Antimicrob. Agents Chemother., 45:1323-1336). Después de la inserción en el cromosoma de *S. aureus*, el *SCCmec* presenta una zona de unión del extremo izquierdo y una zona de unión del extremo derecho (véase la figura 1), con una región de la zona de unión del extremo izquierdo y una región de la zona de unión del extremo derecho circundantes, respectivamente, que incluye el módulo *SCCmec* y ADN cromosómico, en las que la secuencia *SCCmec* está contigua a la secuencia cromosómica de *S. aureus*. La secuencia de nucleótidos de las regiones circundantes a los límites izquierdo y derecho del ADN de *SCCmec* (concretamente, *attL* y *attR*, respectivamente), así como la de las regiones que rodean al sitio de integración del ADN de *SCCmec* (concretamente, *attBsc*, el sitio de unión al cromosoma bacteriano del ADN de *SCCmec*), han sido previamente analizadas. El análisis de la secuencia de los sitios de integración reveló que *attBsc* está localizado en el extremo 3' de un nuevo marco de lectura abierto ("open reading frame", ORF), *orfX*. El *orfX* codifica un polipéptido de 159 aminoácidos que recientemente se ha indicado que es una ARNr 23S metiltransferasa (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q6I7F2>). También se ha estudiado la organización de la región *mecA* de *SCCmec* (Oliveira, D.C., *et al.*, 2000, Antimicrob. Agents Chemother., 44(7):1906-1910).

40 Generalmente, en un ensayo de MRSA en un paciente se recoge un frotis nasal del paciente y se cultiva varias veces para determinar si está presente una cepa MRSA. Se están desarrollando métodos nuevos que permiten la identificación de MRSA directamente del frotis nasal y en un periodo de tiempo mucho más corto. También están desarrollándose nuevas muestras y muchos artículos demuestran interés en tomar muestras de varios sitios anatómicos del mismo paciente para aumentar la posibilidad de detectar portadores de MRSA. Los sitios pueden ser la nariz más la garganta, la axila, la ingle y/o el perineo (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* colonisation at different Body Sites: a Prospective, Quantitative Analysis, Mermel *et al.*, 2011, Journal of Clinical Microbiology).

45 La amplificación es una técnica muy conocida y se han desarrollado diversos métodos, que incluyen una amplificación basada en la transcripción, tal como la amplificación mediada por transcripción ("transcription-mediated amplification", TMA; patentes de EE. UU. n.ºs 5.766.849; 5.399.491; 5.480.784; 5.766.849; y 5.654.142) y la amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico ("nucleic acid sequence-based amplification", NASBA; documentos 5.130.238; 5.409.818; 5.654.142; y 6.312.928), y las tecnologías de amplificación de ácidos nucleicos por ciclación (termociclado), tal como la reacción en cadena de polimerasa (PCR; patentes de EE. UU. n.ºs 4.683.195; 4.965.188; 4.683.202) y la reacción en cadena de ligasa (LCR; patente de EE. UU. n.º 5.792.607). Los métodos de amplificación conocidos también incluyen la amplificación por desplazamiento de hebra ("strand displacement amplification", SDA), la replicación de secuencias autónoma (3SR), la Q- $\beta$  replicasa, y la amplificación por círculo rodante en cascada ("cascade rolling circle amplification", CRCA).

55 En la técnica también son muy conocidos los métodos de detección que utilizan ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos a menudo se marcan para diversos objetivos de detección. Por ejemplo, los métodos descritos en las patentes de EE. UU. n.ºs 4.486.539 (Kourlisky); 4.411.955 (Ward); 4.882.269 (Schneider); y 4.213.893 (Carrico), ilustran la preparación de sondas de detección marcadas para detectar secuencias de ácidos nucleicos específicas.

También se han descrito diseños de sondas para diferentes métodos de detección, tales como diana-captura, HPA, TaqMan, balizas moleculares e hibridación de "sandwich" (por ejemplo, patente de EE. UU. n.º 4.486.539, y patentes de EE. UU. n.ºs 4.751.177; 5.210.015; 5.487.972; 5.804.375; 5.994.076). Los expertos en la técnica conocen técnicas de hibridación de ácidos nucleicos y sus condiciones, y se han descrito, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Lab. Press, Dec. 1989; patentes de EE. UU. n.ºs 4.563.419 (Ranki) y 4.851.330 (Kohne), y en Dunn, *et al.*, Cell, 12, pp. 23-26 (1978), entre muchas otras publicaciones.

Se han descrito métodos moleculares anteriores desarrollados para detectar e identificar MRSA basándose en la detección del gen *mecA* y secuencias cromosómicas específicas de *S. aureus* (Saito *et al.*, 1995, J. Clin. Microbiol., 33:2498-2500; Ubukata *et al.*, 1992, J. Clin. Microbiol., 30:1728-1733; Murakami *et al.*, 1991, J. Clin. Microbiol., 29:2240-2244; Hiramatsu *et al.*, 1992, Microbiol. Immunol., 36:445-453). Sin embargo, en los ensayos basados en la detección solo de la zona de unión del módulo se han observado falsos positivos con aislados de *S. aureus* susceptibles a meticilina que contienen un pequeño fragmento del extremo derecho del SCCmec (véase Rupp, J. *et al.*, J. Clin. Microbiol., 44(6):2317 (2006)). Además, Ramakrishnan y Riccelli describen un método para detectar MRSA utilizando sondas oligonucleotídicas que contienen secuencias que son complementarias con regiones cerca de la zona de unión izquierda del sitio de inserción del módulo SCCmec, que incluyen parte de la secuencia del módulo SCCmec y parte de la secuencia de *S. aureus* en la región de inserción (la región de la zona de unión del extremo izquierdo) (publicación de patente n.º US20060057613).

Se han publicado los conceptos para determinar la resistencia a la meticilina que porta específicamente *S. aureus*:

- el concepto de amplificación de la zona de unión del extremo derecho de SCCmec (Hiramatsu *et al.*, documento W097/31125; documento EP 0 887 424; patente de EE. UU. n.º 6.156.507; y además Huletsky y Rossbach, documento WO02/099034 (2002); Huletsky *et al.*, Clin. Microbiol., 42(5):1875-1884 (2004)),

- el concepto de inmunoenriquecimiento descrito por Francois y colaboradores (Francois, P. *et al.*, J. Clin. Microbiol., 41(1):254-260 (2003); documento WO02082086), en el que al inmunoenriquecimiento le sigue una amplificación de tres marcadores (gen *mecA*, marcador específico de *S. aureus*, y marcador específico de *S. epidermidis*),

- la combinación de la amplificación de la zona de unión del extremo derecho de SCCmec y la amplificación de *mecA* (Jay, *et al.*, documento US20090203013; documento WO2009085221).

El concepto de la zona de unión del extremo derecho de SCCmec se basa en la amplificación de una región que cubre la región de la zona de unión del extremo derecho del sitio de integración de SCCmec. El principio es el siguiente: el módulo SCCmec siempre se integra en el cromosoma de *S. aureus* cadena arriba de un marco de lectura abierto específico de *S. aureus* denominado *orfX*; el ensayo de amplificación (por ejemplo, PCR) combina múltiples cebadores directos localizados en la parte derecha del módulo ("región de la zona de unión del extremo derecho" del módulo SCCmec), un cebador inverso y una sonda, ambos localizados en el *orfX* cromosómico de *S. aureus*, concretamente cadena abajo de la zona de unión del extremo derecho de SCCmec con *orfX* ("región de la zona de unión del extremo derecho" de *orfX*). Hiramatsu *et al.* describen un ensayo con dos cebadores directos en la región de la zona de unión del extremo derecho del módulo para amplificar los principales tipos de SCCmec descritos en ese momento (un cebador para los tipos I y II de SCCmec y un segundo cebador para el tipo III). Huletsky *et al.* indican que no pueden detectarse varias cepas de MRSA si se emplean solo los dos cebadores directos descritos por Hiramatsu, y determinaron nuevos tipos de módulos, denominados tipos MREJ, que presentan variaciones en la secuencia en la parte derecha del módulo SCCmec. Un ensayo disponible en el mercado (Infectio Diagnostics Inc.) combina cinco cebadores directos localizados en la parte derecha del módulo (un cebador se diseñó para la detección de los tipos i y ii de MREJ, y los otros cuatro para los tipos iii, iv, v y vii de MREJ), un cebador inverso localizado en el *orfX*, y tres sondas genéricas que cubren la misma porción de la región de *orfX* que son necesarias para identificar los variantes de *orfX* identificados. Este ensayo se realiza con PCR a tiempo real. Sin embargo, la especificidad de este ensayo, tal como se indica (Huletsky *et al.*, 2004) demuestra que 4,6% de MSSA (26 de los 569 ensayados) no fueron identificados. También se ha indicado un resultado falso positivo con otro ensayo del mercado que emplea un ensayo de PCR de locus único (zona de unión del extremo derecho del módulo SCCmec-*orfX*) (Rupp, J., *et al.*, J. Clin. Microbiol., (44)6:2317 (2006)).

El documento US20090203013 trata de las fuentes primarias de falsos positivos de MRSA y proporciona un ensayo mejorado para detectar MRSA que no han podido ser detectados por los ensayos disponibles en la época. Esta solicitud indica que la identificación de falsos positivos por los métodos moleculares previos puede explicarse en algunos casos por la presencia en cepas MSSA de un fragmento del extremo derecho de SCCmec residual tras la delección de una región cromosómica que contiene *mecA* o la presencia de un SCCmec que no contiene *mecA*. Además, si indica que una parte de los falsos positivos puede ser debida a una amplificación no específica; en efecto, debido a que el cebador inverso y las sondas están localizadas en el *orfX*, que es común a MRSA y MSSA, la asociación no específica del cebador o cebador directos al cromosoma de MSSA conducirá a la amplificación y la detección de MSSA. La solicitud estudia ambas fuentes de falsos positivos y proporciona un ensayo mejorado. Se ha comercializado un ensayo que utiliza este principio (NucliSENS EasyQ® MRSA, bioMérieux, SA, Marcy l'Etoile, Francia).

Previamente, en ensayos para la detección de *S. aureus* resistente a meticilina, se determinaba si el gen *mecA* estaba presente en el módulo *SCCmec*, lo cual conducía a que la cepa sea resistente a la meticilina, o se determinaba si el gen *mecA* estaba ausente (escisión del módulo o no módulo), con lo que se concluía que la cepa era susceptible a la meticilina. Tomando en cuenta las numerosas secuencias disponibles en los bancos de datos de acceso público para el gen *mecA*, procedente de MRSA u otros patógenos resistentes a meticilina, se demostró que el gen *mecA* está bien conservado y solo se encontraron algunas mutaciones concretas.

En fechas recientes, se detectó un *S. aureus* resistente a meticilina que carecía de *mecA* mediante secuenciación de micromatrices y PCR convencional (Shore, A.C. *et al.*, Antimicrob. Agents Chemother., Doi:10.1128/AAC.00187-11 (2 de junio de 2011); y García-Álvarez, L. *et al.*, Lancet, doi:10.1016/S1473-3099(11)70126-8 (3 de junio de 2011), Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine population in the UK and Denmark: a descriptive study). La secuenciación del genoma completó reveló un elemento *SCCmec* de 30 kb que tiene un *blaZ-mecA-mecRI-mecI* altamente divergente, e indicó que el elemento *mec* presente en el elemento *SCCmec* presenta 70% de identidad de secuencia con homólogos de *mecA* de *S. aureus*; además, el elemento *SCCmec* es casi idéntico al *SCCmec* de tipo XI previamente identificado (secuencia de tipo 425 de la cepa LGA251 de MRSA bovino listado en el sitio web de the International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements). El elemento *SCCmec* está integrado en la misma posición de nucleótidos dentro de *orfX* que todos los demás elementos *SCCmec*. La cepa incluye además un complejo *mec* de clase E, un complejo de módulo cromosómico de recombinasa ("cassette chromosome recombinase", *ccr*) de tipo 8 que consiste en *ccrA1-ccrB3*, un operón de resistencia al arsénico y repeticiones directas flanqueantes. Los presentes métodos de detección no identifican esta cepa como MRSA.

Shore *et al.* utilizan la cepa FR823292 como cepa de referencia y emplean los cebadores *mecA\_M10/0061*. García-Álvarez *et al.* estudiaron un *mecA* divergente en el genoma de LGA251, y este variante de *mecA* está localizado en un nuevo módulo denominado "SCCmec de tipo XI". Emplearon la cepa LGA251 como cepa de referencia y utilizaron los cebadores *mecA\_LGA2S1*. De hecho, las dos publicaciones se refieren al mismo tema. Ambos variantes de *mecA* comparten un porcentaje de similitud muy alto (99%), y al mismo tiempo muestran una similitud global débil con todas las secuencias *mecA* conocidas hasta la fecha.

A medida que se identifican nuevas cepas y subtipos, son necesarios medios para detectar dichas cepas y subtipos. Esto resulta particularmente importante cuando los ensayos que existen en la actualidad no los detectan de manera fortuita y, por tanto, pueden ofrecer resultados falsos negativos. La presente invención satisface esta necesidad con respecto a la detección de cepas que contienen un variante de *mecA* proporcionando un ensayo que puede detectar dichas cepas. Además, esta nueva invención confirma, en el mismo ensayo, la presencia de una cepa de *S. aureus* y de un gen de resistencia a la meticilina. Este ensayo puede utilizarse por sí solo o en combinación con los ensayos existentes para otros tipos de *SCCmec*.

### Sumario de la invención

La presente invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas. La invención proporciona un método para amplificar y detectar en una muestra un *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) que comprende una inserción de un módulo *SCCmec* dentro del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, en el que el módulo *SCCmec* comprende un elemento variante de *mecA*, comprendiendo dicho método:

realizar sobre la muestra una única reacción de amplificación utilizando un conjunto de oligonucleótidos que comprende:

a. un primer oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una región de *orfX* del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, y

b. un segundo oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una región de un variante de *mecA*, y

c. un tercer oligonucleótido capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del MRSA entre la región de hibridación del primer oligonucleótido y la región de hibridación del segundo oligonucleótido,

en el que cada uno del primer oligonucleótido y el segundo oligonucleótido está orientado de modo que, bajo las condiciones de la amplificación, si la muestra contiene el MRSA, la región del MRSA entre la región de hibridación del primer oligonucleótido y la región de hibridación del segundo oligonucleótido se amplifica, y si la muestra contiene el MRSA, entonces se detecta la hibridación del tercer oligonucleótido.

En la presente también se describe un método para amplificar en una muestra un *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) que comprende una inserción de un módulo *SCCmec* dentro del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, en el que el módulo *SCCmec* comprende *mecA* o un elemento variante de *mecA*, comprendiendo dicho método:

realizar sobre la muestra una reacción de amplificación utilizando:

a. un primer conjunto de oligonucleótidos que comprende:

1) un primer oligonucleótido de variante de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una primera región de un elemento variante de *mecA*, y

5 2) un segundo oligonucleótido de variante de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una segunda región de un elemento variante de *mecA*; y

b. un segundo conjunto de oligonucleótidos que comprende:

1) un primer oligonucleótido de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una primera región de *mecA*, y

10 2) un segundo oligonucleótido de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una segunda región de *mecA*,

en el que cada uno del primer oligonucleótido y el segundo oligonucleótido está orientado de modo que, bajo las condiciones de la amplificación, si la muestra contiene el MRSA, la región del MRSA entre la región de hibridación del primer oligonucleótido y la región de hibridación del segundo oligonucleótido se amplifica.

15 La presente invención proporciona además un kit para amplificar y detectar un *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) que comprende una inserción de un módulo *SCCmec* dentro del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, en el que el módulo *SCCmec* comprende un elemento variante de *mecA*, comprendiendo dicho kit un primer conjunto de oligonucleótidos que comprende:

a. un primer oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una región de *orfX* del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, y

20 b. un segundo oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una región de un variante de *mecA*, y

c. un tercer oligonucleótido capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del MRSA entre la región de hibridación del primer oligonucleótido y la región de hibridación del segundo oligonucleótido,

en el que:

25 - el primer oligonucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:9 y 10; y

- el segundo primer oligonucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:6, 7, 14, 15, 16, 17, 20 y 21, y

30 - el tercer primer oligonucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico indicada como SEQ ID NO:8, 11, 18 y 19.

También se describe un kit para amplificar en una muestra un *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) que comprende una inserción de un módulo *SCCmec* dentro del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, en el que el módulo *SCCmec* comprende *mecA* o un elemento variante de *mecA*, comprendiendo dicho kit:

a) un primer conjunto de oligonucleótidos que comprende:

35 1) un primer oligonucleótido de variante de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una primera región de un elemento variante de *mecA*, y

2) un segundo oligonucleótido de variante de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una segunda región de un elemento variante de *mecA*; y

b) un segundo conjunto de oligonucleótidos que comprende:

40 1) un primer oligonucleótido de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una primera región de *mecA*, y

2) un segundo oligonucleótido de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una segunda región de *mecA*.

#### Breve descripción de los dibujos

45 La figura 1 muestra, en general, la región del cromosoma de MRSA con el módulo *SCCmec* insertado, indicándose las zonas de unión del extremo izquierdo y derecho.

La figura 2 muestra, en general, la región del cromosoma de MRSA con el módulo SCCmec insertado que porta un variante de *mecA* (*mecA*<sub>LGA251</sub>).

### Descripción detallada de la invención

5 Tal como se analiza en la presente, la presente invención proporciona la identificación de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina que incluyen un gen *mecA* variante (que generalmente no se detectan con los kits de detección de MRSA disponibles en el mercado en la actualidad) y que está dispuesto estructuralmente de tal modo que una única reacción de amplificación puede amplificar una porción pertinente de *mecA* y una zona de unión de un extremo en el punto de inserción de un módulo SCCmec en el cromosoma de *S. aureus*. La presente invención trata sobre una fuente recién descubierta de resultados falsos negativos y proporciona un ensayo mejorado.

