

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 725 003**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

**G01N 1/38** (2006.01)

**G01N 33/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2008 E 16161557 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.02.2019 EP 3091088**

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

30 Prioridad:

**28.03.2007 US 908604 P**

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

**18.09.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CAPLIN, BRIAN ERICH**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 725 003 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

Sistema y método de análisis de alta resolución de ácidos nucleicos para detectar variaciones de secuencia

Campo

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

Antecedentes

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

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

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

Aunque se han establecido métodos para identificar variaciones de secuencia de ácido nucleico en microorganismos, las técnicas existentes están limitadas por el requisito de conocimiento previo de las mutaciones  
45 particulares u otras variaciones que se utilizan como indicadores de diagnóstico. Como resultado, los procedimientos de detección conocidos a menudo pasan por alto las variaciones de secuencia recientemente desarrolladas y/o no caracterizadas asociadas con la resistencia al fármaco u otras características de interés.

Por consiguiente, existe una necesidad en la técnica de métodos rápidos, asequibles y fiables para detectar tanto las variaciones conocidas como desconocidas de la secuencia de ácidos nucleicos que tengan utilidad diagnóstica, incluidas las mutaciones asociadas con la sensibilidad al fármaco y / o los patrones de resistencia al fármaco en una amplia variedad de organismos. tales como levaduras, virus, hongos, bacterias, parásitos e incluso humanos. Masny  
50 Aleksander et al. discute el uso de bajas temperaturas de desnaturalización (80-88 °C) durante la PCR mediada por ligación (LM PCR) del ADN bacteriano, para la amplificación de conjuntos limitados de los fragmentos de ADN menos estables. Los autores de este estudio creen que el método descrito se puede usar para amplificar y aislar los fragmentos de ADN menos estables en un genoma. (Masny Aleksander et al.; Ligation mediated PCR performed at low denaturation temperatures - PCR melting profiles"; Nucleic Acids Research; Vol. 31; No. 18; E114; 15 September 2003). Daniel Sullivan et al., discuten consideraciones generales para lograr PCR rápida sin un ciclador térmico  
55 especializado. El método de PCR rápida de este documento se lleva a cabo a una temperatura entre 70 °C y 98 °C (Daniel Sullivan et al.; Fast PCR: General Considerations for Minimizing Run Times and Maximizing Throughput; 7 March 2007; URL: [http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsl/literature/Bulletin\\_5362.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsl/literature/Bulletin_5362.pdf)).

Anónimo; Realización de PCR rápida utilizando cicladores térmicos Bio-Rad; 1 de enero de 2005; URL: [http://www.bio-rad.com/LifeScience/jobs/2005/05-0739/fast\\_pcr.pdf](http://www.bio-rad.com/LifeScience/jobs/2005/05-0739/fast_pcr.pdf); discute un método de PCR rápido que se realiza entre 70 °C y 98 °C.

#### Sumario

5 En un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para amplificar un ácido nucleico diana mediante PCR en tiempo real, en donde: a) los cebadores de oligonucleótidos se hibridan con el ácido nucleico diana; y b) el ácido nucleico diana está amplificado y desnaturalizado; en donde los cebadores de oligonucleótidos están diseñados para tener una T<sub>m</sub> de cebador que está dentro de 15 °C de la temperatura de fusión del ácido nucleico diana y en donde el método se lleva a cabo a una temperatura entre 75 °C y 90 °C.

10 Se proporcionan métodos para determinar la capacidad de respuesta de un microorganismo a un fármaco, comprendiendo los métodos obtener una muestra biológica de un paciente, conteniendo la muestra un microorganismo infeccioso; amplificar uno o más segmentos de ADN del microorganismo, incluyendo el uno o más segmentos al menos un polimorfismo asociado con la capacidad de respuesta del microorganismo a un fármaco de interés; y ensayar uno o más segmentos de ADN amplificado para determinar las variaciones de secuencia con respecto a una secuencia de referencia, en donde una variación en uno o más de los segmentos de ADN amplificado indica la capacidad de respuesta del microorganismo al fármaco.

En algunas realizaciones preferidas, el ADN amplificado se ensaya para variaciones de secuencias usando análisis de las curvas de fusión de alta resolución. En diversos ejemplos, el análisis de las curvas de fusión implica incubar el ADN amplificado (ADN diana) con una secuencia de referencia complementaria, tal como una secuencia de tipo silvestre, en presencia de un colorante fluorescente que se une a ADN que emite un nivel de fluorescencia sustancialmente diferente en presencia de ADN bicatenario (ADN<sub>bc</sub>) con respecto a ADN monocatenario (ADN<sub>mc</sub>). En algunas realizaciones preferidas, el colorante que se une al ADN es un colorante específico de ADN<sub>bc</sub>, tal como SYBR Green I o SYBR Green II, y el análisis de las curvas de fusión implica monitorizar el nivel de fluorescencia como una función del tiempo a medida que la disolución de ensayo se calienta lentamente a una velocidad constante. Ventajosamente, el análisis de las curvas de fusión según los métodos proporcionados en el presente documento puede detectar con exactitud desapareamientos de pares de bases individuales entre una secuencia de ADN diana y una secuencia de referencia, y/o los desapareamientos en dos, tres, cuatro, cinco, o más bases.

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

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

40 En algunos ejemplos, el ADN de MTb de SEQ ID NOS: 142-204 se amplifica por PCR usando los cebadores correspondientes de SEQ ID NOS: 11-136.