10 A menos que se indique lo contrario, todos los términos y expresiones técnicos y científicos empleados en la presente tienen el mismo significado que el que entienden habitualmente los expertos en la técnica a la cual pertenece la invención descrita. Aunque pueden emplearse muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente en la práctica o el ensayo de la presente invención, se describen los métodos, dispositivos y materiales preferidos.

15 Tal como se emplean en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un/una" y "el/la" incluyen los referentes en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Las cepas identificadas por la presente invención son resistentes a meticilina, pero no portan el gen *mecA* clásico que, hasta la fecha, se sabía que estaba bien conservado. En este caso, la resistencia a meticilina es conferida por un nuevo gen variante de *mecA*. Un variante de *mecA* documento se denomina en las publicaciones de diversa forma, como *mecA*<sub>LGA251</sub>, *mecA*<sub>M10/0061</sub>, homólogo de *mecA*, y *mecA*<sub>variante nuevo</sub> (recientemente se ha propuesto denominar a este variante como "mecC" (Ito, T. *et al.*, Guidelines for Reporting Novel *mecA* Gene Homologues, Agents Chemother., doi:10.1128/AAC.01199-12)); sin embargo, con la presente invención pueden detectarse otros variantes de *mecA*. Tal como se emplea en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, la expresión "variante de *mecA*" se emplea para referirse a cualquier gen variante de *mecA* que confiere resistencia a la meticilina y que puede detectarse por medio de un método reivindicado, en particular con una reacción de amplificación que, con un único conjunto de cebadores, amplifica una región que incluye una porción pertinente de un variante de *mecA* (es decir, suficiente para identificarlo como un variante de *mecA*) y una zona de unión de un extremo en el punto de inserción de un módulo SCCmec en el cromosoma de *S. aureus*. Se advertirá que, a medida que las tecnologías de la amplificación se vayan desarrollando, será posible lograr amplicones más largos, de modo que podrán diseñarse conjuntos de cebadores para la detección de un gen variante de *mecA* para que se hibriden en sitios alejados de esta región diana que comprende una porción pertinente de un gen variante de *mecA* y una zona de unión de un extremo del módulo SCCmec.

El tamaño de los módulos SCCmec en cepas de MRSA previamente estudiadas es divergente, pero en general se ha descubierto que el gen *mecA* tiene de aproximadamente 8000 a 15.000 pb desde el cromosoma de *S. aureus* en la dirección del *orfX* (a veces indicado en la presente como "cadena abajo") y más largo en la otra dirección (véase la figura 1 y la figura 2a). En el nuevo SCCmec de tipo XI, se ha descubierto que el gen variante de *mecA* está colocado en un lugar más cercano a *orfX*, siendo la distancia de tan solo aproximadamente 1500 pb (véase la figura 2b). Aunque la aplicación de diseños de amplificación de MRSA tradicionales podría predecir un diseño de ensayo en dos partes (detección del gen variante de *mecA*, además de la detección de la zona de unión), los solicitantes, por el contrario, consideraron y reconocieron la utilidad potencial de la distancia más corta desde el gen variante de *mecA* al *orfX*. Así, la presente invención amplifica, de modo ventajoso, la región entre el gen variante de *mecA* y una región de la zona de unión de un extremo del cromosoma de *S. aureus* (es decir, a través de la zona de unión de un extremo) directamente empleando un cebador en el gen variante de *mecA* y otro en la región del cromosoma de *S. aureus* en la región de la zona de unión de un extremo (véase la figura 2, por ejemplo, a través de la zona de unión del extremo derecho). Aunque sigue siendo un amplicón largo y poco convencional, los solicitantes han descubierto que este diseño funciona sorprendentemente bien. Además, esta nueva invención resuelve el problema de la baja especificidad, porque solo se necesita una amplificación y esta amplificación confirma, en la misma reacción, la presencia de una cepa de *S. aureus* y de un gen variante de resistencia a la meticilina.

La presente invención proporciona un método para amplificar y detectar en una muestra un *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) que comprende una inserción de un módulo SCCmec dentro del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, en el que el módulo SCCmec comprende un elemento variante de *mecA*, comprendiendo dicho método:

realizar sobre la muestra una única reacción de amplificación utilizando un conjunto de oligonucleótidos que comprende:

- 55 a. un primer oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una región de *orfX* del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, y
- b. un segundo oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una región de un variante de *mecA*, y

c. un tercer oligonucleótido capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del MRSA entre la región de hibridación del primer oligonucleótido y la región de hibridación del segundo oligonucleótido,

en el que cada uno del primer oligonucleótido y el segundo oligonucleótido está orientado de modo que, bajo las condiciones de la amplificación, si la muestra contiene el MRSA, la región del MRSA entre la región de hibridación del primer oligonucleótido y la región de hibridación del segundo oligonucleótido se amplifica. La región del ADN cromosómico de *S. aureus* puede estar en una región de la zona de unión del extremo derecho.

Los oligonucleótidos de la presente invención que se hibridan específicamente con una diana pueden seleccionarse entre los que se hibridan selectivamente, en las condiciones de hibridación seleccionadas, con su diana, es decir, que se unen con su diana o dianas previstas, pero no con aquello que no es la diana. Las condiciones de hibridación/amplificación pueden seleccionarse con una rigurosidad apropiada para lograr la selectividad, tal como se conoce en la técnica (por ejemplo, Sambrook y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ª edición (2001)). Pueden realizarse ligeras modificaciones para seleccionar los oligonucleótidos, con la condición de que las condiciones de reacción permitan que el oligonucleótido modificado se hibride específicamente con la diana o dianas.

Un primer oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una región del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* en una región de la zona de unión de un extremo, y un segundo oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una región de un variante de *mecA* pueden actuar cada uno como cebador, y cada uno está orientado de modo que, tras la hibridación con su ácido nucleico diana específico, y tras el inicio de una reacción de amplificación que incluye el cebador, se forma un amplicón que incluye la región del MRSA entre la región de hibridación del primer oligonucleótido y la región de hibridación del segundo oligonucleótido. Esta reacción está diseñada para la amplificación a través de una zona de unión de un extremo del SCC*mec* en su inserción dentro del cromosoma de *S. aureus* (es decir, está lo suficientemente cerca de la zona de unión para que una reacción de amplificación pueda extenderse a través de la zona de unión). Así, una pareja de cebadores para un variante de *mecA* útil para amplificar una zona de unión generalmente se hibridará con dos regiones, una en el variante de *mecA* y la otra en una región cromosómica de *S. aureus*, y así rodea a la zona de unión, y cada cebador estará orientado para que se hibride de tal modo que sea capaz de dirigir la amplificación en la dirección 5'-3' hacia la zona de unión. Generalmente, el cebador para el variante de *mecA* se diseña para que se hibride dentro de 1600 nt, 1550 nt, 1500 nt, 1450 nt, 1400 nt, 1350 nt, 1300 nt, 1200 nt, 1100 nt, 1000 nt, 900 nt, 800 nt, 700 nt, 600 nt, 500 nt, 400 nt, 350 nt, 300 nt, 250 nt, 200 nt, 150 nt, 100 nt, 50 nt, 30 nt, 25 nt, 20 nt, etc. de la zona de unión; sin embargo, a medida que las nuevas tecnologías permitan obtener amplicones más largos, podrán diseñarse cebadores que se hibriden a mayor distancia de la zona de unión. El cebador que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una región de un variante de *mecA* generalmente se diseñará para que se hibride a mayor distancia de la zona de unión que el cebador que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una región del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* en una región de la zona de unión de un extremo, debido a la organización del SCC*mec* que contiene un gen variante de *mecA* y la distancia del gen variante de *mecA* de la zona de unión.

El conjunto de oligonucleótidos para la amplificación del variante de *mecA-orfX* puede comprender además un tercer oligonucleótido capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del MRSA entre la región de hibridación del primer oligonucleótido y la región de hibridación del segundo oligonucleótido, y cuando la muestra contiene el MRSA, entonces se detecta la hibridación del tercer oligonucleótido. Este oligonucleótido puede actuar como sonda para detectar un producto de la amplificación y, por tanto, se selecciona para que sea capaz de hibridarse específicamente con una región entre la región de hibridación del primer oligonucleótido y la región de hibridación del segundo oligonucleótido. En ciertas realizaciones, dicha sonda puede hibridarse específicamente con una región del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, tal como una región de *orfX*. En otra realización, una sonda puede hibridarse específicamente con una región de la región de zona de unión del extremo derecho del ADN del módulo SCC*mec* (por ejemplo, dentro de secuencias *blaZ*), y en otra realización, una sonda puede hibridarse específicamente con una región del variante de *mecA*. La amplificación puede detectarse mediante cualquier medio seleccionado. Por ejemplo, este tercer oligonucleótido puede marcarse mediante varios medios y con cualquiera de diversos métodos. Así, si la muestra contiene el MRSA se produce la amplificación del ácido nucleico entre los dos cebadores, y el tercer oligonucleótido, que puede ser una sonda marcada, puede hibridarse con el amplicón. La hibridación del tercer oligonucleótido puede detectarse mediante de cualquier medio conocido. Como alternativa, puede emplearse un tinte intercalante para detectar la amplificación a partir de los dos cebadores. Si se emplea una sonda, la sonda puede diseñarse para que se hibride específicamente con una región de la región de zona de unión del extremo derecho del ADN del módulo SCC*mec*. Por ejemplo, la sonda puede diseñarse para que se hibride específicamente con una región del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, tal como una región de *orfX* del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*. Como alternativa, una sonda puede diseñarse para que se hibride específicamente con una región del variante de *mecA*.

Puede determinarse la presencia o la ausencia de cualquier diana dentro de la presente invención realizando cualquier ensayo que proporcione la detección del producto, por ejemplo, si se emplea una sonda marcada, la detección del marcador hibridado se realizará mediante un dispositivo de detección apropiado. En esta realización, la falta de una señal detectable indica la ausencia de la diana; la percepción de una señal detectable indica la

presencia de la diana.

Los ejemplos de un primer oligonucleótido, o cebador, capaz de hibridarse específicamente con una región del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* en una región de la zona de unión de un extremo pueden incluir, pero no se limitan a un oligonucleótido que se hibrida específicamente en la región de *orfX*. Los ejemplos de dicho oligonucleótido incluyen las SEQ ID NO:9 y 10. Los ejemplos de un segundo oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una región de un variante de *mecA* pueden incluir, pero no se limitan a una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:6, 7, 16, 17 y 21. Estos ejemplos específicos son particularmente útiles como cebadores directos (es decir, para dirigir la amplificación hacia la zona de unión del extremo derecho de SCCmec). Los ejemplos de un tercer oligonucleótido, que puede emplearse como sonda, capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del MRSA entre la región de hibridación del primer oligonucleótido (que se hibrida dentro del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*) y la región de hibridación del segundo oligonucleótido (que se hibrida dentro de una región del variante de *mecA*) pueden incluir, pero no se limita a una secuencia de ácido nucleico indicada como SEQ ID NO:8, 18 y 19.

La estructura genómica del MRSA ya ha sido caracterizada previamente. Tal como se emplea en las reivindicaciones, un "módulo SCCmec" (a veces denominado "ADNmec", por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 6.156.507) tiene la definición que se conoce en la técnica, es decir, un ADN adventicio integrado que existe en un cromosoma de MRSA o MR-CNS y que incluye el complejo génico *mec*, un conjunto de genes de recombinasa específicos de sitio (*ccrA* y *ccrB*), y repeticiones directas e invertidas terminales (en ambos extremos 3' y 5'); tal como se emplea en la memoria descriptiva, esa expresión incluye cualquier variación de SCCmec que se encuentre en las cepas que portan un variante de *mecA*. Un "gen *mecA*" incluye todas las secuencias necesarias para conferir resistencia a la meticilina (es decir, que codifican PBP2a o PBP2' (proteína de unión a penicilina, "Penicillin Binding Protein")).

Tal como se conoce en la técnica, la inserción del módulo SCCmec en el cromosoma de *S. aureus* crea dos zonas de unión y dos correspondientes zonas de unión del ADN de SCCmec con el ADN cromosómico de *S. aureus*, en la que la secuencia de SCCmec está contigua a la secuencia cromosómica de *S. aureus*. Por tanto, estas zonas de unión están localizadas en los extremos izquierdo y derecho del módulo SCCmec (véase la figura 1). Estas dos regiones han sido denominadas "zona de unión SCCmec-cromosoma derecha" y "zona de unión SCCmec-cromosoma izquierda" por Ito *et al.* (Antimicrob. Agents Chemother., mayo, 2001, 45(5):1323-1336, "Structural Comparison of three Types of Staphylococcal Cassette Chromosome mec Integrated in the chromosome in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*"), y en la presente se denominan "zona de unión del extremo derecho" y "zona de unión del extremo izquierdo", respectivamente. En la zona de unión del extremo derecho, la secuencia genómica de *S. aureus* que linda con el módulo SCCmec es el gen *orfX*, que en algunas referencias se denomina "IntM". Tal como se emplea en las reivindicaciones, una "región de la zona de unión de un extremo" es una región del módulo SCCmec o del ácido nucleico cromosómico de *S. aureus* dentro de una distancia de la zona de unión del extremo derecho o izquierdo, o sitio de inserción, de modo que un cebador que se hibrida en SCCmec (por ejemplo, región J3) o *orfX* puede, en una reacción de extensión con cebadores o una reacción del tipo de la transcripción (por ejemplo, NASBA o TMA), extenderse a través de esa zona de unión, por ejemplo, dentro de 600 nt, 550 nt, 500 nt, 450 nt, 400 nt, 350 nt, 300 nt, 250 nt, 200 nt, 150 nt, 100 nt, o 50 nt (en cualquier dirección) de la zona de unión. Las distancias útiles pueden variar dependiendo de la tecnología de amplificación utilizada. Por tanto, una "zona de unión de un extremo", dependiendo del contexto utilizado, puede indicar una región dentro del ADN de SCCmec o una región dentro del ADN cromosómico de *S. aureus*; ambos usos se refieren a dicho ADN dentro de una distancia de la zona unión de modo que un cebador seleccionado de modo apropiado que se hibrida en SCCmec (por ejemplo, región J3) o *orfX* puede, bajo condiciones de amplificación o extensión convencionales y apropiadas, ser extendido o transcrito en la dirección de la zona de unión y a través de la zona de unión. Es decir, "una región de la zona de unión de un extremo del módulo SCCmec" sería una región dentro del ADN de SCCmec cercana a su límite, o sitio de integración, con el ADN cromosómico de *S. aureus*; y "una región de la zona de unión de un extremo de *orfX*" sería una región dentro del ADN de *orfX* cercana a su límite con el ADN de SCCmec (un sitio de integración de SCCmec). De modo similar, "una región de la zona de unión de un extremo del ADN cromosómico de *S. aureus*" sería una región dentro del ADN cromosómico de *S. aureus* cercana a un límite con el ADN de SCCmec. Como alternativa, esta región también puede denominarse ADN cromosómico de *S. aureus* en la región de la zona de unión de un extremo de SCCmec. Así, la "región de la zona de unión del extremo derecho" se refiere a la región que rodea a la zona de unión en el lado derecho (o cadena abajo) del módulo SCCmec, y la "región de la zona de unión del extremo izquierdo" se refiere a la región que rodea a la zona de unión en el lado izquierdo (o cadena arriba) del módulo SCCmec (véase la figura 1).

De modo ventajoso, se puede realizar una reacción de amplificación para detectar la presencia de cepas de MRSA previamente caracterizadas (que contienen el gen *mecA* descrito originariamente) empleando métodos conocidos, tales como un método que comprende detectar la zona de unión de la inserción SCCmec y secuencias *mecA* (concretamente, Jay, *et al.*), junto con una amplificación para detectar las cepas recién descubiertas que portan un variante de *mecA*. Esta reacción de amplificación y detección puede realizarse, por ejemplo, en recipientes distintos o en un único recipiente, tal como una reacción múltiplex. Así, además de la reacción para detectar un variante de *mecA*, un ensayo puede incluir una reacción para detectar, por ejemplo, una región de zona de unión de un patrón de inserción del módulo SCCmec (es decir, como se describe para SCCmec de tipos I-X), un patrón del gen *mecA* (es decir, como se describe para SCCmec de tipos I-X) y/o una región cromosómica específica de *S. aureus*.