En diversos ejemplos, el ADN de MTb amplificado comprende una o más de las SEQ ID NOS: 142-145, y una variación en uno o más de los segmentos de ADN amplificado indica la sensibilidad de MTb a la rifampicina; el ADN de MTb amplificado comprende una o más de las SEQ ID NOS: 146-151, y una variación en uno o más de los segmentos de ADN amplificado indica la sensibilidad de MTb a pirazinamida; el ADN de MTb amplificado comprende una o más de las SEQ ID NOS: 152-154, y una variación en uno o más de los segmentos de ADN amplificado indica la sensibilidad de MTb a la estreptomina; el ADN de MTb amplificado comprende una o más de las SEQ ID NOS: 155-176, y una variación en uno o más de los segmentos de ADN amplificado indica la sensibilidad de MTb a la isoniacida; el ADN de MTb amplificado comprende una o más de las SEQ ID NOS: 177-198, y una variación en uno o más de los segmentos de ADN amplificados indica la sensibilidad de MTb al etambutol; el ADN de MTb amplificado comprende una o más de las SEQ ID NOS: 199-203, y una variación en uno o más de los segmentos de ADN amplificados indica la sensibilidad de MTb a uno o ambos de capreomicina y viomicina; y/o el ADN de MTb amplificado comprende la SEQ ID NOS: 204; y una variación en el segmento de ADN amplificado indica la sensibilidad de MTb a uno o más de oxifloxacina, moxifloxacina, gatifloxacina, sitafloxacina, ofloxacina, levofloxacina y esparfloxacina.

Se proporcionan kits para determinar si un paciente es susceptible de ser tratado con un fármaco, donde los kits comprenden al menos un par de cebadores de las SEQ ID NOS: 1-136; al menos una sonda de nucleótidos complementaria a un amplicón de las SEQ ID NOS: 137-204; e instrucciones para usar el al menos un par de

cebadores para amplificar el ADN de una muestra biológica de un paciente infectado con *Mycobacterium tuberculosis* (MTb), y usar la al menos una sonda de nucleótidos para detectar variaciones de secuencia dentro del ADN amplificado utilizando el análisis de curva de fusión de alta resolución .

5 Realizaciones preferidas de la invención en cualquiera de sus diversos aspectos son como se describen a continuación o como se define en las sub-reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Una representación gráfica de un diseño para solapar las temperaturas de hibridación de cebadores y las temperaturas de desnaturalización de moldes.

Figura 2: Una ilustración de productos de amplificación convencionales por PCR en tiempo real.

10 Figura 3: Una gráfica que muestra la amplificación por PCR a alta temperatura del mismo molde usado en la Figura 2.

Figura 4: Gráfico que muestra la amplificación por HTPCR del mismo material de molde usando diferentes concentraciones de material de partida

15 Figura 5: A - Comparación de productos de HTPCR del gen CFP32 de *M. tuberculosis* en agua y MycoBuffer. B - Comparación de productos de HTPCR de la región del gen IS6110 de *M. tuberculosis* en agua y MycoBuffer. C - Comparación de productos de HTPCR de la región del gen btMTb de *M. tuberculosis* en agua y MycoBuffer. D - Comparación de productos de HTPCR de la región del gen diana IS6110 de transposasa de *M. tuberculosis* en agua y MycoBuffer. E - Comparación de productos de HTPCR de la región del gen BTTb de *M. tuberculosis* en agua y MycoBuffer.

20 Figura 6: Representaciones gráficas de los productos de amplificación de un cribado de resistencia a rifampicina. A - Productos de amplificación de homodúplex y heterodúplex. B - Curvas de fusión de los productos de homo- y heterodúplex. C - Representación de diferencias entre las curvas de fusión en B.

Figura 7: Representación gráfica del análisis de las curvas y curvas de diferencias de muestras de control y sensibles.

25 Figura 8: Representación gráfica que muestran diferentes curvas fluorescentes para diferentes ácidos nucleicos.

Figura 9: Representación gráfica del análisis de las curvas de diferencias entre muestras de control, resistentes y sensibles.

Figura 10A: Análisis de curvas de diferencias de muestras sensibles y resistentes a rifampicina de *M. tuberculosis*. B. Análisis de curvas de diferencias de muestras sensibles y resistentes a estreptomocina de *M. tuberculosis*.

30 Figura 11: Análisis de curvas de diferencias de muestras resistentes a terbinafina de *S. cerevisiae*.

Figura 12: Análisis de curvas de diferencias de muestras sensibles y resistentes a taxano de seres humanos.

Figura 13: Análisis de curvas de diferencias de muestras resistentes a cloroquina de infecciones de malaria.

Figura 14: Análisis de curvas de diferencias de muestras sensibles y resistentes a zidovudina del VIH.

Figura 15: Análisis de curvas de diferencias de muestras sensibles y resistentes a vancomicina de *S. aureus*.

35 Figura 16: Análisis en gel de agarosa de productos ADN de *M. tuberculosis* amplificados por simulación por amplificación de flujo dinámico.

Figura 17: Análisis en tiempo real de productos de amplificación de ADN de *S. typhimurium* por amplificación de flujo dinámico.