- "Amplificar una porción de ADN de *mecA*" significa realizar una reacción de amplificación en una muestra que produce un producto de la amplificación que incluye secuencias que se corresponden con cualquier porción de un gen *mecA*, por ejemplo, la región entre los cebadores que comprende la secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO:12 y 13. Por ejemplo, un cebador puede comprender una secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO:12 y 13. Pueden utilizarse cebadores que comprenden estas secuencias y cebadores que consisten fundamentalmente en estas secuencias, así como cebadores que consisten en esas secuencias. La amplificación puede detectarse, por ejemplo, utilizando una sonda que comprende una secuencia de ácido nucleico entre los ácidos nucleicos diana de los cebadores, o empleando un tinte intercalante. Los cebadores y las sondas pueden diseñarse con facilidad para la hibridación con la secuencia de *mecA* conocida.
- 5
- 10 Zona de unión. En la presente también se describe un método que, además de amplificar el variante de *mecA*, si está presente, puede comprender además amplificar un *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) que comprende una inserción de un módulo SCC*mec* dentro del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, en el que el módulo SCC*mec* comprende un *mecA*, mediante la utilización, en una reacción de amplificación, de un segundo conjunto de oligonucleótidos para la amplificación de la zona de unión del extremo derecho del módulo SCC*mec* con el ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, comprendiendo dicho segundo conjunto de oligonucleótidos:
- 15
- a. un primer oligonucleótido de zona de unión que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* en la región de la zona de unión del extremo derecho; y
- b. un segundo oligonucleótido de zona de unión que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región de la región de la zona de unión del extremo derecho del módulo SCC*mec* del MRSA que comprende un *mecA*,
- 20
- en el que cada uno del primer oligonucleótido de zona de unión y el segundo oligonucleótido de zona de unión está orientado de tal forma que, bajo las condiciones de la amplificación, si la muestra contiene el MRSA que comprende un *mecA*, la zona de unión derecha se amplifica. El segundo conjunto de oligonucleótidos puede comprender además un tercer oligonucleótido de zona de unión que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del MRSA entre la región de hibridación del primer oligonucleótido de zona de unión y la región de hibridación del segundo oligonucleótido de zona de unión, en el que si la muestra contiene el MRSA que comprende la zona de unión del extremo derecho, entonces se detecta la hibridación del tercer oligonucleótido de zona de unión.
- 25
- 30 El tercer oligonucleótido de zona de unión puede ser una sonda. El tercer oligonucleótido de zona de unión puede tener una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región de la región de la zona de unión del extremo derecho del módulo SCC*mec*, o puede tener una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de *orfX*. Como alternativa, puede realizarse un método de detección, tal como el uso de un tinte intercalante. El primer oligonucleótido de zona de unión, que puede actuar como cebador de amplificación, puede tener una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de *orfX*.
- 35
- Las sondas y los cebadores utilizados en cualquier reacción de esta invención son capaces de hibridarse específicamente con un ácido nucleico diana. La hibridación específica es conocida en la técnica y, generalmente, se logra por medio de obtener una elevada similitud o identidad del ácido nucleico de la sonda/cebador con el ácido nucleico diana y/o por medio del uso de condiciones de hibridación rigurosas (por ejemplo, condiciones rigurosas de temperatura y/o sales). La hibridación específica proporciona una hibridación selectiva con la diana dentro de la reacción.
- 40
- Generalmente, para las reacciones de amplificación distintas a la amplificación de los ácidos nucleicos de variante de *mecA-orfX* (tales como para amplificar una zona de unión, un *mecA* no variante y/o una región cromosómica de *S. aureus*), el cebador se selecciona de modo que el producto de la amplificación sintetizado mediante su utilización y un segundo cebador (localizado en una secuencia genómica de *S. aureus*) tengan una longitud de aproximadamente 100 a 350 nt. Aunque la amplificación con PCR puede diseñarse para generar amplicones más largos o más cortos (por ejemplo, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 nt o más largos), las longitudes preferidas de los amplicones para las reacciones basadas en la transcripción (por ejemplo, NASBA o TMA) o las reacciones de tipo PCR para la detección de los genes cromosómicos de *S. aureus*, la zona de unión o *mecA* en la presente invención tendrán una longitud de aproximadamente 100 a 300 nt (por ejemplo, 150, 200, 250, 300 nt). Además, para una reacción de amplificación múltiple, tanto basada en la transcripción como basada en PCR, para estas dianas es preferible un amplicón en el intervalo de 100 a 300 nt o más cortos para potenciar la sensibilidad del ensayo. Se advierte que la amplificación que emplea un primer oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una región del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* en una región de la zona de unión de un extremo, y un segundo oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una región de un variante de *mecA*, empleará un amplicón más largo que el que se emplea generalmente en otras amplificaciones que forman parte del presente ensayo. También se advierte que, a medida que los métodos de amplificación se sigan desarrollando y perfeccionando, será posible preparar amplicones más largos que finalmente serán habituales y estos se incluyen en la presente invención.
- 45
- 50
- 55
- 60

Un cebador orientado de tal forma que, "bajo las condiciones de la amplificación, la zona de unión se amplifica" incluye un cebador orientado de tal forma que, tras su hibridación con su ácido nucleico diana específico y tras iniciar una reacción de amplificación que incluye el cebador, se forma un amplicón que incluye la zona de unión. Esta reacción se diseña para que se produzca la amplificación a través de la zona de unión (es decir, está lo suficientemente cerca de la zona de unión para que una reacción de amplificación típica pueda extenderse a través de la zona de unión). Así, una pareja de cebadores útiles para amplificar una zona de unión generalmente se hibrida con dos regiones que rodean a la zona de unión, y cada cebador estará orientado para que se hibride en la dirección 5'-3' hacia la zona de unión. Generalmente, el cebador se diseña para que se hibride dentro de 600 nt, 500 nt, 400 nt, 350 nt, 300 nt, 250 nt, 200 nt, 150 nt, 100 nt, 50 nt, 30 nt, 25 nt, 20 nt, etc. de la zona de unión. Por tanto, una sonda para detectar un producto de la amplificación se selecciona para que sea capaz de hibridarse selectivamente dentro de una región de la zona de unión del extremo derecho del módulo SCC*mec* entre las secuencias diana de los cebadores. Por ejemplo, la sonda puede hibridarse dentro de secuencias genómicas de *S. aureus* (por ejemplo, *orfX*, entre la secuencia diana de la sonda de *S. aureus* y la zona de unión) o dentro de SCC*mec* (entre la secuencia diana del cebador de SCC*mec* y la zona de unión) o a través de la zona de unión. En ciertas realizaciones, dicha sonda puede hibridarse específicamente en una posición totalmente dentro o principalmente dentro del módulo SCC*mec*. En una realización en la que la sonda se hibrida específicamente dentro del módulo SCC*mec*, la región a la cual se hibrida la sonda puede incluir además la zona de unión y, por tanto, al menos uno o dos o tres o unos pocos nucleótidos del *orfX* contiguos a la zona de unión. Generalmente, el cebador se selecciona de modo que el producto de la amplificación sintetizado mediante su utilización y un segundo cebador (localizado en una secuencia genómica de *S. aureus*) tenga una longitud de aproximadamente 100 a 350 nt. Aunque la amplificación con PCR puede diseñarse para generar amplicones más largos (por ejemplo, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 nt o más largos), las longitudes preferidas de los amplicones para las reacciones basadas en la transcripción (por ejemplo, NASBA o TMA) o las reacciones de tipo PCR para la detección de los genes cromosómicos de *S. aureus*, la zona de unión o *mecA* en la presente invención tendrán una longitud de aproximadamente 100 a 300 nt (por ejemplo, 150, 200, 250, 300 nt). Además, para una reacción de amplificación múltiple, tanto basada en la transcripción como basada en PCR, para estas dianas es preferible un amplicón en el intervalo de 100 a 300 nt o más cortos para potenciar la sensibilidad del ensayo. Los cebadores específicos útiles para amplificar regiones de la zona de unión de un extremo pueden diseñarse con facilidad mediante las indicaciones de la presente y los conocimientos de la técnica.

Tal como se emplean en las reivindicaciones, las "condiciones de la amplificación" son las condiciones adecuadas para una reacción de amplificación seleccionada, tal como conocen los expertos en la técnica, tal como se emplean en las diversas reacciones de amplificación. Dichas condiciones pueden optimizarse para una reacción, cebadores, etc., específicos, tal como se conocen también los expertos en la técnica. Tal como se sabe, dichas condiciones de amplificación incluyen el contacto con los reactivos requeridos para la amplificación, por ejemplo, nucleótidos y enzimas, así como las condiciones de temperatura, sales y pH seleccionadas apropiadas, entre otros aspectos. Además, tal como se emplean en las reivindicaciones, un cebador o una sonda pueden ser un conjunto de cebadores o sondas, es decir, múltiples cebadores o sondas. Estos conjuntos de cebadores/sondas pueden utilizarse en una reacción en la que se desea amplificar y/o detectar más de un tipo o subtipo de MRSA, y en la que la secuencia de ácido nucleico de la región de MRSA diana seleccionada para la hibridación del cebador y/o sonda varía entre los tipos y/o subtipos. Pueden diseñarse sondas/cebadores individuales para cada tipo o subtipo, tal como se ejemplifica en la presente.

*mecA*. El presente método puede comprender además amplificar un *Staphylococcus aureus* que comprende *mecA* utilizando, en una reacción de amplificación, un tercer conjunto de oligonucleótidos para la amplificación de un elemento *mecA* que comprende:

- a. un primer oligonucleótido de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región de *mecA*; y
- b. un segundo oligonucleótido de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una segunda región dentro de *mecA*, en el que cada uno del primer oligonucleótido de *mecA* y el segundo oligonucleótido de *mecA* está orientado de tal forma que, bajo las condiciones de la amplificación, una porción del *mecA* se amplifica. El tercer conjunto de oligonucleótidos puede comprender además un tercer oligonucleótido de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del *mecA* entre la región de hibridación del primer oligonucleótido de *mecA* y la región de hibridación del segundo oligonucleótido de *mecA*,

en el que si la muestra contiene el MRSA que comprende *mecA*, se detecta la hibridación del tercer oligonucleótido de *mecA*. Como alternativa, puede realizarse un método de detección, tal como el uso de un tinte intercalante. Los ejemplos de cebadores para *mecA* pueden incluir SEQ ID NO:12 y 13.

"Amplificar una porción de ADN de *mecA*" significa realizar una reacción de amplificación en una muestra que produce un producto de la amplificación que incluye secuencias que se corresponden con cualquier porción identificadora de un gen *mecA*, por ejemplo, la región entre los cebadores que comprenden la secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO:12 y 13. La amplificación puede detectarse utilizando una sonda que se hibrida entre los ácidos nucleicos diana de los cebadores o empleando un tinte intercalante. Los cebadores y las sondas

pueden diseñarse con facilidad para la hibridación con la secuencia de *mecA* conocida.

Cromosoma de *S. aureus*. El presente método puede comprender además utilizar un cuarto conjunto de oligonucleótidos para la amplificación de un ADN cromosómico específico de *Staphylococcus aureus* que comprende:

- 5 a. un primer oligonucleótido de *S. aureus* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región dentro del ADN cromosómico específico de *Staphylococcus aureus*; y
- b. un segundo oligonucleótido de *S. aureus* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una segunda región dentro del ADN cromosómico específico de *Staphylococcus aureus*, en el que cada uno del primer oligonucleótido de *S. aureus* y el segundo oligonucleótido de *S. aureus* está orientado de tal forma que, bajo las condiciones de la amplificación, una porción del ADN específico de *S. aureus* se amplifica. El cuarto conjunto de oligonucleótidos puede comprender además un tercer oligonucleótido de *S. aureus* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del ADN de *S. aureus* entre la región de hibridación del primer oligonucleótido de *S. aureus* y la región de hibridación del segundo oligonucleótido de *S. aureus*, en el que si la muestra contiene la región del ADN de *S. aureus* entre la región de hibridación del primer oligonucleótido de *S. aureus* y la región de hibridación del segundo oligonucleótido de *S. aureus*, entonces se detecta la hibridación del tercer oligonucleótido. Este tercer oligonucleótido de *S. aureus* puede actuar como una sonda. El ADN cromosómico específico de *Staphylococcus aureus* puede ser cualquier región genómica específica de *S. aureus* conocida, tal como dentro de los genes *spa*, *orfX* o *nuc*. Los ejemplos de cebadores para *spa* pueden incluir SEQ ID NO:24 y 25, y de sonda, SEQ ID NO:26. Los ejemplos de cebadores para *orfX* pueden incluir SEQ ID NO:9 y 10, y de sonda, SEQ ID NO:11. Los ejemplos de cebadores para *nuc* pueden incluir SEQ ID NO:27, 28 y 30, y de sonda, SEQ ID NO:29. Como alternativa, puede realizarse un método de detección, tal como el uso de un tinte intercalante.

La presente descripción comprende un método para amplificar en una muestra un *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) que comprende una inserción de un módulo SCC*mec* dentro del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, en el que el módulo SCC*mec* comprende *mecA* o un elemento variante de *mecA*, comprendiendo dicho método realizar en la muestra una reacción de amplificación utilizando:

- a. un primer conjunto de oligonucleótidos que comprende:
- 1) un primer oligonucleótido de variante de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una primera región de un elemento variante de *mecA*, y
- 30 2) un segundo oligonucleótido de variante de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una segunda región de un elemento variante de *mecA*; y
- b. un segundo conjunto de oligonucleótidos que comprende:
- 1) un primer oligonucleótido de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una primera región de *mecA*, y
- 35 2) un segundo oligonucleótido de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una segunda región de *mecA*, en el que cada uno del primer oligonucleótido y el segundo oligonucleótido está orientado de modo que, bajo las condiciones de la amplificación, si la muestra contiene el MRSA, la región del MRSA entre la región de hibridación del primer oligonucleótido y la región de hibridación del segundo oligonucleótido se amplifica. El primer conjunto de oligonucleótidos puede comprender además un tercer oligonucleótido de variante de *mecA* capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del MRSA entre la región de hibridación del primer oligonucleótido de variante de *mecA* y la región de hibridación del segundo oligonucleótido de variante de *mecA*, y en el que si la muestra contiene el MRSA que comprende un elemento variante de *mecA*, entonces se detecta la hibridación del tercer oligonucleótido de variante de *mecA*. El segundo conjunto de oligonucleótidos puede comprender además un tercer oligonucleótido de *mecA* capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del MRSA entre la región de hibridación del primer oligonucleótido de *mecA* y la región de hibridación del segundo oligonucleótido de *mecA*, y en el que si la muestra contiene el MRSA que comprende *mecA*, entonces se detecta la hibridación del tercer oligonucleótido de *mecA*. Dicho tercer oligonucleótido puede ser una sonda. Como alternativa, puede realizarse un método de detección, tal como el uso de un tinte intercalante. Como ejemplo, el primer oligonucleótido de variante de *mecA* puede comprender una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:6, 7, 14, 15 y 20. El segundo oligonucleótido de variante de *mecA* puede comprender una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:16, 17 y 21. El tercer oligonucleótido de variante de *mecA* puede comprender una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:8, 18 y 19. En dicho método, el variante de *mecA* puede ser *mecA*<sub>LGA251</sub> o puede ser otro variante de *mecA*.

55 Zona de unión. El método para amplificar en una muestra un *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) que comprende una inserción de un módulo SCC*mec* dentro del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, en el que el módulo SCC*mec* comprende *mecA* o un elemento variante de *mecA*, puede comprender además la

amplificación de otros elementos de MRSA y/o *S. aureus*. Por ejemplo, el método puede comprender amplificar un *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA) que comprende una inserción de un módulo SCCmec dentro del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, en el que el módulo SCCmec comprende un *mecA*, mediante la utilización, en una reacción de amplificación, de un segundo conjunto de oligonucleótidos para la amplificación de la zona de unión del extremo derecho del módulo SCCmec con el ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, comprendiendo dicho segundo conjunto de oligonucleótidos:

a. un primer oligonucleótido de zona de unión que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* en la región de la zona de unión del extremo derecho; y

b. un segundo oligonucleótido de zona de unión que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región de la región de la zona de unión del extremo derecho del módulo SCCmec del MRSA que comprende un *mecA*,

en el que cada uno del primer oligonucleótido de zona de unión y el segundo oligonucleótido de zona de unión está orientado de tal forma que, bajo las condiciones de la amplificación, si la muestra contiene el MRSA que comprende un *mecA*, la zona de unión derecha se amplifica. El tercer conjunto de oligonucleótidos puede comprender además un tercer oligonucleótido de zona de unión que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del MRSA entre la región de hibridación del primer oligonucleótido de zona de unión y la región de hibridación del segundo oligonucleótido de zona de unión, en el que si la muestra contiene el MRSA que comprende la zona de unión del extremo derecho, entonces se detecta la hibridación del tercer oligonucleótido de zona de unión. El tercer oligonucleótido de zona de unión puede tener una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región de la región de la zona de unión del extremo derecho del módulo SCCmec. El primer oligonucleótido de zona de unión puede tener una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de *orfX*. El tercer oligonucleótido de zona de unión puede tener una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de *orfX*. Como alternativa, puede realizarse un método de detección, tal como el uso de un tinte intercalante.

*S. aureus*. El método para amplificar en una muestra un *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA) que comprende una inserción de un módulo SCCmec dentro del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, en el que el módulo SCCmec comprende *mecA* o un elemento variante de *mecA*, puede comprender además la utilización de un cuarto conjunto de oligonucleótidos para la amplificación de un ADN cromosómico específico de *Staphylococcus aureus* que comprende:

a. un primer oligonucleótido de *S. aureus* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región dentro del ADN cromosómico específico de *Staphylococcus aureus*; y

b. un segundo oligonucleótido de *S. aureus* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una segunda región dentro del ADN cromosómico específico de *Staphylococcus aureus*, en el que cada uno del primer oligonucleótido de *S. aureus* y el segundo oligonucleótido de *S. aureus* está orientado de tal forma que, bajo las condiciones de la amplificación, una porción del ADN específico de *S. aureus* se amplifica. El cuarto conjunto de oligonucleótidos puede comprender además un tercer oligonucleótido de *S. aureus* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del ADN de *S. aureus* entre la región de hibridación del primer oligonucleótido de *S. aureus* y la región de hibridación del segundo oligonucleótido de *S. aureus*,

en el que si la muestra contiene la región del ADN de *S. aureus* entre la región de hibridación del primer oligonucleótido de *S. aureus* y la región de hibridación del segundo oligonucleótido de *S. aureus*, entonces se detecta la hibridación del tercer oligonucleótido. Este tercer oligonucleótido de *S. aureus* puede actuar como una sonda. Como alternativa, puede realizarse un método de detección, tal como el uso de un tinte intercalante. El ADN cromosómico específico de *Staphylococcus aureus* puede seleccionarse, por ejemplo, de *spa*, *orfX* y *nuc*; sin embargo, pueden utilizarse otras dianas de ADN cromosómico específico de *S. aureus*, tal como conocen los expertos en la técnica.

Se reconocerá que, además de la reacción de amplificación que detecta la presencia de un variante de *mecA*, la invención incluye una reacción que puede amplificar también una o más secuencias pertinentes adicionales, tales como la zona de unión de SCCmec para los tipos de SCCmec distintos a los portan un variante de *mecA*, *mecA* (no variante), y una secuencia cromosómica específica de *S. aureus*. Se pueden combinar cualquiera o todas estas reacciones de amplificación adicionales en una reacción múltiplex o en reacciones individuales.

Una reacción de amplificación múltiplex significa que se ponen en contacto entre sí los reactivos específicos para la amplificación de más de una diana, de modo que puede producirse más de una amplificación dentro del mismo recipiente de reacción. Además pueden incluirse reactivos de detección para más de una diana. Así, se puede realizar una reacción de detección y amplificación múltiplex poniendo en contacto todos los reactivos específicos para la detección y la amplificación de más de una diana. Por tanto, en una reacción múltiplex se pueden amplificar múltiples regiones diana en la misma reacción. Las reacciones de amplificación múltiple también pueden realizarse

de modo secuencial. También puede emplearse la amplificación simultánea, si no se desea o no se factible realizar un múltiplex, en la que se deja que se desarrollen reacciones individuales al mismo tiempo, pero sin que sea necesario que los reactivos para más de una reacción de amplificación estén dentro del mismo tubo o recipiente de reacción, sino que se realizan en distintos recipientes de reacción. Se entiende que, incluso en una reacción de amplificación múltiplex, cada reacción se producirá a la velocidad en que se desarrollan las reacciones individuales bajo las condiciones proporcionadas. La detección también puede ser "simultánea", lo cual significa que si se incluyen las sondas apropiadas para cada reacción en el recipiente de reacción puede lograrse la detección, bajo las condiciones apropiadas, de más de una diana en un único recipiente de reacción (múltiplex) o en más de un recipiente de reacción (las sondas apropiadas se distribuyen al recipiente de reacción pertinente). Esta detección puede realizarse, si se desea, en el mismo recipiente de reacción que la reacción de amplificación múltiplex o simultánea, y además puede realizarse a medida que se desarrollan las reacciones de amplificación (es decir, a tiempo real). En el único recipiente pueden incluirse todos los componentes de una mezcla de reacción, adaptados al método de amplificación y detección específico utilizado. Así, una "mezcla de reacción" puede incluir todos los reactivos necesarios para realizar una reacción que pueden incluir, pero no se limitan a agentes tamponantes para mantener el pH a un nivel seleccionado durante una reacción, sales, cofactores, captadores y similares.

Tal como se emplean en las reivindicaciones, las "condiciones de la amplificación" son las condiciones adecuadas para una reacción de amplificación seleccionada, tal como conocen los expertos en la técnica, tal como se emplean en las diversas reacciones de amplificación. Dichas condiciones pueden optimizarse para una reacción, cebadores, etc., específicos, tal como se conocen también los expertos en la técnica. Tal como se sabe, dichas condiciones de amplificación incluyen el contacto con los reactivos requeridos para la amplificación, por ejemplo, nucleótidos y enzimas, así como las condiciones de temperatura, sales y pH seleccionadas apropiadas, entre otros aspectos. Además, tal como se emplean en las reivindicaciones, un cebador o una sonda pueden ser un conjunto de cebadores o sondas, es decir, múltiples cebadores o sondas. Estos conjuntos de cebadores/sondas pueden utilizarse en una reacción en la que se desea amplificar y/o detectar más de un tipo o subtipo de MRSA, y en la que la secuencia de ácido nucleico de la región de MRSA diana seleccionada para la hibridación del cebador y/o sonda varía entre los tipos y/o subtipos. Pueden diseñarse sondas/cebadores individuales para cada tipo o subtipo, tal como se ejemplifica en la presente.

Tal como se emplea en la presente, un oligonucleótido que "tiene" una secuencia de ácido nucleico incluida en una porción de un ADN diana significa una secuencia que tiene la identidad suficiente con la secuencia de ADN diana, o su complemento, para hibridarse de modo específico y selectivo a dicho ADN diana bajo condiciones de hibridación rigurosas. Incluye secuencias de ácidos nucleicos que presentan una identidad total con la secuencia.

En general, las reacciones de amplificación que producen amplicones (el producto de una reacción de amplificación de polinucleótidos) están "dirigidas por moldes" porque, en el apareamiento de bases de los reactivos, los nucleótidos o los oligonucleótidos tienen complementos en un polinucleótido molde que son necesarios para la creación de los productos de la reacción. En un aspecto, las reacciones dirigidas por molde son extensiones con cebadores con un ácido nucleico polimerasa, o acoplamiento de oligonucleótidos con un ácido nucleico ligasa. La amplificación puede incluir cualquier método de amplificación conocido o recientemente diseñado, que incluye los empleados en métodos publicados (por ejemplo, la amplificación basada en la transcripción, tal como la amplificación mediada por transcripción ("transcription-mediated amplification", TMA) y la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos ("nucleic acid sequence-based amplification", NASBA) (tal como se ejemplifica en la presente), y las tecnologías de amplificación de ácido nucleicos por ciclado (termociclado), tal como la reacción en cadena de polimerasa (PCR), PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR), y la reacción en cadena de ligasa (LCR), y cualquier método de amplificación, por ejemplo, replicación de secuencia sostenida (3SR), amplificación por desplazamiento de hebra ("strand displacement amplification", SDA), ADN ramificado (bDNA), tecnología de sondas ciclatas ("cycling probe technology", CPT), amplificación en fase sólida ("solid phase amplification", SPA), tecnología de amplificación por círculo rodante ("rolling circle amplification technology", RCA), RCA en fase sólida, SDA anclada y amplificación de señal dependiente de nucleasa ("nuclease dependent signal amplification", NDSA), todas las cuales son conocidas por los expertos en la técnica. Una reacción de amplificación puede ser una amplificación "a tiempo real" si está disponible una química de detección que permita medir un producto de la reacción a medida que se desarrolla la reacción de amplificación, por ejemplo, PCR a tiempo real o NASBA a tiempo real. Por tanto, esta invención incluye el uso de cualquier método de amplificación de ácidos nucleicos o cualquier otro procedimiento que pueda emplearse para aumentar la sensibilidad y/o la rapidez de ensayos de diagnóstico basados en ácidos nucleicos. La presente invención también incluye el uso de cualquier tecnología de detección que incluye las tecnologías de detección después de la amplificación, cualquier tecnología de amplificación combinada con detección, cualquier tecnología de hibridación de matrices o chips de ácidos nucleicos, y cualquier tecnología de amplificación de chips o combinación de tecnologías de amplificación e hibridación de chips. La detección y la identificación mediante cualquier método de secuenciación de nucleótidos también se incluyen en la presente invención.

En la invención puede utilizarse una diversidad de métodos de detección. Los métodos de detección que utilizan sondas de ácidos nucleicos son muy conocidos en la técnica. Las sondas de los presentes kits y/o para su uso en los presentes métodos pueden marcarse con cualquier marcador seleccionado adecuado para el método de detección elegido, muchos de los cuales son conocidos en la técnica, tales como fosfatasa (por ejemplo, fosfatasa alcalina), biotina, avidina, una peroxidasa (por ejemplo, peroxidasa de rábano), digoxigenina, un tinte fluorescente

(tales como los tintes Cy3 y Cy5, fluoresceína, FAM, ROX), un marcador quimioluminiscente, un marcador cromofórico, un marcador radiactivo (por ejemplo, un radioisótopo) y un ligando. Pueden emplearse diseños de sondas para diferentes métodos de detección, tales como diana-captura, HPA, TaqMan, balizas moleculares, escorpiones e hibridación de "sandwich". Las condiciones de hibridación pueden seleccionarse según el tipo de sonda y el tipo de reacción de detección seleccionada. Además, pueden emplearse tintes intercalantes. Un tinte intercalante es un tinte que se une específicamente al ADN bicatenario y fluoresce intensamente tras dicha unión; en ausencia de un ADN bicatenario no se unen a nada, y solo emite una fluorescencia muy baja. La detección se controla midiendo el aumento en la fluorescencia a lo largo del ciclo de amplificación. Si se desea puede emplearse un tinte intercalante con análisis de fusión, tal como se conocen en la técnica. Los ejemplos de tintes intercalantes pueden incluir, pero no se limitan a bromuro de etidio, SYBR® Green, LC Green, LC Green Plus, ResoLight, EvaGreen, Chromofy y SYTO 9. Los expertos en la técnica conocerán otros y puede que estén disponibles otros tintes nuevos.

El presente método proporciona además kits útiles para su uso en dichos métodos de amplificación y detección. De modo específico, la presente invención proporciona un kit para amplificar y detectar un *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) que comprende una inserción de un módulo SCCmec dentro del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, en el que el módulo SCCmec comprende un elemento variante de *mecA*, comprendiendo dicho kit un primer conjunto de oligonucleótidos que comprende:

- a. un primer oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una región de *orfX* del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, y
- b. un segundo oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una región de un variante de *mecA*, y
- c. un tercer oligonucleótido capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del MRSA entre la región de hibridación del primer oligonucleótido y la región de hibridación del segundo oligonucleótido, en el que:
  - el primer oligonucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:9 y 10; y
  - el segundo oligonucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:6, 7, 14, 15, 16, 17, 20 y 21, y
  - el tercer oligonucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico indicada como SEQ ID NO:8, 11, 18 y 19.

Un kit de la presente descripción para amplificar un *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) que comprende una inserción de un módulo SCCmec dentro del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, en el que el módulo SCCmec comprende un elemento variante de *mecA*, puede comprender además uno o más elementos adicionales, que incluyen conjuntos de oligonucleótidos para la detección de otros elementos de MRSA y MSSA. Aunque a veces en la presente se hace referencia a un "segundo", "tercer" o "cuarto" conjunto de oligonucleótidos, la elección de un conjunto de nucleótidos adicional es independiente de las otras opciones. Por ejemplo, el kit puede incluir conjuntos de oligonucleótidos para la amplificación de uno o más de la zona de unión de SCCmec para los tipos de SCCmec distintos a los que portan un variante de *mecA*, *mecA* (no variante), y una secuencia cromosómica específica de *S. aureus*. En un ejemplo, un kit puede comprender un segundo conjunto de oligonucleótidos que comprende:

- a. un primer oligonucleótido de zona de unión que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* en la región de la zona de unión del extremo derecho; y
- b. un segundo oligonucleótido de zona de unión que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región de la zona de unión del extremo derecho del módulo SCCmec. En otro ejemplo, el kit puede comprender un tercer conjunto de oligonucleótidos para la amplificación de un elemento *mecA* que comprende:
  - a. un primer oligonucleótido de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del ADN de *mecA*; y
  - b. un segundo oligonucleótido de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una segunda región dentro del ADN de *mecA*. Otro ejemplo es un kit que puede comprender un cuarto conjunto de oligonucleótidos para la amplificación de un ADN cromosómico específico de *Staphylococcus aureus* que comprende:
    - a. un primer oligonucleótido de *S. aureus* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región dentro del ADN cromosómico específico de *Staphylococcus aureus*; y
    - b. un segundo oligonucleótido de *S. aureus* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse

específicamente dentro de una segunda región dentro del ADN cromosómico específico de *Staphylococcus aureus*.

Otro kit de la presente descripción proporciona un kit para amplificar en una muestra un *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) que comprende una inserción de un módulo SCCmec dentro del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, en el que el módulo SCCmec comprende *mecA* o un elemento variante de *mecA*, en el que el módulo SCCmec comprende un elemento *mecA* o variante de *mecA*.

a) un primer conjunto de oligonucleótidos que comprende:

1) un primer oligonucleótido de variante de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una primera región de un elemento variante de *mecA*, y

2) un segundo oligonucleótido de variante de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una segunda región de un elemento variante de *mecA*; y

b) un segundo conjunto de oligonucleótidos que comprende:

1) un primer oligonucleótido de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una primera región de *mecA*, y

2) un segundo oligonucleótido de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una segunda región de *mecA*. El kit puede comprender, además, en el primer conjunto de oligonucleótidos, un tercer oligonucleótido de variante de *mecA* capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del MRSA entre la región de hibridación del primer oligonucleótido y la región de hibridación del segundo oligonucleótido. Puede comprender, en el segundo conjunto de oligonucleótidos, un tercer oligonucleótido de *mecA* capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del MRSA entre la región de hibridación del primer oligonucleótido y la región de hibridación del segundo oligonucleótido. En un ejemplo específico, el primer oligonucleótido de variante de *mecA* puede comprender una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:9 y 10. En otro ejemplo, el segundo oligonucleótido de variante de *mecA* comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:6, 7, 14, 15, 16, 17, 20 y 21. En otra realización, en el primer conjunto de oligonucleótidos, el tercer oligonucleótido de variante de *mecA* comprende una secuencia de ácido nucleico indicada como SEQ ID NO: 8, 18 y 19. En cualquiera de estos kits, el variante de *mecA* puede ser preferiblemente *mecA*<sub>LGZ251</sub>; sin embargo, puede ser otro variante de *mecA*.

Un kit de esta descripción puede comprender además un tercer conjunto de oligonucleótidos que comprende:

a. un primer oligonucleótido de zona de unión que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* en la región de la zona de unión del extremo derecho; y

b. un segundo oligonucleótido de zona de unión que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región de la zona de unión del extremo derecho del módulo SCCmec que comprende *mecA*, en el que cada uno del primer oligonucleótido de zona de unión y el segundo oligonucleótido de zona de unión está orientado de tal forma que, bajo las condiciones de la amplificación en presencia del MRSA en el que el módulo SCCmec comprende *mecA*, se amplifica la zona de unión de la inserción del extremo derecho del módulo SCCmec. El tercer conjunto de oligonucleótidos puede comprender además un tercer oligonucleótido de zona de unión que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del MRSA entre la región de hibridación del primer oligonucleótido de zona de unión y la región de hibridación del segundo oligonucleótido de zona de unión.

Un kit de esta descripción puede comprender además un cuarto conjunto de oligonucleótidos que comprende:

a. un primer oligonucleótido de *S. aureus* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región dentro del ADN cromosómico específico de *Staphylococcus aureus*; y

b. un segundo oligonucleótido de *S. aureus* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una segunda región dentro del ADN cromosómico específico de *Staphylococcus aureus*,

en el que cada uno del primer oligonucleótido de *S. aureus* y el segundo oligonucleótido de *S. aureus* está orientado de tal forma que, bajo las condiciones de la amplificación en presencia de un MRSA, una porción del ADN específico de *S. aureus* se amplifica. El cuarto conjunto de oligonucleótidos puede comprender además un tercer oligonucleótido de *S. aureus* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del ADN de *S. aureus* entre la región de hibridación del primer oligonucleótido de *S. aureus* y la región de hibridación del segundo oligonucleótido de *S. aureus*.

Las sondas de esta invención, que incluyen las que están incluidas en dichos kits, pueden marcarse de modo ventajoso para la detección, tal como conocen los expertos en la técnica. Los marcadores pueden seleccionarse de forma apropiada según el diseño específico y el tipo de reacción de amplificación que se va a realizar. Los reactivos de sondas y cebadores pueden proporcionarse en cualquiera de varios estados, que incluyen en estado secado,

líoofilizado, en forma de gránulos, secado por pulverización o en líquidos.

Los kits de esta invención pueden incluir elementos adicionales, tales como reactivos para un método de amplificación seleccionado (por ejemplo, una o más enzimas de amplificación, uno o más tampones y/o una o más enzimas de restricción, entre otros), uno o más controles, uno o más recipientes de reacción y similares. Si se va a emplear un tinte intercalante, este debe incluirse en el kit. Además, un kit de la presente invención puede comprender un recipiente que comprende un kit tal como se describe en la presente. Los elementos pueden proporcionarse en un único recipiente o en más de un recipiente. Estos kits pueden ser útiles para realizar amplificaciones múltiplex.

Se advierte que las referencias a las secuencias de sondas y cebadores que incluyen timidina pueden adaptarse con facilidad para emplear uridina en sustitución de la timidina cuando resulte útil para un ensayo concreto. Además, los nucleótidos pueden modificarse mediante la adición de grupos químicos, o la sustitución de restos individuales por análogos (por ejemplo, las versiones de 2'-O-metoxi). Estos nucleótidos modificados adicionales son conocidos en la técnica; algunos ejemplos incluyen hidroximetil nucleótidos, nucleótidos metilados, nucleótidos fluorados, alfa-tiofosfatónucleótidos, nucleótidos modificados con amina, metoxinucleótidos, carboximetilnucleótidos, tionucleótidos, inosina, dihidrouridina, pseudouridina, wibutosina, queuosina, C7dGTP. Pueden encontrarse otros nucleótidos modificados en las patentes de EE. UU. n.ºs 5.405.950 y 5.633.364 (ambas de Mock and Lovern). Además, una sonda puede comprender ADN, ARN, ADN o ARN modificado, ANP, otros ácidos nucleicos sintéticos o sustitutos de ácidos nucleicos que emplean bases de nucleótidos como medio para hibridarse selectivamente con una diana.

El presente método puede utilizarse en cualquier muestra seleccionada, tal como una muestra directa de un paciente, por ejemplo, un frotis nasal o inguinal, un frotis del perineo, un frotis de la axila, un frotis de la garganta, un frotis rectal, muestras procedentes de heridas, todos ellos particularmente adecuados para la selección, así como particularmente adecuados para el diagnóstico, lavado broncoalveolar o sangre (por ejemplo, septicemia o cultivo de sangre). Estas muestras generalmente contienen una población mixta de organismos. Además, si se desea, este método puede aplicarse a una muestra que solo presente un única especie o cepa bacteriana, por ejemplo, muestras que utilizan el aislamiento, el cultivo, la captura y/o el enriquecimiento de MRSA.

Otros aspectos de la invención se describen a continuación.

La invención también se refiere a un método para amplificar en una muestra un *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) que comprende una inserción de un módulo SCCmec dentro del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, en el que el módulo SCCmec comprende un elemento variante de *mecA*, comprendiendo dicho método:

realizar sobre la muestra una reacción de amplificación utilizando un conjunto de oligonucleótidos que comprende:

a. un primer oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una región del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* en una región de la zona de unión de un extremo, y

b. un segundo oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una región de un variante de *mecA*,

en el que cada uno del primer oligonucleótido y el segundo oligonucleótido está orientado de modo que, bajo las condiciones de la amplificación, si la muestra contiene el MRSA, la región del MRSA entre la región de hibridación del primer oligonucleótido y la región de hibridación del segundo oligonucleótido se amplifica.