Descripción detallada de aspectos ilustrativos

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

45

El término "microorganismo", como se usa en el presente documento, puede referirse a bacterias, hongos,

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

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

Una "muestra biológica" descrita en el presente documento puede incluir cualquier material biológico tomado de un sujeto, que incluye, pero no se limita a, expectoraciones (por ejemplo, esputo), sangre, glóbulos sanguíneos (por ejemplo, linfocitos), tejido, biopsias, células cultivadas, líquido pleural, peritoneal, o cefalorraquídeo, sudor, heces y orina. En algunos ejemplos, una muestra biológica de un sujeto se trata, por ejemplo, para cultivar un microorganismo infeccioso y/o amplificar su material genético, antes de ser ensayada según métodos proporcionados en el presente documento.

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

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

El término "ácido nucleico de referencia", como se usa en el presente documento, se refiere a un ácido nucleico correspondiente a un ácido nucleico diana (por ejemplo, que representa la misma porción de ADN genómico), que se diferencia del ácido nucleico diana por una o más variaciones de secuencias. Por ejemplo, en algunos ejemplos, un ácido nucleico de referencia tiene la secuencia de un microorganismo de tipo silvestre (por ejemplo, con respecto a reactividad a un fármaco de interés). En ejemplos adicionales, un ácido nucleico de referencia tiene la secuencia de una célula humana de tipo silvestre, tal como una célula enferma, que incluye, por ejemplo, una célula cancerosa humana.

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

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

El término "elemento de secuencia variable" se refiere a una región de un ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN) comprendida de una serie de nucleótidos adyacentes - por ejemplo, 2, 3, 5, 10, 15, 25, 50, 75, 100 o más bases consecutivas - que incluye al menos una variación de secuencia conocida por estar asociada a una característica fenotípica de interés, tal como resistencia, sensibilidad y/u otros aspectos de reactividad a fármacos. Sin quedar ligado a teoría particular, se cree que es probable que las variaciones de secuencias asociadas a reactividad a

fármacos, tales como resistencia y/o sensibilidad a fármacos, se produzcan en regiones del ácido nucleico que son importantes en la determinación del fenotipo receptivo, de forma que es sustancialmente más probable que un elemento de secuencia variable que incluye la variación (y nucleótidos de alrededor) contenga variaciones no caracterizadas adicionales asociadas al fenotipo receptivo (por ejemplo, resistente o sensible). Por ejemplo, una  
 5 variación de secuencia asociada a resistencia a fármacos se producirá frecuentemente en una región de un ácido nucleico que codifica un sitio de la proteína correspondiente que es un determinante estructural y/o funcional de reactividad a fármacos, tal como un sitio de unión a fármaco. Un elemento de secuencia variable que incluye la variación conocida (y nucleótidos de alrededor) probablemente codificará porciones estructuralmente y/o  
 10 funcionalmente relacionadas de la proteína (por ejemplo, un bolsillo, pliegue u otra estructura que comprende el sitio de unión a fármaco), y variaciones no caracterizadas adicionales dentro del elemento de secuencia variable probablemente se asociarán al mismo fenotipo que la variación conocida.

Así, en el presente documento se proporcionan métodos de ensayo de fenotipos receptivos a fármaco asociados a variaciones de secuencias conocidas y/o desconocidas. Ventajosamente, tales métodos son capaces de detectar reactividad a fármacos sin conocimiento previo de variaciones de secuencias de ácidos nucleicos específicas, permitiendo la rápida identificación de nuevas mutaciones genéticas asociadas a resistencia a fármacos, sensibilidad a fármacos y/u otros fenotipos receptivos a fármacos. Como tales, los métodos proporcionados en el presente documento pueden lograr mayor sensibilidad y utilidad de diagnóstico que los métodos existentes basados en mutaciones caracterizadas.

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

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

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

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

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

Las condiciones precisas usadas para amplificar una secuencia de ADN diana específica pueden variar según varios factores que están dentro del conocimiento de los expertos en la materia. En algunos ejemplos, la desnaturalización se realiza a entre aproximadamente 90-95 °C durante aproximadamente 10-30 segundos, la hibridación se realiza a aproximadamente 45-65 °C durante aproximadamente 10-30 segundos; la extensión se realiza a aproximadamente

70-75 °C durante aproximadamente 10-90 segundos; y una extensión final se realiza a 72 °C durante aproximadamente 5 minutos. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende ADN genómico, MgCl<sub>2</sub> y otras sales fisiológicas (por ejemplo, MnCl<sub>2</sub>), tampón de PCR, dNTP 0,1-1,0 mM, 0,04-1,5 μM de cada cebador y 0,5-5,0 unidades de polimerasa termoestable (por ejemplo, Taq polimerasa).

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

Se describen cebadores novedosos para su uso en amplificar ácidos nucleicos diana para el análisis según métodos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, en diversas realizaciones, los pares de cebadores expuestos en la Tabla 2 pueden usarse para amplificar los amplicones correspondientes expuestos en la Tabla 3, que pueden usarse en diversos métodos descritos en el presente documento para detectar variaciones de  
15 secuencias indicativas de resistencia a fármacos.