Opcionalmente, la región de la zona de unión de un extremo del ADN cromosómico de *S. aureus* es una región de la zona de unión del extremo derecho.

Opcionalmente, el conjunto de oligonucleótidos comprende además un tercer oligonucleótido capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del MRSA entre la región de hibridación del primer oligonucleótido y la región de hibridación del segundo oligonucleótido, y en el que cuando la muestra contiene el MRSA, entonces se detecta la hibridación del tercer oligonucleótido.

Opcionalmente, el método comprende además poner en contacto la muestra amplificada con un tinte intercalante, en el que si la muestra contiene el MRSA, entonces se detecta la intercalación del tinte en un producto de la amplificación.

Opcionalmente, el tercer oligonucleótido se hibrida específicamente con una región del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*.

Opcionalmente, el tercer oligonucleótido se hibrida específicamente con una región de *orfX* del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*.

Opcionalmente, el tercer oligonucleótido se hibrida específicamente con una región de la región de zona de unión del extremo derecho del ADN del módulo SCCmec.



Opcionalmente, el tercer oligonucleótido se hibrida específicamente con una región del variante de *mecA*.

Opcionalmente, el primer oligonucleótido se hibrida específicamente con una región de *orfX* del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*.

Opcionalmente, el variante de *mecA* es *mecA*<sub>LGA251</sub>.

- 5 Opcionalmente, el primer oligonucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:9 y 10.

Opcionalmente, el segundo oligonucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:6, 7, 14, 15, 16, 17, 20 y 21.

- 10 Opcionalmente, el tercer oligonucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO:8, 11, 18 y 19.

Opcionalmente, el método comprende además amplificar un *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) que comprende una inserción de un módulo SCC*mec* dentro del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, en el que el módulo SCC*mec* comprende un *mecA*, mediante la utilización, en una reacción de amplificación, de un segundo conjunto de oligonucleótidos para la amplificación de la zona de unión del extremo derecho del módulo SCC*mec* con el ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, comprendiendo dicho segundo conjunto de oligonucleótidos:

- a. un primer oligonucleótido de zona de unión que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* en la región de la zona de unión del extremo derecho; y

- 20 b. un segundo oligonucleótido de zona de unión que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región de la región de la zona de unión del extremo derecho del módulo SCC*mec* del MRSA que comprende un *mecA*,

- 25 en el que cada uno del primer oligonucleótido de zona de unión y el segundo oligonucleótido de zona de unión está orientado de tal forma que, bajo las condiciones de la amplificación, si la muestra contiene el MRSA que comprende un *mecA*, la zona de unión derecha se amplifica.

Opcionalmente, el segundo conjunto de oligonucleótidos comprende además un tercer oligonucleótido de zona de unión que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del MRSA entre la región de hibridación del primer oligonucleótido de zona de unión y la región de hibridación del segundo oligonucleótido de zona de unión,

- 30 en el que si la muestra contiene el MRSA que comprende la zona de unión del extremo derecho, entonces se detecta la hibridación del tercer oligonucleótido de zona de unión.

Opcionalmente, el tercer oligonucleótido de zona de unión tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región de la región de la zona de unión del extremo derecho del módulo SCC*mec*.

- 35 Opcionalmente, el tercer oligonucleótido de zona de unión tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de *orfX*.

Opcionalmente, el primer oligonucleótido tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de *orfX*.

- 40 Opcionalmente, el método comprende además amplificar un *Staphylococcus aureus* que comprende *mecA* utilizando, en una reacción de amplificación, un tercer conjunto de oligonucleótidos para la amplificación de un elemento *mecA* que comprende:

a. un primer oligonucleótido de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del ADN de *mecA*; y

- 45 b. un segundo oligonucleótido de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una segunda región dentro del ADN de *mecA*,

en el que cada uno del primer oligonucleótido de *mecA* y el segundo oligonucleótido de *mecA* está orientado de tal forma que, bajo las condiciones de la amplificación, una porción del *mecA* se amplifica.

Opcionalmente, el tercer conjunto de oligonucleótidos comprende además un tercer oligonucleótido de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del *mecA* entre la región de hibridación del primer oligonucleótido de *mecA* y la región de hibridación del segundo oligonucleótido de

- 50

*mecA*,

en el que si la muestra contiene el MRSA que comprende *mecA*, se detecta la hibridación del tercer oligonucleótido de *mecA*.

5 Opcionalmente, el método según la invención comprende además utilizar un cuarto conjunto de oligonucleótidos para la amplificación de un ADN cromosómico específico de *Staphylococcus aureus* que comprende:

a. un primer oligonucleótido de *S. aureus* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región dentro del ADN cromosómico específico de *Staphylococcus aureus*; y

b. un segundo oligonucleótido de *S. aureus* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una segunda región dentro del ADN cromosómico específico de *Staphylococcus aureus*,

10 en el que cada uno del primer oligonucleótido de *S. aureus* y el segundo oligonucleótido de *S. aureus* está orientado de tal forma que, bajo las condiciones de la amplificación, una porción del ADN específico de *S. aureus* se amplifica.

Opcionalmente, el cuarto conjunto de oligonucleótidos comprende además un tercer oligonucleótido de *S. aureus* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del ADN de *S. aureus* entre la región de hibridación del primer oligonucleótido de *S. aureus* y la región de hibridación del segundo oligonucleótido de *S. aureus*,

15 en el que si la muestra contiene la región del ADN de *S. aureus* entre la región de hibridación del primer oligonucleótido de *S. aureus* y la región de hibridación del segundo oligonucleótido de *S. aureus*, entonces se detecta la hibridación del tercer oligonucleótido.

Opcionalmente, el ADN cromosómico específico de *Staphylococcus aureus* se selecciona del grupo que consiste en *spa*, *orfX* y *nuc*.

También se describe un método para amplificar en una muestra un *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) que comprende una inserción de un módulo *SCCmec* dentro del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, en el que el módulo *SCCmec* comprende *mecA* o un elemento variante de *mecA*, comprendiendo dicho método:

25 realizar sobre la muestra una reacción de amplificación utilizando:

a. un primer conjunto de oligonucleótidos que comprende:

1) un primer oligonucleótido de variante de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una primera región de un elemento variante de *mecA*, y

30 2) un segundo oligonucleótido de variante de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una segunda región de un elemento variante de *mecA*; y

b. un segundo conjunto de oligonucleótidos que comprende:

1) un primer oligonucleótido de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una primera región de *mecA*, y

35 2) un segundo oligonucleótido de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una segunda región de *mecA*,

en el que cada uno del primer oligonucleótido y el segundo oligonucleótido está orientado de modo que, bajo las condiciones de la amplificación, si la muestra contiene el MRSA, la región del MRSA entre la región de hibridación del primer oligonucleótido y la región de hibridación del segundo oligonucleótido se amplifica.

Opcionalmente, el primer conjunto de oligonucleótidos comprende además un tercer oligonucleótido de variante de *mecA* capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del MRSA entre la región de hibridación del primer oligonucleótido de variante de *mecA* y la región de hibridación del segundo oligonucleótido de variante de *mecA*, y

en el que si la muestra contiene el MRSA que comprende el elemento variante de *mecA*, se detecta la hibridación del tercer oligonucleótido de variante de *mecA*.

Opcionalmente, el segundo conjunto de oligonucleótidos comprende además un tercer oligonucleótido de *mecA* capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del MRSA entre la región de hibridación del primer oligonucleótido de *mecA* y la región de hibridación del segundo oligonucleótido de *mecA*, y

45 en el que si la muestra contiene el MRSA que comprende *mecA*, se detecta la hibridación del tercer oligonucleótido de *mecA*.

Opcionalmente, el método comprende además poner en contacto la muestra amplificada con un tinte intercalante, en el que si la muestra contiene el MRSA, entonces se detecta la intercalación del tinte en un producto de la amplificación.

5 Opcionalmente, el primer oligonucleótido de variante de *mecA* comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:6, 7, 14, 15 y 20.

Opcionalmente, el segundo oligonucleótido de variante de *mecA* comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:16, 17 y 21.

Opcionalmente, el tercer oligonucleótido de variante de *mecA* comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:8, 18 y 19.

10 Opcionalmente, el variante de *mecA* es *mecA*<sub>LGA251</sub>.

Opcionalmente, el método comprende además amplificar un *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) que comprende una inserción de un módulo SCC*mec* dentro del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, en el que el módulo SCC*mec* comprende un *mecA*, mediante la utilización, en una reacción de amplificación, de un segundo conjunto de oligonucleótidos para la amplificación de la zona de unión del extremo derecho del módulo SCC*mec* con el ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, comprendiendo dicho segundo conjunto de oligonucleótidos:

a. un primer oligonucleótido de zona de unión que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* en la región de la zona de unión del extremo derecho; y

20 b. un segundo oligonucleótido de zona de unión que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región de la zona de unión del extremo derecho del módulo SCC*mec* del MRSA que comprende un *mecA*,

en el que cada uno del primer oligonucleótido de zona de unión y el segundo oligonucleótido de zona de unión está orientado de tal forma que, bajo las condiciones de la amplificación, si la muestra contiene el MRSA que comprende un *mecA*, la zona de unión derecha se amplifica.

Opcionalmente, el tercer conjunto de oligonucleótidos comprende además un tercer oligonucleótido de zona de unión que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del MRSA entre la región de hibridación del primer oligonucleótido de zona de unión y la región de hibridación del segundo oligonucleótido de zona de unión,

30 en el que si la muestra contiene el MRSA que comprende la zona de unión del extremo derecho, entonces se detecta la hibridación del tercer oligonucleótido de zona de unión.

Opcionalmente, el tercer oligonucleótido de zona de unión tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región de la zona de unión del extremo derecho del módulo SCC*mec*.

35 Opcionalmente, el primer oligonucleótido de zona de unión tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de *orfX*.

Opcionalmente, el tercer oligonucleótido de zona de unión tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de *orfX*.

Opcionalmente, el método comprende además utilizar un cuarto conjunto de oligonucleótidos para la amplificación de un ADN cromosómico específico de *Staphylococcus aureus* que comprende:

a. un primer oligonucleótido de *S. aureus* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región dentro del ADN cromosómico específico de *Staphylococcus aureus*; y

b. un segundo oligonucleótido de *S. aureus* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una segunda región dentro del ADN cromosómico específico de *Staphylococcus aureus*,

45 en el que cada uno del primer oligonucleótido de *S. aureus* y el segundo oligonucleótido de *S. aureus* está orientado de tal forma que, bajo las condiciones de la amplificación, una porción del ADN específico de *S. aureus* se amplifica.

Opcionalmente, el cuarto conjunto de oligonucleótidos comprende además un tercer oligonucleótido de *S. aureus* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del ADN de *S. aureus* entre la región de hibridación del primer oligonucleótido de *S. aureus* y la región de hibridación del segundo oligonucleótido de *S. aureus*,

50

en el que si la muestra contiene la región del ADN de *S. aureus* entre la región de hibridación del primer oligonucleótido de *S. aureus* y la región de hibridación del segundo oligonucleótido de *S. aureus*, entonces se detecta la hibridación del tercer oligonucleótido.

5 Opcionalmente, el ADN cromosómico específico de *Staphylococcus aureus* se selecciona del grupo que consiste en *spa*, *orfX* y *nuc*.

También se describe un kit para amplificar un *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) que comprende una inserción de un módulo *SCCmec* dentro del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, en el que el módulo *SCCmec* comprende un elemento variante de *mecA*, comprendiendo dicho kit un primer conjunto de oligonucleótidos que comprende:

- 10 a. un primer oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una región del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* en una región de la zona de unión de un extremo, y
- b. un segundo oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una región de un variante de *mecA*.

15 Opcionalmente, el kit comprende además un tercer oligonucleótido capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del MRSA entre la región de hibridación del primer oligonucleótido y la región de hibridación del segundo oligonucleótido.

Opcionalmente, el primer oligonucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:9 y 10.

20 Opcionalmente, el segundo oligonucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:6, 7, 14, 15, 16, 17, 20 y 21.

Opcionalmente, el tercer oligonucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO:8, 18 y 19.

Opcionalmente, el variante de *mecA* es *mecA*<sub>LGA251</sub>.

Opcionalmente, el kit comprende además un segundo conjunto de oligonucleótidos que comprende:

- 25 a. un primer oligonucleótido de zona de unión que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* en la región de la zona de unión del extremo derecho; y
- b. un segundo oligonucleótido de zona de unión que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región de la región de la zona de unión del extremo derecho del módulo *SCCmec*.

30 Opcionalmente, el kit comprende además un tercer conjunto de oligonucleótidos para la amplificación de un elemento *mecA* que comprende:

- a. un primer oligonucleótido de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del ADN de *mecA*; y
- 35 b. un segundo oligonucleótido de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una segunda región dentro del ADN de *mecA*.

Opcionalmente, el kit comprende además un cuarto conjunto de oligonucleótidos para la amplificación de un ADN cromosómico específico de *Staphylococcus aureus* que comprende:

- a. un primer oligonucleótido de *S. aureus* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región dentro del ADN cromosómico específico de *Staphylococcus aureus*; y
- 40 b. un segundo oligonucleótido de *S. aureus* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una segunda región dentro del ADN cromosómico específico de *Staphylococcus aureus*.

También se describe un kit para amplificar en una muestra un *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) que comprende una inserción de un módulo *SCCmec* dentro del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, en el que el módulo *SCCmec* comprende *mecA* o un elemento variante de *mecA*, comprendiendo dicho kit:

- 45 a) un primer conjunto de oligonucleótidos que comprende:
- 1) un primer oligonucleótido de variante de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una primera región de un elemento variante de *mecA*, y
- 2) un segundo oligonucleótido de variante de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse

específicamente con una segunda región de un elemento variante de *mecA*; y

b) un segundo conjunto de oligonucleótidos que comprende:

1) un primer oligonucleótido de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una primera región de *mecA*, y

5 2) un segundo oligonucleótido de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una segunda región de *mecA*,

y cada conjunto está orientado de tal forma que cuando una muestra se coloca bajo condiciones de amplificación con el conjunto de oligonucleótidos, si la muestra contiene MRSA puede producirse la amplificación.

10 Opcionalmente, el kit comprende además, en el primer conjunto de oligonucleótidos, un tercer oligonucleótido de variante de *mecA* capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del MRSA entre la región de hibridación del primer oligonucleótido y la región de hibridación del segundo oligonucleótido.

Opcionalmente, el kit comprende además, en el segundo conjunto de oligonucleótidos, un tercer oligonucleótido de *mecA* capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del MRSA entre la región de hibridación del primer oligonucleótido y la región de hibridación del segundo oligonucleótido.

15 Opcionalmente, el primer oligonucleótido de variante de *mecA* comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:9 y 10.

Opcionalmente, el segundo oligonucleótido de variante de *mecA* comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:6, 7, 14, 15, 16, 17, 20 y 21.

20 Opcionalmente, el tercer oligonucleótido de variante de *mecA* comprende una secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO:8, 18 y 19.

Opcionalmente, el variante de *mecA* es *mecA*<sub>LGA251</sub>.

Opcionalmente, el kit comprende además un tercer conjunto de oligonucleótidos que comprende:

25 a. un primer oligonucleótido de zona de unión que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus* en la región de la zona de unión del extremo derecho; y

b. un segundo oligonucleótido de zona de unión que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región de la zona de unión del extremo derecho del módulo SCC*mec* que comprende *mecA*,

30 en el que cada uno del primer oligonucleótido de zona de unión y el segundo oligonucleótido de zona de unión está orientado de tal forma que, bajo las condiciones de la amplificación en presencia del MRSA en el que el módulo SCC*mec* comprende *mecA*, se amplifica la zona de unión de la inserción del extremo derecho del módulo SCC*mec*.

35 Opcionalmente, el tercer conjunto de oligonucleótidos comprende además un tercer oligonucleótido de zona de unión que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del MRSA entre la región de hibridación del primer oligonucleótido de zona de unión y la región de hibridación del segundo oligonucleótido de zona de unión.

Opcionalmente, el kit comprende además un cuarto conjunto de oligonucleótidos que comprende:

a. un primer oligonucleótido de *S. aureus* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región dentro del ADN cromosómico específico de *Staphylococcus aureus*; y

40 b. un segundo oligonucleótido de *S. aureus* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una segunda región dentro del ADN cromosómico específico de *Staphylococcus aureus*,

en el que cada uno del primer oligonucleótido de *S. aureus* y el segundo oligonucleótido de *S. aureus* está orientado de tal forma que, bajo las condiciones de la amplificación en presencia de un MRSA, una porción del ADN específico de *S. aureus* se amplifica.

45 Opcionalmente, el cuarto conjunto de oligonucleótidos comprende además un tercer oligonucleótido de *S. aureus* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del ADN de *S. aureus* entre la región de hibridación del primer oligonucleótido de *S. aureus* y la región de hibridación del segundo oligonucleótido de *S. aureus*.

La presente invención se ejemplifica en los siguientes ejemplos. Tal como se indica a lo largo de la memoria descriptiva, la detección de un variante de *mecA* puede combinarse en cualquier combinación deseada, en forma

múltiples o en forma simplex múltiple, con otro ensayo deseado, tal como una o más sondas y/o cebadores para *mecA*, ADN genómico de *S. aureus* y/o zona de unión de *SCCmec*.