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

El MCA usado para detectar las variaciones de secuencias en métodos proporcionados en el presente documento implica incubar una muestra que contiene un ácido nucleico diana con una sonda de nucleótido en presencia de un colorante de unión a ADN fluorescente, y monitorizar el grado de hibridación (indicado por el nivel de fluorescencia) en función del tiempo y la temperatura. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un elemento de secuencia variable de  
30 la Tabla 3 se amplifica en una muestra biológica, y la muestra amplificada se incuba con una sonda de nucleótido complementaria a la secuencia de tipo silvestre expuesta en la Tabla 3 en presencia de un colorante de unión a ADNbc. La muestra se calienta entonces lentamente a una velocidad constante (por ejemplo, aproximadamente 0,05 a 10,0 °C por minuto) mientras que se mide el nivel de fluorescencia con el tiempo. En diversos ejemplos preferidos se realiza un MCA de control paralelo, en el que se sabe que el ADN diana tiene la secuencia de tipo silvestre  
35 expuesta en la Tabla 3. El ADN diana se hibrida con las sondas de nucleótido complementarias para formar ADNbc a las bajas temperaturas iniciales, mientras que el ADNbc se desnaturaliza a medida que aumenta la temperatura, convirtiendo el ADNbc en ADNmc. La conversión de ADNbc a ADNmc va acompañada de cambios en la fluorescencia que son característicos del colorante particular usado. Ventajosamente, pueden detectarse variaciones de secuencias en la muestra biológica analizando el cambio en la fluorescencia con el tiempo con respecto al de la  
40 muestra de control.

En diversos ejemplos preferidos, el MCA usado en los métodos proporcionados en el presente documento permite detección de "alta resolución" de variaciones de secuencias dentro de una secuencia diana, que se detectan como cambios en uno o más aspectos de los datos de fluorescencia. En algunos ejemplos preferidos, el MCA de alta resolución según los métodos proporcionados en el presente documento puede distinguir entre especies de muestra-sonda y control-ADNbc de sonda que difieren por una única base, y/o por 2, 3, 4, 5, o más bases.  
45

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

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

50 en la que F es la fluorescencia, F<sub>máx</sub> es la máxima fluorescencia, F<sub>mín</sub> es la mínima fluorescencia, k es la constante de velocidad de segundo orden, t<sub>0</sub> es el tiempo a F<sub>mín</sub> y [ADN] es la concentración conocida del producto amplificado. En algunos ejemplos se usan múltiples variables de los datos de fluorescencia frente al tiempo para definir un grupo de criterios que sirve de "huella de MCA" que identifica inequívocamente una o más secuencias asociadas a un fenotipo de interés, tal como resistencia a fármacos. Por ejemplo, en algunos ejemplos, un fenotipo resistente a  
55 fármacos puede ensayarse realizando MCA usando ADN amplificado de una muestra biológica, y comparando los datos de fluorescencia frente al tiempo con una huella de MCA establecida.

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

10 En diversos ejemplos, el ADN de MTb amplificado comprende una o más de SEQ ID NOS: 142-145, y una variación en uno o más de los fragmentos de ADN amplificados indica sensibilidad de MTb a rifampicina; el ADN de MTb amplificado comprende una o más de SEQ ID NOS: 146-151, y una variación en uno o más de los fragmentos de ADN amplificados indica sensibilidad de MTb a pirazinamida; el ADN de MTb amplificado comprende una o más de SEQ ID NOS: 152-154, y una variación en uno o más de los fragmentos de ADN amplificados indica sensibilidad de MTb a estreptomina; el ADN de MTb amplificado comprende una o más de SEQ ID NOS: 155-176, y una variación en uno o más de los fragmentos de ADN amplificados indica sensibilidad de MTb a isoniazida; el ADN de MTb amplificado comprende una o más de SEQ ID NOS: 177-198, y una variación en uno o más de los fragmentos de ADN amplificados indica sensibilidad de MTb a etambutol; el ADN de MTb amplificado comprende una o más de SEQ ID NOS: 199-203, y una variación en uno o más de los fragmentos de ADN amplificados indica sensibilidad de MTb a uno o ambos de capreomicina y viomicina; y/o el ADN de MTb amplificado comprende SEQ ID NO: 204; y una variación en el segmento de ADN amplificado indica sensibilidad de MTb a uno o más de oxifloxacino, moxifloxican, gatifloxican, sitafloxacino, ofloxacino, levofloxacino y esparfloxacino.

15 Se proporcionan métodos para ensayar una muestra biológica para VIH resistente a fármacos, en los que los métodos comprenden amplificar el elemento de secuencia variable de SEQ ID NO: 1 usando el par de cebadores correspondiente de SEQ ID NOS: 1 y 2, y ensayar la muestra para variaciones de secuencias dentro de la secuencia amplificada usando MCA, y en los que la detección de una o más variaciones dentro del amplicón de la muestra biológica con respecto a una muestra de control o un patrón conocido es indicativa de VIH resistente a fármacos. En algunos ejemplos, la detección de una o más variaciones dentro del amplicón es indicativa de VIH resistente a zidovudina y/o nevirapina.

20 Se proporcionan métodos para ensayar una muestra biológica para malaria resistente a fármacos, en los que los métodos comprenden amplificar el elemento de secuencia variable de SEQ ID NO: 2 usando el par de cebadores correspondiente de SEQ ID NOS: 1 y 2, y ensayar la muestra para variaciones de secuencias dentro de la secuencia amplificada usando MCA, y en los que la detección de una o más variaciones dentro del amplicón de la muestra biológica con respecto a una muestra de control o un patrón conocido es indicativa de malaria resistente a fármacos. En algunos ejemplos, la detección de una o más variaciones dentro del amplicón es indicativa de malaria resistente a cloroquina.