**Ejemplos**

Condiciones de amplificación

- 5 Las amplificaciones empleando PCR pueden realizarse bajo condiciones convencionales. Estas condiciones pueden incluir:

Preparación de la mezcla MIX (reacción realizada en 25 µl):

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	para 1 muestra (volumen en µl)
Agua	NA	NA	16,15
Tampón, pH 8,6 (KCl 50 mM)	50X	1X	0,50
Disolución de MgCl <sub>2</sub>	1 M	5,4 mM	0,14
dNTP	10 M	0,124 mM	0,31
KCl	1,2 M	14,8 mM	0,31
Cebador directo	20 µM	0,2 µM	0,25
Cebador inverso	20 µM	0,2 µM	0,25
Sonda	20 µM	0,1 µM	0,13
BSA	10 µg/µl	0,5 µg/µl	1,25
Enzima Fast Start	5 U/µl	0,112 U/µl (3,6 U/rxn)	0,72
Diana (µl)	NA	NA	5

Ciclo de amplificación en Biorad CFX96:

	Activación de la enzima	Desnaturalización	Asociación/extensión (óptica)
Temperatura (°C)	95	95	65
Tiempo (s)	300	5	30
Ciclo o ciclos	1	50	

10

Diseño de los oligonucleótidos

Pueden utilizarse oligonucleótidos dedicados a la amplificación o la detección y que pertenezcan a las regiones genómicas descritas en la presente, cualquiera que sea el método utilizado para su diseño. Entre estos métodos que pueden utilizarse se encuentran, por ejemplo (sin limitación) el diseño manual (la experiencia humana en el diseño de oligonucleótidos) o el diseño por ordenador (secuencias de instrucciones, programas, software) (por ejemplo, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1476746>, Eberhardt N. L., A shell program for the design of PGR primers using genetics computer group (GCG) software (7.1) on VAX/VMS systems, *Biotechniques*, diciembre de 1992, 13(6):914-917); Mitsuhashi M., Technical report: Part 1. Basic requirements for designing optimal oligonucleotide probe sequences, *J. Clin. Lab. Anal.*, 1996, 10(5):277-284).

15

20 **Ejemplo 1: Diseño de sondas y cebadores de variantes de *mecA***

Se diseñaron experimentos para desarrollar una PCR para amplificar la región de *orfX*-variante de *mecA* de *Staphylococcus aureus*. En un principio, para diseñar los cebadores en el lado de *orfX* de la zona de unión de *SCCmec*, se diseñaron dos cebadores y una sonda en la región de *orfX*. También se diseñó un conjunto de oligos específicos de variante *mecA* (para *mecA*<sub>LGA251</sub>, también denominado en la bibliografía *mecA*<sub>M10/0061</sub>, homólogo de *mecA*, y *mecA*<sub>variante nuevo</sub>). Puesto que en un principio se desconocía la orientación del variante de *mecA*, se

25

5 diseñaron cebadores divergentes de variante de *mecA* para obtener un amplicón de variante de *mecA-orfX*. Se diseñaron otros candidatos en ambos extremos del gen del variante de *mecA* para desarrollar PCR específicas de *Staphylococcus aureus*. El ensayo de PCR seleccionado para la amplificación del variante de *mecA* a través de la zona de unión de SCC*mec* debería generar un amplicón con una longitud de aproximadamente 1300 nt. El ensayo de PCR seleccionado para la detección del propio elemento variante de *mecA* puede variar en tamaño con respecto a este amplicón; por ejemplo, puede producir un amplicón más corto.

10 Se descubrió una secuencia de referencia de variante de *mecA* en NCBI con el siguiente número de registro, FR823292, y se utilizó para el diseño inicial de cebadores. La primera etapa fue diseñar oligos específicos de variante de *mecA*. Puesto que en un principio se desconocía la orientación del variante de *mecA*, se diseñaron cebadores divergentes de variante de *mecA* (ambos en los extremos 5' y 3' del gen del variante de *mecA*) para obtener un amplicón de variante de *mecA-orfX*.

Diseño en el extremo 5' del gen del variante de *mecA*

Se utilizaron condiciones de PCR convencional, tal como se describió anteriormente, a menos que se indique lo contrario.

15 Diseño de cebadores

Se diseñaron muchos cebadores (los datos no se muestran). Se seleccionaron dos basándose en las características termodinámicas:

Tabla 1 - Características de los cebadores directos\_5'

	mecAv-orfX-1 (SEQ ID NO:1)	mecAv-orfX-2 (SEQ ID NO:2)
FR823292, posición en extremo 5'	3613	3614
<b>Secuencia (5'→3')</b>	<b>ATGAAGCAATATCAAAGGA</b>	<b>TGAAGCAATATCAAAGGAA</b>
Longitud del oligo	19 nt	19 nt
Tm	59 °C	60 °C
GC %	31%	31%
Evaluación del riesgo de formación de estructuras de horquilla (volumen de trabajo de plegamiento intramolecular)	NO-Estructura intramolecular estable	NO-Estructura intramolecular estable
Evaluación del riesgo de dimerización del cebador (volumen de trabajo de hibridación)	NO se predice riesgo de dimerización del cebador	NO se predice riesgo de dimerización del cebador

20 Diseño de sondas

Se diseñaron muchas sondas para el extremo 5' del variante de *mecA* (los datos no se muestran) y se seleccionaron tres basándose en las características termodinámicas:

Tabla 2 - Características de las sondas 5'

	mecAv-orfX-3 (SEQ ID NO:3)	mecAv-orfX-4 (SEQ ID NO:4)	mecAv-orfX-5 (SEQ ID NO:5)
FR823292, posición en extremo 5'	3657	3655	3653
<b>Secuencia (5'→3')</b>	<b>ATAACTTGTTATTCAAAGATGACGATATT</b>	<b>ACTTGTTATTCAAAGATGACGATATTGA</b>	<b>TGGTTATTCAAAGATGACGATATTGAGA</b>
Longitud del oligo	30 nt	29 nt	28 nt
Tm (Apollo PCR por defecto)	69 °C	68 °C	67 °C
GC %	26%	31%	32%

Evaluación del riesgo de formación de estructuras de horquilla (volumen de trabajo de plegamiento intramolecular)	NO-Estructura intramolecular estable	NO-Estructura intramolecular estable	NO-Estructura intramolecular estable
Evaluación del riesgo de dimerización del cebador (volumen de trabajo de hibridación)	NO se predice riesgo de dimerización del cebador	NO se predice riesgo de dimerización del cebador	NO se predice riesgo de dimerización del cebador

Diseño en el extremo 3' del gen del variante de *mecA*

Diseño de cebadores

- 5 Se diseñaron muchas sondas para el extremo 3' del variante de *mecA* (los datos no se muestran) y se seleccionaron dos de ellas basándose en las características termodinámicas:

Tabla 3 - Características de los cebadores directos 3' de variante de *mecA*

	<i>mecAv-orfX-6</i> (SEQ ID NO:6)	<i>mecAv-orfX-7</i> (SEQ ID NO:7)
FR823292, posición en extremo 5'	1877	1863
<b>Secuencia (5'→3')</b>	ATCCTAATATGTTAATGGCGA	ATGGCGATTAATGTTAAAGA
Longitud del oligo	21 nt	20 nt
Tm (Apollo PCR por defecto)	62 °C	61 °C
GC %	33%	30%
Evaluación del riesgo de formación de estructuras de horquilla (volumen de trabajo de plegamiento intramolecular)	NO-Estructura intramolecular estable	NO-Estructura intramolecular estable
Evaluación del riesgo de dimerización del cebador (volumen de trabajo de hibridación)	NO se predice riesgo de dimerización del cebador	NO se predice riesgo de dimerización del cebador

Diseño de sondas

- 10 Se diseñaron muchas sondas para el extremo 3' del gen del variante de *mecA* (véase la tabla 4, los datos adicionales no se muestran) y se seleccionó una basándose en las características termodinámicas:

Tabla 4 - Características de la sonda 3' de variante de *mecA*

	<i>mecAv-orfX-8</i> (SEQ ID NO:8)
FR823292, posición en extremo 5'	1826
<b>Secuencia (5'→3')</b>	TGGCCAGCTATAATGCTACTATATCTGGA
Longitud del oligo	29 nt
Tm (Apollo PCR por defecto)	71 °C
GC %	41%
Evaluación del riesgo de formación de estructuras de horquilla (volumen de trabajo de plegamiento intramolecular)	NO-Estructura intramolecular estable
Evaluación del riesgo de dimerización del cebador (volumen de trabajo de hibridación)	NO se predice riesgo de dimerización del cebador



## Compatibilidad de los oligos

Parámetros de entrada: Temperatura: 63 °C; [Na<sup>+</sup>]: 0,05 M; [Mg<sup>2+</sup>]: 0,005 M; Concentración de hebra: 0,00001 MTabla 5 - Compatibilidad de los oligonucleótidos de los variantes de *mecA*; la unidad de energía libre es Kcal/mol

DG	Cebador variante de <i>mecA</i> , <b>mecAV-orfX-1</b> (SEQ ID NO:1)	Cebador variante de <i>mecA</i> , <b>mecAV-orfX-2</b> (SEQ ID NO:2)	Cebador variante de <i>mecA</i> , <b>mecAV-orfX-3</b> (SEQ ID NO:3)	Cebador variante de <i>mecA</i> , <b>mecAV-orfX-4</b> (SEQ ID NO:4)	Cebador variante de <i>mecA</i> , <b>mecAV-orfX-5</b> (SEQ ID NO:5)	Cebador variante de <i>mecA</i> , <b>mecAV-orfX-6</b> (SEQ ID NO:6)	Cebador variante de <i>mecA</i> , <b>mecAV-orfX-7</b> (SEQ ID NO:7)	Cebador variante de <i>mecA</i> , <b>mecAV-orfX-8</b> (SEQ ID NO:8)
Cebador variante de <i>mecA</i> , <b>mecAV-orfX-1</b>	-1,09	-1,56	-1,56	-1,56	-1,56	-1,4	-1,4	-0,8
Cebador variante de <i>mecA</i> , <b>mecAV-orfX-2</b>	-1,56	-1,09	-1,56	-1,56	-1,56	-1,6	-1,4	-0,64
Cebador variante de <i>mecA</i> , <b>mecAV-orfX-3</b>	-1,56	-1,56	-1,09	-1,56	-1,56	-1,4	-1,4	-1,04
Cebador variante de <i>mecA</i> , <b>mecAV-orfX-4</b>	-1,56	-1,56	-1,56	-1,09	-1,56	-1,4	-1,4	-1,04
Cebador variante de <i>mecA</i> , <b>mecAV-orfX-5</b>	-1,56	-1,56	-1,56	-1,56	-1,09	-1,4	-1,4	-1,04
Cebador variante de <i>mecA</i> , <b>mecAV-orfX-6</b>	-1,4	-1,6	-1,4	-1,4	-1,4	-0,77	-1,24	-1,77
Cebador variante de <i>mecA</i> , <b>mecAV-orfX-7</b>	-1,4	-1,4	-1,4	-1,4	-1,4	-1,24	-0,77	-1,77
Cebador variante de <i>mecA</i> , <b>mecAV-orfX-8</b>	-0,8	-0,64	-1,04	-1,04	-1,04	-1,77	-1,77	-2,88

- 5 Se descubrió que todos los oligonucleótidos anteriores son compatibles entre sí y también son compatibles con los oligonucleótidos diseñados y seleccionados en el *orfX* (véase a continuación). Estos experimentos proporcionaron la orientación del gen del variante de *mecA* y se concluyó que los oligos diseñados en el extremo 3' del variante de *mecA* se pueden utilizar para una reacción de amplificación de variante de *mecA-orfX*.

**Ejemplo 2: Reacción de amplificación de variante de *mecA-orfX***

Se utilizaron condiciones de PCR convencional, tal como se describió anteriormente, a menos que se indique lo contrario.

**Ejemplo 2a: Selección de cebadores**

- 5 Se realizaron ensayos con una cepa de variante de *mecA* (+) (número de cepa de colección interna 1156001) a 10 ng/μl, y una cepa *mecA*(+) (cepa ATCC 4330G) a 10 ng/μl. Los cebadores ensayados fueron:

Cebadores de *orfX* de MRSA:

- *mecAv-orfX-9* (SEQ ID NO:9): 10 μM
- *mecAv-orfX-10* (SEQ ID NO:10): 10 μM

- 10 Cebadores del extremo 3' del variante de *mecA*:

- *mecAv-orfX-6* (SEQ ID MO:6): 10 μM
- *mecAv-orfX-7* (SEQ ID NO:7): 10 μM

Las condiciones para todas las reacciones de PCR para la selección de cebadores fueron las siguientes:

Formato de PCR: 45 μl de MIX + 5 μl de diana

- 15 Condiciones de PCR: se ensayaron 4 condiciones (véase a continuación)

Sistema de PCR Expand High Fidelity (Roche, ref. 11732650001, n.º de lote 11398326)

Sistema de PCR GeneAmp PCR 9700

Tabla 6 - Condiciones de las 4 PCR ensayadas

Tabla 6a: Condición n.º 20555, 1/termo

Temperatura	Tiempo	Ciclo
95°C	2 min	1 ciclo
95°C	30 s	30 ciclos
55°C	20 s	
72°C	30 s	
72°C	7 min	1 ciclo
4°C	infinito	1 ciclo

20

Tabla 6b: Condición n.º 20556, 2/termo

Temperatura	Tiempo	Ciclo
95°C	2 min	1 ciclo
95°C	15 s	30 ciclos
55°C	30 s	
72°C	45 s	
72°C	7 min	1 ciclo
4°C	infinito	1 ciclo

Tabla 6c: Condición n.º 20557, 3/termo

Temperatura	Tiempo	Ciclo
95°C	5 min	1 ciclo
95°C	30 s	35 ciclos
55°C	45 s	
72°C	1 min	
72°C	7 min	1 ciclo
4°C	infinito	1 ciclo

Tabla 6d: Condición n.º 20559, 4/termo

Temperatura	Tiempo	Ciclo
95°C	5 min	1 ciclo
95°C	1 min	35 ciclos
55°C	1:30	
72°C	2 min	
72°C	7 min	1 ciclo
4°C	infinito	1 ciclo

5 Se ensayaron los siguientes cebadores que se hibridan selectivamente en un variante de *mecA* (*mecA*<sub>LGA251</sub>) en las condiciones específicas listadas:

MIX 1: control positivo para el variante de *mecA*

MIX 2: oligo de ensayo, *mecAv-orfX6* (SEQ ID NO:6) en el variante de *mecA* (amplicón de 1498 nt de longitud)

MIX 3: oligo de ensayo, *mecAv-orfX-7* (SEQ ID NO:7) en el variante de *mecA* (amplicón de 1484 nt de longitud)

Tabla 7a: Control positivo

Reactivo	MIX/tubo	Concentración final	4 tubos
MIX 1: Control positivo			
Tampón 10X	5 µl	1X	20 µl
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	3 µl	1,5 mM	12 µl
dNTP 25 mM	0,4 µl	0,2 mM	1,6 µl
Cebador + control 10 µM	2 µl	0,4 µM	8 µl
Cebador + control 10 µM	2 µl	0,4 µM	8 µl
Enzima 3,5 U/µl	0,74 µl	2,6 U	3 µl
H <sub>2</sub> O csp 45 µl	31,86 µl	NA	127,4 µl
MIX total	45 µl		180 µl
Diana: ADN 10 ng/µl	5 µl	50 ng	
TOTAL	50 µl		

Tabla 7b: Ensayo de variantes de *mecA-orfX*

MIX 2: <i>mecAv-orfX-9/mecAv-orfX-10/mecAv-orfX-6</i>			
Reactivo	MIX/tubo	Concentración final	10 tubos
Tampón 10X	5 µl	1X	50 µl
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	8 µl	4 mM	80 µl
dNTP 25 mM	1,2 µl	0,6 mM	12 µl
<i>mecAv-orfX-9</i> 10 µM	3 µl	0,6 µM	30 µl
<i>mecAv-orfX-10</i> 10 µM	3 µl	0,6 µM	30 µl
<i>mecAv-orfX-6</i> 10 µM	3 µl	0,6 µM	30 µl
Enzima 3,5 U/µl	1 µl	3,5 U	10 µl
H <sub>2</sub> O csp 45 µl	20,8 µl	NA	208 µl*
MIX total	45 µl		450 µl
Diana: ADN 10 ng/µl	5 µl	50 ng	
TOTAL	50 µl		

Tabla 7c: Ensayo de variantes de *mecA-orfX*

MIX 3: <i>mecAv-orfX-9/mecAv-orfX-10/mecAv-orfX-7</i>			
Reactivo	MIX/tubo	Concentración final	10 tubos
Tampón 10X	5 µl	1X	50 µl
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	8 µl	4 mM	80 µl
dNTP 25 mM	1,2 µl	0,6 mM	12 µl
<i>mecAv-orfX-9</i> 10 µM	3 µl	0,6 µM	30 µl
<i>mecAv-orfX-10</i> 10 µM	3 µl	0,6 µM	30 µl
<i>mecAv-orfX-7</i> 10 µM	3 µl	0,6 µM	30 µl
Enzima 3,5 U/µl	1 µl	3,5 U	10 µl
H <sub>2</sub> O csp 45 µl	20,8 µl	NA	208 µl*
MIX total	45 µl		450 µl
Diana: ADN 10 ng/µl	5 µl	50 ng	
TOTAL	50 µl		

5 Resultados/conclusiones del ensayo

Tabla 8 - Resultados del ensayo de variantes de *mecA-orfX*

<b>Resultados</b>	Variante de <i>mecA</i>	Variante de <i>mecA-orfX</i> ( <i>mecAv-orfX-6</i> )			
ID de la muestra	condición 1	condición 1	condición 2	condición 3	condición 4
cepa n.º 1156001 de la colección de cepas interna	+	+	+	+	+
Cepa ATCC 43300	-	-	-	-	NA
H2O	-	-	-	-	NA
<b>Resultados</b>	Variante de <i>mecA</i>	Variante de <i>mecA-orfX</i> ( <i>mecAv-orfX-7</i> )			
ID de la muestra	condición 1	condición 1	condición 2	condición 3	condición 4
cepa n.º 1156001 de la colección de cepas interna	+	+	+	+	+
Cepa ATCC 43300	-	-	-	-	NA
H2O	-	-	-	-	NA

5 Se descubrió que todas las condiciones funcionaban: se obtuvieron resultados positivos para los variantes de *mecA* y resultados negativos para *mecA*. Ambos cebadores de los variantes de *mecA* fueron eficaces para amplificar el amplicón de variante de *mecA-orfX* y, por tanto, para su uso en un ensayo para detectar cepas de MRSA que portan variantes de *mecA*. A continuación se proporcionan los detalles de una PCR de variantes de *mecA-orfX* que emplea el cebador de *orfX* *mecAv-orfX-9*, el cebador de variante de *mecA* *mecAv-orfX-7*, y el cebador de *orfX* *mecAv-orfX-10* que se preparó y se llevó a cabo. Se logró la amplificación con éxito de un variante de *mecA* (*mecA<sub>LGA251</sub>*).

Tabla 9 - PCR de variantes de *mecA-orfX*

MIX: PCR de variantes de <i>mecAv-orfX</i>			
<b>Reactivo</b>	<b>[C] inicial</b>	Concentración final	<b>volumen/tubo</b>
Tampón	10X	1X	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	4 mM	8 µl
dNTP	25 mM	0,6 mM	1,2 µl
<i>mecAv-orfX-9</i>	10 µM	0,6 µM	3 µl
<i>mecAv-orfX-10</i>	10 µM	0,6 µM	3 µl
<i>mecAv-orfX-7</i>	10 µM	0,6 µM	3 µl
Enzima	3,5 U/µl	3,5 U	1 µl
H <sub>2</sub> O csp 45 µl	NA	NA	20,8 µl
MIX total			45 µl
ADN	10 ng/µl	50 ng	5 µl
TOTAL			50 µl

10

Ciclos de PCR:

Temperatura	Tiempo	Ciclo
94°C	2 min	1 ciclo
94°C	15 s	30 ciclos
55°C	30 s	
72°C	45 s	
72°C	7 min	1 ciclo
4°C	infinito	1 ciclo

**Ejemplo 2b: Amplificación con una sonda en *orfX* y una sonda en el gen del variante de *mecA***

- 5 Después se añadió la sonda y se ensayó la PCR en un instrumento Bio-Rad (sistema de PCR a tiempo real). Se realizaron ensayos con una sonda TaqMan en el *orfX* (*mecAv-orfX-11* (SEQ ID NO:11)) o en el gen del variante de *mecA* (*mecA<sub>LGA251</sub>*: extremo 3') (*mecAv-orfX-8* (SEQ ID NO:8)) (véase a continuación). El fluoróforo utilizado para ambas sondas Taqman es FAM. Se ensayó ADN de cinco muestras (10 ng/μl).

Sonda	SEQ ID NO:	Secuencia (5'→3')
<i>mecAv-orfX-11</i>	11	TGATGCGGGTTGTGTTAATTGAGCAAGTG
<i>mecAv-orfX-8</i>	8	TGGCCAGCTATAATGCTACTATATCTGGA

Las amplificaciones se realizaron bajo las siguientes condiciones:

- 10 Formato de PCR: 45 μl de MIX + 5 μl de diana
- Condiciones de PCR: Se ensayaron 2 sondas a 2 concentraciones (0,3 μM y 0,6 μM)
- Sistema de PCR Expand High Fidelity (Roche, ref. 11732650001, n.º de lote 11398326)
- Se utilizaron las siguientes combinaciones de cebadores y sondas (todas, 10 μM):
- MIX 1: *mecAv-orfX-9/mecAv-orfX-10/mecAv-orfX-7/mecAv-orfX-11* a 0,6 μM
- 15 MIX 2: *mecAv-orfX-9/mecAv-orfX-10/mecAv-orfX-7/mecAv-orfX-11* a 0,3 μM
- MIX 3: *mecAv-orfX-9/mecAv-orfX-10/mecAv-orfX-7/mecAv-orfX-8* a 0,6 μM
- MIX 4: *mecAv-orfX-9/mecAv-orfX-10/mecAv-orfX-7/mecAv-orfX-8* a 0,3 μM

Los resultados fueron los siguientes:

Resultados		MIX 1		MIX 2		MIX 3		MIX 4	
		<i>mecAv-orfX-11/0,6</i> μM		<i>mecAv-orfX-11/0,3</i> μM		<i>mecAv-orfX-8/0,6</i> μM		<i>mecAv-orfX-8/0,3</i> μM	
ID de la muestra	Cepas	Cq	RFU final	Cq	RFU final	Cq	RFU final	Cq	RFU final
1	<i>mecAv</i> (+)	29,51	65,5	21,61	819	28,48	90,9	17,92	1331
2	<i>mecAv</i> (+)	25,89	70,3	N/A	32,5	25,8	57,7	N/A	1,41
3	<i>mecAv</i> (+)	29,53	47,7	N/A	38,1	20,37	91,3	26,56	124

4	<i>mecA</i> (+)	N/A	9,58	28,65	47,5	N/A	-8,87	N/A	3,63
5	MSSA	N/A	6,52	30,32	53	N/A	-1,35	N/A	0,746
H <sub>2</sub> O	NA	6,37	172	N/A	1,36	N/A	3,26	N/A	0,0398
			RFU: umbral con 40						

Los resultados indican que la concentración ideal de sonda, bajo estas condiciones, puede ser de aproximadamente 0,3 µM. Los resultados con la sonda en *orfX* o en el gen de variante de *mecA* fueron ambos buenos. En general, bajo estas condiciones, los ensayos parecen ser más específicos con la sonda en el gen de variante de *mecA*; sin embargo, se pueden ajustar los parámetros, tal como realizar la etapa de asociación a 55 °C, para optimizar el ensayo. También puede optimizarse aún más, por ejemplo, se puede aumentar el número de ciclos, añadir una lectura de FAM después de la última etapa a 72 °C y/o aumentar la temperatura de asociación. Este experimento demuestra que, en cepas de MRSA, es factible realizar una PCR a tiempo real específica entre el *orfX* y el gen de variante de *mecA* a pesar de que se generan amplicones muy largos (aproximadamente 1484 pb).

**Ejemplo 3: Amplificación de la región de unión de SCC*mec*:*orfX* de *mecA* y un tipo no XI**

Puede realizarse un ensayo en combinación con un ensayo para SCC*mec* de tipo XI para detectar también la presencia o la ausencia de cepas de MRSA que portan SCC*mec* de tipo no XI (las que portan *mecA*). También puede realizarse un ensayo en combinación con un ensayo para otras secuencias, tales como una o más regiones genómicas de *S. aureus* y/o *mecA* para caracterizar también el organismo u organismos presentes en una muestra. Estos ensayos pueden realizarse en formato múltiplex o por separado.

**Ejemplo 3a: Detección de la región de la zona de unión del extremo derecho**

Para la detección de la zona de unión del extremo derecho en tipos de SCC*mec* distintos del tipo XI se puede utilizar, en formato múltiplex con un ensayo para detectar el tipo XI o por separado, cebadores localizados en la parte derecha del módulo SCC*mec* y en el *orfX*. Esta reacción puede emplear sondas localizadas en la parte derecha del módulo o en el *orfX*. Pueden ensayarse cepas de MRSA y MSSA empleando un lisado como diana, que se corresponde a 10<sup>5</sup> CPU por reacción de amplificación o como se indica en un kit específico. Por ejemplo, los kits disponibles en el mercado para detectar esta zona de unión incluyen:

NucliSens EasyQ® MRSA	BioMerieux (Marcy l'Etoile, Francia)
Ensayo de MRSA BD GeneOhm™	Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ)
Ensayo de MRSA ACP BD GeneOh™	Becton Dickinson
Ensayo de MRSA BD MAX	Becton Dickinson
Ensayo de MRSA PLEX-ID	Abbott (Ibis Biosciences) (Abott Park, IL)
Ensayo de MRSA Detect-Ready™	Molecular Detection Inc. (MDI) (Wayne, PA)
Ensayo avanzado de MRSA LightCycler®	Roche (Pleasanton, CA)
Xpert MRSA	Cepheid (Sunnyvale, CA)
Xpert MRSA/SA BC	Cepheid
Xpert MRSA/SA SSTI	Cepheid

Además, pueden diseñarse cebadores utilizando Path-MRSA o Path-MRSA std (ambos de Genesig).

**Ejemplo 3b: Amplificación y detección múltiplex del gen *mecA* y la región de inserción del módulo (zona de unión)**

Tal como se muestra en este ejemplo, la amplificación y la detección simultáneas de la región de inserción del módulo y el gen *mecA* puede utilizarse para reducir la detección de ciertas cepas (MRSA falsos positivos) para cepas de tipo no XI. Tal como se describe y ejemplifica en Jay, *et al.* (documento U.S. 20090203013; documento

WO2009085221) y como está disponible en el mercado (NucliSens EasyQ® MRSA (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Francia)), esta estrategia puede utilizarse para una amplificación múltiple para la detección del gen *mecA* y la región de la zona de unión del módulo en el mismo tubo. En un ejemplo, el ensayo emplea 5 cebadores directos específicos del módulo SCCmec en la región de la zona de unión del extremo derecho, 1 cebador inverso en *orfX*, y 5 sondas específicas del módulo SCCmec marcadas para la región de la zona de unión del módulo, en combinación con 1 cebador directo, 1 cebador inverso y 1 sonda marcada para *mecA*. Los resultados de dicho ensayo demuestran que, en el caso de un MSSA que presenta la región de inserción del módulo sin el gen *mecA*, esta porción del ensayo puede proporcionar, de modo adecuado, un resultado "MRSA negativo" (zona de unión de SCCmec (+) más *mecA* (-)).

#### 10 Ejemplo 4: Amplificación de una región genómica de MRSA (*spa*)

Se utilizaron condiciones de PCR convencional, tal como se describió anteriormente, a menos que se indique lo contrario.

El gen *spa* de *S. aureus* es un gen que codifica la proteína A, que es una proteína de la superficie que se encuentra específicamente en la pared celular de bacterias de *Staphylococcus aureus*. Una parte del gen *spa*, la región polimórfica X, es muy variable y se emplea para la tipificación de *spa* que permite diferenciar entre varios *S. aureus*. Sin embargo, en el gen *spa* también están presentes áreas más conservadas y estas se emplean como marcadores específicos para detectar todas las cepas de *S. aureus* (Kuhn, J. C. M., 2007, "Double-locus sequence typing using *clfR* and *spa*, a fast and simple method for epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*").

Después de construir un alineamiento de múltiples secuencias (a partir de una colección de secuencias de bancos de datos patentados y/o públicos), se diseñaron los oligonucleótidos en el área conservada del gen. La amplificación y/o detección resultante de la región *spa* demostró que *S. aureus* estaba presente en la muestra.

Los oligonucleótidos fueron los siguientes:

Oligo	SEQ ID NO:	Secuencia
Cebador-1 de <i>S. aureus</i>	24	CACCTGCTGCAAATGCTG (18 nt)
Cebador-2 de <i>S. aureus</i>	25	CGTTGATCAGCRTTTAAGTTAGGCATATT (29 nt)
Sonda-3 de <i>S. aureus</i>	26	CGCAACACGATGAAGCTCAACAAAATGC (28 nt)

#### Ejemplo 5: Amplificación de una región genómica de MRSA (*nuc*)

El gen *nuc* codifica la nucleasa termoestable de *S. aureus*, también denominada termonucleasa. Este gen es específico de *S. aureus* y está altamente conservado (Bragstad *et al.*, J. C. M., 1992, "Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene").

Después de construir un alineamiento de múltiples secuencias (a partir de una colección de secuencias de bancos de datos patentados y/o públicos), se diseñaron los oligonucleótidos en el área conservada del gen. La amplificación y/o detección resultante de la región *nuc*, bajo condiciones de PCR convencionales tal como se describe en la presente, demostró que *S. aureus* estaba presente en la muestra.

Los oligonucleótidos fueron los siguientes:

Oligo	SEQ ID NO:	Secuencia
Cebador-4 de <i>S. aureus</i>	27	GGTGTAGAGAAATATGGTCCTGAAGC (26 nt)
Cebador-5 de <i>S. aureus</i>	28	GTCCTGAAGCAAGTGCATTTACG (23 nt)
Sonda-6 de <i>S. aureus</i>	29	GGACGTGGCTTAGCGTATATTTATGCTGATG (31 nt)
Cebador-7 de <i>S. aureus</i>	30	GCAACTTTAGCCAAGCCTTGAC (22 nt)

#### Ejemplo 6: Amplificación de *mecA* y de un variante de *mecA*

Pueden utilizarse condiciones de PCR convencional, tal como se describió anteriormente, a menos que se indique lo contrario.

El *mecA* codifica la PBP2a (proteína de unión a penicilina 2a, "Penicillin Binding Protein 2a"), es una PBP modificada. Un variante de *mecA* descubierto recientemente también codifica una proteína que pertenece a la familia



- 5 de PBP2a. Después de construir un alineamiento de múltiples secuencias (a partir de una colección de secuencias de bancos de datos patentados y/o públicos), se diseñaron los oligonucleótidos en las áreas conservadas del gen. Pueden diseñarse oligonucleótidos para amplificar y detectar *mecA* y un variante de *mecA* en la misma reacción simplex o en varias reacciones simplex distintas o en una reacción múltiple. La amplificación y/o detección resultante de *mecA* y/o el variante de *mecA* (en formato simplex o múltiple) demostró que el gen de resistencia a la metilina estaba presente en la muestra.

El *mecA* puede ensayarse mediante amplificación empleando los siguientes oligonucleótidos bajo condiciones de PCR convencionales:

Oligo	SEQ ID NO:	Secuencia
Cebador directo-1 de <i>mecA</i>	12	ACCTTCTACACCTCCATATCAC (22 nt)
Cebador inverso-2 de <i>mecA</i>	13	CGTTACGGATTGCTTCACTG (20 nt)

- 10 El variante de *mecA* puede ensayarse mediante amplificación empleando los siguientes oligonucleótidos para detectar las secuencias del variante de *mecA*:

Oligo	SEQ ID NO:	Secuencia
Cebador directo-1 de <i>mecAv</i>	14	AACACTGATGGTTTTAAGGTATCCA (25 nt)
Cebador directo-2 de <i>mecAv</i>	15	AAGGTATCCATTGCAAATACTTATGACAA (29 nt)
Cebador inverso-3 de <i>mecAv</i>	16	TACCAGATCCATCGTATTTTTTCATATGT (29 nt)
Cebador inverso-4 de <i>mecAv</i>	17	TACCAGATCCATCGTCATTTTTTCATAT (27 nt)
Sonda-5 de <i>mecAv</i>	18	ATTGGAGAAAAAGGCTGAAAACGGAA (26 nt)
Sonda-6 de <i>mecAv</i>	19	ATTGGAGAAAAAGGCTGAAAACGGAAAAGA (30 nt)
Cebador directo-7 de <i>mecAv</i>	20	CCAGATATAGTAGCATTATA (20 nt)
Sonda de cebador inverso-8 de <i>mecAv</i>	21	AAAGATGACGATATTGAG (18 nt)

Como alternativa, el variante de *mecA* puede determinarse empleando un ensayo de variante de *mecA-orfX*. Uno de estos ensayos se ejemplifica en el anterior ejemplo 2.

- 15 A continuación se describe un ensayo para detectar *mecA* y un variante de *mecA*. Se seleccionan secuencias de sonda/cebador en una región común a *mecA* y el variante de *mecA*.

El *mecA*+variante de *mecA* puede amplificarse empleando los siguientes oligonucleótidos:

Oligo	SEQ ID NO:	Secuencia
Cebador-1 de <i>mecA-mecAv</i>	22	TCACCAGGTTCAACYCAAAA (20 nt)
Cebador-2 de <i>mecA-mecAv</i>	23	CCTGAATCWGCTAATAATATTC (23 nt)

- 20 Se entiende que la invención descrita no se limita a la metodología, protocolos y reactivos concretos descritos, ya que estos pueden variar. También se entiende que la terminología empleada en la presente tiene el objetivo de describir solo realizaciones concretas y no pretende limitar el alcance del presente invención, que solo está limitado por las reivindicaciones adjuntas.

- 25 Los expertos en la técnica reconocerán o serán capaces de determinar, sin emplear más que la experimentación habitual, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en la presente. Se pretende que estos equivalentes estén incluidos en las siguientes reivindicaciones.