25 Se proporcionan métodos para ensayar una muestra biológica para células cancerosas resistentes a fármacos, en los que los métodos comprenden amplificar el elemento de secuencia variable de SEQ ID NO: 1 usando el par de cebadores correspondiente de SEQ ID NOS: 1 y 2 y/o el elemento de secuencia variable de SEQ ID NO: 2 usando el par de cebadores de SEQ ID NOS: 3 y 4, y ensayar la muestra para variaciones de secuencias dentro de una o ambas de las secuencias amplificadas usando MCA, y en los que la detección de una o más variaciones dentro de uno o ambos de los amplicones de la muestra biológica con respecto a una muestra de control o un patrón conocido es indicativa de células cancerosas resistentes a fármacos. En algunos ejemplos preferidos, la detección de una o más variaciones dentro de los amplicones de SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 2 es indicativa de células cancerosas resistentes a epiltóna y/o taxano.

30 Se proporcionan métodos para ensayar una muestra biológica para *S. cerevisiae* resistente a fármacos, en los que los métodos comprenden amplificar el elemento de secuencia variable de SEQ ID NO: 1 usando el par de cebadores correspondiente de SEQ ID NOS: 1 y 2, y ensayar la muestra para variaciones de secuencias dentro de la secuencia amplificada usando MCA, y en los que la detección de una o más variaciones dentro del amplicón de la muestra biológica con respecto a una muestra de control o un patrón conocido es indicativa de *S. cerevisiae* resistente a fármacos. En algunos ejemplos preferidos, la detección de una o más variaciones dentro del amplicón es indicativa de *S. cerevisiae* resistente a terbinafina.

35 Se proporcionan métodos para ensayar una muestra biológica para *S. aureus* resistente a fármacos, en los que los métodos comprenden amplificar el elemento de secuencia variable de SEQ ID NO: 1 usando el par de cebadores correspondiente de SEQ ID NOS: 1 y 2, y ensayar la muestra para variaciones de secuencias dentro de la secuencia amplificada usando MCA, y en los que la detección de una o más variaciones dentro del amplicón de la muestra biológica con respecto a una muestra de control o un patrón conocido es indicativa de *S. aureus* resistente a fármacos. En algunos ejemplos preferidos, la detección de una o más variaciones dentro del amplicón es indicativa de *S. aureus* resistente a vancomicina y/o  $\beta$ -lactama.

## ES 2 725 003 T3

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

Organismo/Células	Región diana (Gen o region)	Resistencia al fármaco/ Propósito
VIH	Conector RT N348I	Zidovudina/Nevirapina
Malaria	Resistencia a la cloroquina Transportador K76T	Cloroquina
Células de cáncer humano	Beta tubulina T274I	epotilona/taxanos
Células de cáncer humano	Beta tubulina R282N	epotilona/taxanos
S. cerevisiae	ERG1 F420L	Terbinafina
Staphalococcus aureus	SA1702 H164R	vancomicina/Beta-lactama
MTb v176F	ARN polimerasa B V176F	Rifampicina
MTb 80bp Área caliente	ARN polimerasa B 80bp área caliente	Rifampicina
MTb CIII a	ARN polimerasa B CIIIa	Rifampicina
MTb CIIIb	ARN polimerasa B CIIIb	Rifampicina
MTb	pncA -11 hasta codón 105	Pirazinamida
MTb	pncA codones 254 a 359	Pirazinamida
MTb	pncA codones 537 a 545	Pirazinamida
MTb	pncA codones 128 a 254	Pirazinamida
MTb	pncA codones 374 a 446	Pirazinamida
MTb	pncA codones 464 a 519	Pirazinamida
MTb	rpsL codones 43 a 88	Estreptomicina
MTb	rrs	Estreptomicina
MTb	rrs	Estreptomicina

ES 2 725 003 T3

Organismo/Células	Región diana (Gen o region)	Resistencia al fármaco/ Propósito
MTb	furA detecta codón 5 evita codón 115	Isoniazid
MTb	ahpC -67 suba a codón 5	Isoniazid
MTb	ahpC codón 19 y 32	Isoniazid
MTb	ahpC codón 73	Isoniazid
MTb	ahpC codón 191	Isoniazid
MTb	inhA codón 16-95	isoniazid
MTb	inhA codón 194	isoniazid
MTb	iniA codón 3	isoniazid
MTb	iniA codones 481 y 537	isoniazid
MTb	mabA -147 hasta codón 63	isoniazid
MTb	Rv0340 codón 163	isoniazid
MTb	Rv1592c codón 42	isoniazid
MTb	Rv1592c codones 321 y 322	isoniazid
MTb	Rv1592c codón 430	isoniazid
MTb	katG -17 hasta codón 38	isoniazid
MTb	katG codón 63 a 128	isoniazid
MTb	katG codones 132 a 302	isoniazid
MTb	katG codones 313 a 350	isoniazid
MTb	katG codones 381 y 494	isoniazid
MTb	katG codones 515 y 595	isoniazid
MTb	katG codones 617 y 658	isoniazid
MTb	katG codón	isoniazid

ES 2 725 003 T3

Organismo/Células	Región diana (Gen o region)	Resistencia al fármaco/ Propósito
MTb	embC codón 394	Etambutol
MTb	embC codón 733	Etambutol
MTb	embA-43 hasta codón 14	etambutol
MTb	embA codón 210	etambutol
MTb	embA codones 321 y 350	etambutol
MTb	embA codón 462	etambutol
MTb	embA codones 833 a 913	etambutol
MTb	embB codones 297 a 332	etambutol
MTb	embB codón 406	etambutol
MTb	embB codón 497	etambutol
MTb	embB codón 745	etambutol
MTb	embB codones 955 a 1024	etambutol
MTb	rmlA2 codón 152	etambutol
MTb	iniC codones 245 a 251	etambutol
MTb	iniA codón 308	etambutol
MTb	iniA codón 501	etambutol
MTb	iniB -89hasta codón 47	etambutol
MTb	Rv3124 -16hasta codón 54	etambutol
MTb	RmID -71ups	etambutol
MTb	RmID codón 284	etambutol
MTb	embR -136ups	etambutol
MTb	embR codón 379	etambutol
MTb	thyA nt7to64	Capreomicina/Viomicina

Organismo/Células	Región diana (Gen o region)	Resistencia al fármaco/ Propósito
MTb	thyA nt 200 a 310	Capreomicina/Viomicina
MTb	thyA nt353 a 400	Capreomicina/Viomicina
MTb	thyA nt477 a 586	Capreomicina/Viomicina
MTb	thyA nt 653 a 758	Capreomicina/Viomicina
MTb	gyrA codones 90 y 94	oxifloxacina (Moxifloxacina/ Gatifloxacina/Sitafloxacina/ Ofloxacina/Levofloxacina/ Sparfloxacina)
MTb - Mycobacterium tuberculosis		

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

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

En diversos ejemplos, se proporcionan métodos para mejorar la detección de secuencias de ácidos nucleicos en muestras biológicas usando PCR en tiempo real, colorantes de unión a ADNbc y enfoques basados en sonda fluorescente.

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

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

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

40 En diversos ejemplos, se proporcionan métodos de aislamiento, amplificación y análisis de ácidos nucleicos diana de

## ES 2 725 003 T3

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

- 5 En algunos ejemplos, MTb aislado se fracciona de una muestra de esputo usando un método de preparación de organismos vivos convencional, tal como el método de Petroff, que deja pequeñas cantidades del organismo MTb en una suspensión acuosa. Los ácidos nucleicos de MTb se aíslan de la muestra usando el kit comercialmente disponible MycoBuffer (RAOGene; Milford, PA) según instrucciones del fabricante, de forma que al menos pequeñas cantidades de ADN de MTb se aíslan en el material residual del producto de MycoBuffer. Pueden aislarse cantidades mayores de ADN.
- 10 Las muestras de ADN obtenidas del uso de la disolución de lisis se someten a un cribado primario para ADN de MTb usando cualquier método de amplificación de ADN que inhiba o elimine la formación de productos de ácido nucleico no específicos. Por tanto, el método de amplificación puede realizarse durante periodos de tiempo prolongados para explicar la baja cantidad de ADN normalmente presente en los lisados primarios. Cebadores a modo de ejemplo que cubren estas regiones de interés se presentan en la Tabla 2.
- 15 Tabla 2: Cebadores a modo de ejemplo para la amplificación de regiones diana

Organismo	Diana	Seq. No.	Avance	Reverso	Acceso #
VIH	Conector RT N348I	1	AAGGCCAATGGACATATC AAA	GGGCACCCCT CATTCTT	NP_705927
Malaria	Resistencia a la Cloroquina Transportador K76T	3	TATTTATTTAAGTGTATGT GTAATG	CAATTTTGTTT AAAGTTCTTT TAGC	MAL7P1.27
Células de cáncer humano	Beta tubulina T274I	5	TCCCACGTCTCCATTT	TGAGTTCCGG CACTGT	NP_821133
Células de cáncer humano	Beta tubulina R282N	5	TCCCACGTCTCCATTT	TGAGTTCCGG CACTGT	NM_178014
S. cerevisiae	ERG1 F420L	7	TTCAATGCTAAGAATCCTG CTC	AGATTGGCAT ATGATCACTA CC	M64994
staph aureus	SA1702 H164R	9	AAAGCTGCAAATATTAAG GA	GGCAATATAA CCTGCAC	NC_002745
MTb v176F	ARN polimerasa B V176F	11	GAGCGTGTGGTGGTCAG	CGTCTTGTCG GTGGACT	BX842579
MTb 80bp Área caliente	ARN polimerasa B 80bp área caliente	13	CAAGGAGTTCTTCGGCAC C	GGACCTCCAG CCCGCA	
MTb CIII a	ARN polimerasa B CIIIa	15	OGTGGCACAGGCCAAT	GAAGCGACCG TCCGCA	
MTb CIIIb	ARN polimerasa B CIIIb	17	CCGCGCGTGCTGGTC	TCCATGTAGT CCACCTCAG	
MTb	pncA -11 a 105	19	CAGTCGCCCGAACGTA	TGGTAGTCCG CCGCT	NC_000962

ES 2 725 003 T3

Organismo	Diana	Seq. No.	Avance	Reverso	Acceso #
MTb	pncA 254 a 359	21	CAATCGAGGCGGTGTTCT	CGACGCCGCG TTG	
MTb	pncA 537 a 545	23	GATGCGCACCGCCA	GCGGTGCCAT CAGGAG	
MTb	pncA 128 a 254	25	GCGGCGGACTACCAT	GATTGCCGAC GTGTCCAG	
MTb	pncA 374 a 446	27	GCAACGCGGCGTC	CCCTGGTGGC CAAGC	
MTb	pncA 464 a 519	29	GCTTGCCACCAGGG	CTGGCGGTGC GCATC	
MTb	rpsL	31	CCGCGTGTACACCACCA	AGCGCACACC AGGCAG	AF367438
MTb	rrs	33	GGATTGACGGTAGGTGGA GA	ACGCTCGCAC CCTACGTATT A	cp000717.1
MTb	rrs	35	CCCGCCTGGGGAGT	CATGCTCCGC CGCTT	L15307.1
MTb	furA detecta codón 5 evita codón 115	39	TAGCCAAAGTCTTGACTG AT	GCGCATTAC TGCTTC	Rv1909c
MTb	ahpC -67 hasta codón 5	39	TGTGATATATCACCTTTGC CT	CGGGGAATTG ATCGCC	Rv2428
MTb	ahpC codón 19 y 32	41	ACCAGCTCACCGCTC	GGTGATAGTG GTGAAGTAGT	
MTb	ahpC codón 73	43	GCGTTCAGCAAGCTCA	CGCGAATTCG CTGTCA	
MTb	ahpC codón 191	45	CTGTGCGCATGCAAC	TCCCGGTTAG GCCGA	
MTb	inhA codón 16-95	47	CAAACGGATTCTGGTTAG CG	GGTTGATGCC CATCCCG	Rv1484
MTb	inhA codón 194	49	CAAGTACGGTGTGCGTT	GCCGACGATC GCACTC	Rv1484