ES 2 693 158 T3

Oligonucleótido	SEQ ID NO:	Diana	Secuencia
<i>mecAv-orfX-1</i>	1	Variante de <i>mecA-orfX</i>	ATGAAGCAATATCAAAGGA (19 nt)
<i>mecAv-orfX-2</i>	2	Variante de <i>mecA-orfX</i>	TGAAGCAATATCAAAGGAA (19 nt)
<i>mecAv-orfX-3</i>	3	Variante de <i>mecA-orfX</i>	ATAACTTGGTTATTCAAAGATGACGATATT (30 nt)
<i>mecAv-orfX-4</i>	4	Variante de <i>mecA-orfX</i>	ACTTGGTTATTCAAAGATGACGATATTGA (29 nt)
<i>mecAv-orfX-5</i>	5	Variante de <i>mecA-orfX</i>	TGGTTATTCAAAGATGACGATATTGAGA (28 nt)
<i>mecAv-orfX-6</i>	6	Variante de <i>mecA-orfX</i>	ATCCTAATATGTTAATGGCGA (21 nt)
<i>mecAv-orfX-7</i>	7	Variante de <i>mecA-orfX</i>	ATGGCGATTAATGTTAAAGA (20 nt)
<i>mecAv-orfX-8</i>	8	Variante de <i>mecA-orfX</i>	TGGCCAGCTATAATGCTACTATATCTGGA (29 nt)
<i>mecAv-orfX-9</i>	9	Variante de <i>mecA-orfX</i>	TCAGCAAAATGACATTTCCACATCA (25 nt)
<i>mecAv-orfX-10</i>	10	Variante de <i>mecA-orfX</i>	TCAGCAAAATGACATTTCCACATCA (25 nt)
<i>mecAv-orfX-11</i>	11	Variante de <i>mecA-orfX</i>	TGATGCGGGTTGTGTTAATTGARCAAGTG (29 nt)
<i>mecA-1</i>	12	<i>mecA</i>	ACCTTCTACACCTCCATATCAC (22 nt)
<i>mecA-2</i>	13	<i>mecA</i>	CGTTACGGATTGCTTCACTG (20 nt)
<i>mecAv-1</i>	14	Variante de <i>mecA</i>	AACACTGATGGTTTTAAGGTATCCA (25 nt)
<i>mecAv-2</i>	15	Variante de <i>mecA</i>	AAGGTATCCATTGCAAATACTTATGACAA (29 nt)
<i>mecAv-3</i>	16	Variante de <i>mecA</i>	TACCAGATCCATCGTCATTTTTTCATATGT (29 nt)
<i>mecAv-4</i>	17	Variante de <i>mecA</i>	TACCAGATCCATCGTCATTTTTTCATAT (27 nt)
<i>mecAv-5</i>	18	Variante de <i>mecA</i>	ATTGGAGAAAAAGGCTGAAAACGGAA (26 nt)
<i>mecAv-6</i>	19	Variante de <i>mecA</i>	ATTGGAGAAAAAGGCTGAAAACGGAAAAGA (30 nt)
<i>mecAv-7</i>	20	Variante de <i>mecA</i>	CCAGATATAGTAGCATTATA (20 nt)
<i>mecAv-8</i>	21	Variante de <i>mecA</i>	AAAGATGACGATATTGAG (18 nt)
<i>mecA-mecAv-1</i>	22	<i>mecA</i> + variante de <i>mecA</i>	TCACCAGGTTCAACYCAAAA (20 nt)
<i>mecA-mecAv-2</i>	23	<i>mecA</i> + variante de <i>mecA</i>	CCTGAATCWGCTAATAATATTTTC (23 nt)
<i>S. aureus-1</i>	24	<i>spa</i>	CACCTGCTGCAAATGCTG (18 nt)
<i>S. aureus-2</i>	25	<i>spa</i>	CGTTGATCAGCRTTTAAGTTAGGCATATT (29 nt)
<i>S. aureus-3</i>	26	<i>spa</i>	CGCAACACGATGAAGCTCAACAAAATGC (28 nt)
<i>S. aureus-4</i>	27	<i>nuc</i>	GGTGTAGAGAAATATGGTCTGAAGC (26 nt)
<i>S. aureus-5</i>	28	<i>nuc</i>	GTCCTGAAGCAAGTGCATTTACG (23 nt)
<i>S. aureus-6</i>	29	<i>nuc</i>	GGACGTGGCTTAGCGTATATTTATGCTGATG (31 nt)
<i>S. aureus-7</i>	30	<i>nuc</i>	GCAACTTTAGCCAAGCCTTGAC (22 nt)

**Listado se secuencias**

<110> bioMérieux

<120> Detección de cepas variantes *mecA* de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina

<130> P122984

5 <160> 30

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido mecAv-orfX-1

<400> 1

atgaagcaat atcaaagga 19

15 <210> 2

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Oligonucleótido mecAv-orfX-2

<400> 2

tgaagcaata tcaaaggaa 19

<210> 3

<211> 30

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido mecAv-orfX-3

<400> 3

30 ataacttgggt tattcaaaga tgacgatatt 30

<210> 4

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Oligonucleótido mecAv-orfX-4

<400> 4

acttggttat tcaaagatga cgatattga 29

<210> 5

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido mecAv-orfX-5

45 <400> 5

tggttattca aagatgacga tattgaga 28

<210> 6

<211> 21

<212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido mecAv-orfX-6  
 5        <400> 6  
          atcctaatat gtaatggcg a        21  
  
          <210> 7  
          <211> 20  
 10       <212> ADN  
          <213> Secuencia Artificial  
  
          <220>  
          <223> Oligonucleótido mecAv-orfX-7  
  
          <400> 7  
          atggcgatta atgttaaaga        20  
 15       <210> 8  
          <211> 29  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia Artificial  
  
          <220>  
 20       <223> Oligonucleótido mecAv-orfX-8  
  
          <400> 8  
          tggccagcta taatgctact atatctgga        29  
  
          <210> 9  
          <211> 25  
 25       <212> ADN  
          <213> Secuencia Artificial  
  
          <220>  
          <223> Oligonucleótido mecAv-orfX-9  
  
          <400> 9  
 30       tcagcaaaat gacattcca catca        25  
  
          <210> 10  
          <211> 25  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia Artificial  
  
          <220>  
 35       <223> Oligonucleótido mecAv-orfX-10  
  
          <400> 10  
          tcagcaaaat gacattcca catca        25  
  
          <210> 11  
          <211> 29  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia Artificial  
  
          <220>  
          <223> Oligonucleótido mecAv-orfX-11  
  
          <400> 11  
 45       tgatgcggtg tgtgtaatt garcaagtg        29  
  
          <210> 12  
          <211> 22  
          <212> ADN  
 50       <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido mecA-1  
  
 <400> 12  
 acctctaca cctccatc ac        22  
  
 5        <210> 13  
          <211> 20  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido mecA-2  
  
 <400> 13  
 cgttacggat tgctcactg        20  
  
 10       <210> 14  
          <211> 25  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia Artificial  
  
 15       <220>  
          <223> Oligonucleótido mecAv-1  
  
 <400> 14  
 aacactgatg gtttaaggt atcca    25  
  
 20       <210> 15  
          <211> 29  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia Artificial  
  
 25       <220>  
          <223> Oligonucleótido mecAv-2  
  
 <400> 15  
 aaggtatcca ttgcaaatac ttatgacaa    29  
  
 30       <210> 16  
          <211> 29  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido mecAv-3  
  
 35       <400> 16  
          taccagatcc atcgtcattt tcatatgt    29  
  
 <210> 17  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 40       <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido mecAv-4  
  
 <400> 17  
 taccagatcc atcgtcattt tcatat        27  
  
 45       <210> 18  
          <211> 26  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido mecAv-5  
  
 50       <210> 18  
          <211> 26  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia Artificial

<400> 18  
 attggagaaa aaggctgaaa acggaa 26  
  
 <210> 19  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido mecAv-6  
  
 <400> 19  
 attggagaaa aaggctgaaa acggaaaaga 30  
  
 <210> 20  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido mecAv-7  
  
 <400> 20  
 ccagatatag tagcattata 20  
  
 <210> 21  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido mecAv-8  
  
 <400> 21  
 aaagatgacg atattgag 18  
  
 <210> 22  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido mecA-mecAv-1  
  
 <400> 22  
 tcaccaggtt caacycaaaa 20  
  
 <210> 23  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido mecA-mecAv-2  
  
 <400> 23  
 cctgaatcwg ctaataatat ttc 23  
  
 <210> 24  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido S.aureus-1  
  
 <400> 24  
 cacctgctgc aaatgctg 18

<210> 25  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>  
 <223> Oligonucleótido S.aureus-2

<400> 25  
 cgttgatcag crttaaagtt aggcatt 29

10

<210> 26  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido S.aureus-3

15

<400> 26  
 cgcaacacga tgaagctcaa caaaatgc 28

20

<210> 27  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido S.aureus-4

<400> 27  
 ggtgtagaga aataggtcc tgaagc 26

25

<210> 28  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

30

<220>  
 <223> Oligonucleótido S.aureus-5

<400> 28  
 gtcctgaagc aagtcattt acg 23

35

<210> 29  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido S.aureus-6

40

<400> 29  
 ggacgtggct tagcgtatat ttatgctgat g 31

<210> 30  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

45

<220>  
 <223> Oligonucleótido S.aureus-7

<400> 30  
 gcaacttag ccaagccttg ac 22

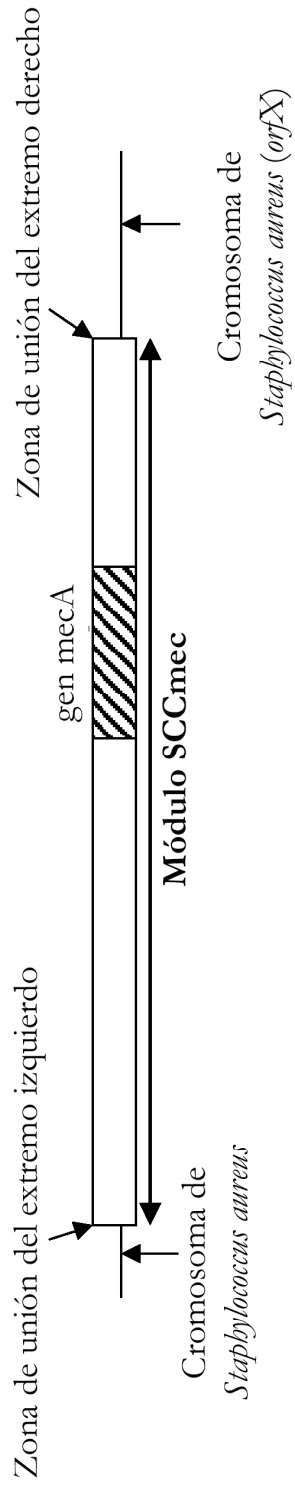
50

## REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para amplificar y detectar en una muestra un *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) que comprende una inserción de un módulo SCCmec dentro del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, en el que el módulo SCCmec comprende un elemento variante de *mecA*, comprendiendo dicho método:
- 5 realizar sobre la muestra una reacción de amplificación utilizando un conjunto de oligonucleótidos que comprende:
- a. un primer oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una región de *orfX* del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, y
- b. un segundo oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una región de un variante de *mecA*, y
- 10 c. un tercer oligonucleótido capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del MRSA entre la región de hibridación del primer oligonucleótido y la región de hibridación del segundo oligonucleótido,
- en el que cada uno del primer oligonucleótido y el segundo oligonucleótido está orientado de modo que, bajo las condiciones de la amplificación, si la muestra contiene el MRSA, la región del MRSA entre la región de hibridación del primer oligonucleótido y la región de hibridación del segundo oligonucleótido se amplifica, y si la muestra
- 15 contiene el MRSA, entonces se detecta la hibridación del tercer oligonucleótido.
- 2.- El método de la reivindicación 1, en el que el tercer oligonucleótido se hibrida específicamente: con una región del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*; una región de *orfX* del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*; o una región del variante de *mecA*.
- 3.- El método de la reivindicación 1, en el que:
- 20 - el primer oligonucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:9 y 10 y/o
- el segundo oligonucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:6, 7, 14, 15, 16, 17, 20 y 21 y/o
- el tercer oligonucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO:8, 11, 18 y 19.
- 25 4.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además amplificar un *Staphylococcus aureus* que comprende *mecA* utilizando, en una reacción de amplificación, un conjunto de oligonucleótidos de *mecA* para la amplificación de un elemento *mecA* que comprende:
- a. un primer oligonucleótido de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del ADN de *mecA*; y
- 30 b. un segundo oligonucleótido de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una segunda región dentro del ADN de *mecA*,
- en el que cada uno del primer oligonucleótido de *mecA* y el segundo oligonucleótido de *mecA* está orientado de tal forma que, bajo las condiciones de la amplificación, se amplifica una porción del ADN de *mecA*,
- y en el que, opcionalmente, el conjunto de oligonucleótidos de *mecA* comprende además un tercer oligonucleótido
- 35 de *mecA* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del *mecA* entre la región de hibridación del primer oligonucleótido de *mecA* y la región de hibridación del segundo oligonucleótido de *mecA*,
- en el que si se emplea el tercer oligonucleótido de *mecA*, entonces si la muestra contiene el MRSA que comprende *mecA*, se detecta la hibridación del tercer oligonucleótido de *mecA*.
- 40 5.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además utilizar un conjunto de oligonucleótidos de *S. aureus* para la amplificación de un ADN cromosómico específico de *Staphylococcus aureus* que comprende:
- a. un primer oligonucleótido de *S. aureus* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región dentro del ADN cromosómico específico de *Staphylococcus aureus*; y
- 45 b. un segundo oligonucleótido de *S. aureus* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una segunda región dentro del ADN cromosómico específico de *Staphylococcus aureus*,
- en el que cada uno del primer oligonucleótido de *S. aureus* y el segundo oligonucleótido de *S. aureus* está orientado de tal forma que, bajo las condiciones de la amplificación, una porción del ADN específico de *S. aureus* se amplifica y, opcionalmente,

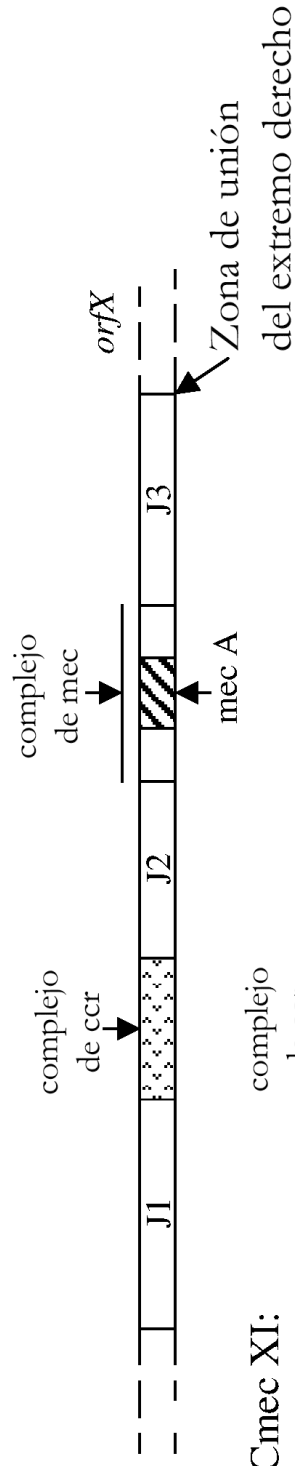


- c. un tercer oligonucleótido de *S. aureus* que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del ADN de *S. aureus* entre la región de hibridación del primer oligonucleótido de *S. aureus* y la región de hibridación del segundo oligonucleótido de *S. aureus*,
- 5 en el que si la muestra contiene la región del ADN de *S. aureus* entre la región de hibridación del primer oligonucleótido de *S. aureus* y la región de hibridación del segundo oligonucleótido de *S. aureus*, entonces se detecta la hibridación del tercer oligonucleótido.
- 6.- El método de la reivindicación 5, en el que el ADN cromosómico específico de *Staphylococcus aureus* se selecciona del grupo que consiste en *spa*, *orfX* y *nuc*.
- 7.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además poner en contacto la muestra amplificada con un tinte intercalante, en el que si la muestra contiene el MRSA, entonces se detecta la intercalación del tinte en un producto de la amplificación.
- 10 8.- Un kit para amplificar y detectar un *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) que comprende una inserción de un módulo *SCCmec* dentro del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, en el que el módulo *SCCmec* comprende un elemento variante de *mecA*, comprendiendo dicho kit un primer conjunto de oligonucleótidos que comprende:
- 15 a. un primer oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una región de *orfX* del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, y
- b. un segundo oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una región de un variante de *mecA*, y
- 20 c. un tercer oligonucleótido capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del MRSA entre la región de hibridación del primer oligonucleótido y la región de hibridación del segundo oligonucleótido, en el que:
- el primer oligonucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:9 y 10; y
- 25 - el segundo oligonucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:6, 7, 14, 15, 16, 17, 20 y 21, y
- el tercer oligonucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico indicada como SEQ ID NO:8, 11, 18 y 19.
- 9.- El uso de un kit para realizar el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, siendo dicho kit un kit para amplificar y detectar un *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) que comprende una inserción de un módulo *SCCmec* dentro del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, en el que el módulo *SCCmec* comprende un elemento variante de *mecA*, comprendiendo dicho kit un primer conjunto de oligonucleótidos que comprende:
- 30 a. un primer oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una región de *orfX* del ADN cromosómico de *Staphylococcus aureus*, y
- b. un segundo oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una región de un variante de *mecA*,
- 35 y
- c. un tercer oligonucleótido capaz de hibridarse específicamente dentro de una región del MRSA entre la región de hibridación del primer oligonucleótido y la región de hibridación del segundo oligonucleótido.
- 10.- El uso según la reivindicación 8, en el que:
- 40 - el primer oligonucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:9 y 10 y/o
- el segundo oligonucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:6, 7, 14, 15, 16, 17, 20 y 21 y/o
- el tercer oligonucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico indicada como SEQ ID NO:8, 11, 18 y 19.
- 11.- El uso según la reivindicación 9 o 10, en el que el kit es el kit según la reivindicación 8.
- 45 12.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o el kit de la reivindicación 8 o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el variante de *mecA* es *mecA*<sub>LGA251</sub>.

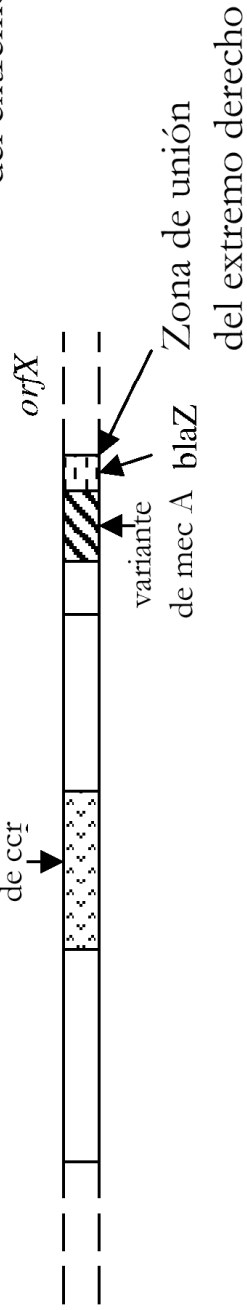


**FIG. 1**

A. Inserción de SCCmec en *Staphylococcus aureus* previamente caracterizada:



B. SCCmec XI:



**FIG. 2**