ES 2 725 003 T3

Organismo	Diana	Seq. No.	Avance	Reverso	Acceso #
MTb	iniA codón 3	51	GAGCCGATTTACGAACC	CTCGTTTACG CCTCAGA	
MTb	iniA codones 481 537	53	TGGGCCGGATGGAATC	GACGACGAAC GAAATGT	Rv0342
MTb	mabA -147 hasta codón 63	55	CTGCTGCGCAATTCGTA	GATCCCCCGG TTTCCT	Rv1483
MTb	Rv0340 condón 163	57	GCCGACAGACCATCC	GTCGTAGCCG TGATGA	Rv0340
MTb	Rv1592c aa42	59	TCCGACGATCCGTTCTAC	GAGCGCAACA CCGTTCC	Rv1592c
MTb	Rv1592c aa321 322	61	GACTTCCTCGACGAACC	GCCTGCACGA TCAATACC	rv1592c
MTb	Rv1592c aa430	63	TTCAACCCGATGACCTAC G	GGTGATCACC TTGGCCG	rv1592c
MTb	katG -17 hasta codón 38	65	TGGGGTCTATGTCCTGA	GCAGTACCTT CAGATTGAG	Rv1908c
MTb	katG codón 63 a 128	67	GGCTCAATCTGAAGGTAC T	GGGCCAGCTG TTAAG	rv1908c
MTb	katG codón 132 a 302	69	TTCGCGCCGCTTAAC	GGTCCGGTG CCATAC	rv1908c
Mtb	katG codón 313 a 350	71	GTATGGCACCGGAACC	TCCTTGGCGG	rv1908c
				TGTATTG	
Mtb	katG codón 381 494	73	CGCTCCCCGACGATG	GACTTGTGGC TGCAGG	rv1908c
MTb	katG codón 515 595	75	CCTGCAGCCACAAGT	GCAGGTTTCG CTTGTC	rv1908c
Mtb	katG codón 617 658	77	CGGCCGAGTACATGC	GGCTCCCAGG TGATAC	rv1908c
Mtb	katG cddon	79	GGCAAGGATGGCAGT	GCACGTCGAA CCTGT	rv1908c
MTb	embC394	81	GGCGGGCATGTTTCT	GGCGATGATC GGCTC	embC
MTb	embC733	83	GGCGATGATTTCCAGT	GCCAAAGCCT GTAGGT	embC

ES 2 725 003 T3

Organismo	Diana	Seq. No.	Avance	Reverso	Acceso #
MTb	embA-4314	85	TCGGCGACAACCTCC	GCCCCGGATA CCAGAG	embA
MTb	embA210	87	ACTCGGTTTATCACGACG	CCATGGCTAC CAGGAC	embA
MTb	embA321350	89	GTATACATCGGTGCTTGC	GCACCAGCGG TGAACA	embA
MTb	embA462 FOR	91	GCGACCGATGGACTG	CCACCACGGT GATCAG	embA
MMTb	embA833913	93	CGCCATCACCGACTC	TTGCGGTCCG ATGTC	embA
MMTb	embB 297 & 332	95	TTCGGCTTCCTGCTCT	GGTTTGCTGG CCTCC	embB
MTb	emb 406	97	TCAACAACGGCCTGC	ATGGACCGCT CGATCA	embB
MMTb	emb 497	99	CACCGTCATCCTGACC	TTTTGGCGCG AACCC	embB
MTb	embB 745	101	GGCTGGTCCAACGTG	GCATTGGTAT CAGGCTCG	embB
Mtb	embB 9551024	103	TTCGCCCGAGCAAAG	CCGTTAGTGC CGTCT	embB
MTb	rmlA2 152	105	ATGTCACGCTGCAAC	GATCCTCCGT CTTCTCCA	rmlA2
MTb	iniC 245 251	107	CGCGAACTGAACCAGA	GCGGTATGCG CCTTA	iniC
MTb	iniA 308	109	GAGCAGGTGCTTTCCC	CTCTGTTGCC GAACG	iniA
MTb	iniA 501	111	GGGTTCCCTATGGCGG	GGTTGAACAA CCCAAGTC	iniA
MTb	iniB -89 47	113	CGATCCCGATAGGTGTTT	GGCACCCAGA TTCAGAC	iniB
MTb	Rv3124 -16 54	115	ATCACAGGAGTGGAGTT	AAGATGTTGC GCGAAT	Rv3124
MTb	RmlD -71	117	TACGAACCACACGTTGC	GTTGGCTACC CGACAG	RmlD

Organismo	Diana	Seq. No.	Avance	Reverso	Acceso #
MTb	RmID 284	119	GCTTGACGCCGCTAC	GAAGTTGAGT TCGCAGGT	rmID
MTb	embR -136	121	CAGCCGATGCCGCTG	CGCCGATGCG	embR
				GTAAGAA	
MTb	embR 379	123	ACAGCGCCAACGTCA	GACGATCGGA GGTCGT	embR
MTb	thyA nt7to64	125	TCGCCGCTAGGCTGA	ATCTGCTGGC CGAAC	thyA
MTb	thyA ntnt200to310	127	CGGGTACGCCAAAT	CCAGATGGTG ACTCCG	thyA
MTb	thyA nt353to400	129	ATTCCAATATCGGTTGGC	CCACGATCGC CATTGT	thyA
MTb	thyA nt477 a 586	131	GGTGAGCACATCGACC	ATAGCTGGCG ATGTTGA	thyA
MTb	thyA nt 653 a 758	133	CGCCGACCTGTTTCT	CGGCTAGAAG TAGTTTCG	thyA
MTb	gyrA 9094	135	GCAACTACCACCCGCA	GTAGCCGAGC GACCA	gyrA
MTb - <i>Mycobacterium tuberculosis</i>					

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

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

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

15 La concentración de la muestra se ajusta con el fin de hacer coincidir la concentración del ADN de MTb enriquecido con el ADN de MTb de control para lograr una relación de aproximadamente 1:1 u otra relación predeterminada y fija. Esto permite una relación casi equivalente del ADN de MTb enriquecido con la del ADN de control que va a usarse en etapas de detección posteriores. El ADN de MTb enriquecido que se ha normalizado para la concentración se co-amplifica con el ADN de MTb de control que contiene la secuencia de genes de referencia para la región del ácido nucleico diana. Es decir, el ADN de MTb de control contiene una región de gen (por ejemplo, secuencia) que si es variante, es indicativa de una susceptibilidad reducida (por ejemplo, resistencia) del organismo MTb a fármacos (por ejemplo, fármacos antibióticos o antimicóticos) que se dirigen a la región del gen. Regiones del gen a modo de ejemplo y sensibilidades a fármacos correspondientes amplificadas por los pares de cebadores

25

presentados en la Tabla 2 se proporcionan en la Tabla 3. Estas regiones permitieron la determinación de resistencia a fármacos o sensibilidad en infección por *Mycobacterium tuberculosis*, además de para ejemplos de sensibilidad a zidovudina en VIH, sensibilidad a taxano en cánceres humanos, sensibilidad a cloroquina en malaria, sensibilidad a terbinafina en *S. cerevisiae* y sensibilidad a vancomicina en *S. aureus*.

5 Tabla 3: Regiones a modo de ejemplo para pruebas de sensibilidad a fármacos de MTb

Organismo	Fármaco	Amplicón-Sensibilidad	SEQ ID NO	DiseñoTm	Referencia
HIV	Zidovudina/ Nevirapina	<b>AAGGCCAATGGACAT ATCAAATTTATCAAGA GCCATTTAAAAATCTG AAAACAGGAAAATAT GCAAGAATGAGGGGT GCCC</b>	137	75.1	www.plosmedicine.org 1890 Diciembre 2007 volume 4, Issue 12
Malaria	Cloroquina	<b>TATTTATTTAAGTGTA TGTGTAATGAATAAA ATTTTGCTAAAAGAA CTTTAAACAAAATTG</b>	138	64.5	The Journal of Infectious Diseases 2001;183:1413-6
Células de cáncer humano	epotilona/ taxanos	<b>TCCCACGTCTCCATTTT TTTATGCCTGGCTTTGC CCCTCTCACCAGCCGT GGAAGCCAGCAGTATC GAGCTCTCACAGTGCC GGAECTCA</b>	139	84.4	PNAS Marzo 14, 2000 vol. 97 no. 6, páginas 2904-2909
Células de cáncer humano	epotilona/ taxanos	<b>TCCCACGTCTCCATTTT TTTATGCCTGGCTTTGC CCCTCTCACCAGCCGT GGAAGCCAGCAGTATC GAGCTCTCACAGTGCC GGAECTCA</b>	139	84.4	PNAS Marzo 14, 2000 vol. 97 no. 6, páginas 2904-2909
<i>S. cerevisiae</i>	Terbinafina	<b>TTCAATGCTAAGAATC CTGCTCCTATGCACGG TCACGTTATTCTTGTA GTGATCATATGCCAAT CT</b>	140	75.3	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Dic. 2003, p. 3890-3900 Vol. 47, No. 12
<i>S. aureus</i>	vancomicina/ Beta-lactama	<b>AAAGCTGCAAAATATT AAGGAAAATAATACC ATTGTTGTTAGACACA TTTTAGGTAAGTGCA GGTTATATTGCC</b>	141	71.4	PNAS_May 29, 2007 _vol. 104_no. 22_ 9451-9456
MTb v176F	Rifampicina	<b>GAGCGTGTGGTGGTC AGCCAGCTGGTGCGGT CGCCCGGGGTGTA CGACGAGACCATTGAC AAGTCCACCGACAAGA CG</b>	142	85.7	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Junio 2005, p. 2200-2209 Vol. 49, No. 6

ES 2 725 003 T3

Organismo	Fármaco	Amplicón-Sensibilidad	SEQ ID NO	DiseñoTm	Referencia
MTb 80bp Área caliente	Rifampicina	<b>CAAGGAGTTCTTCGG CACCAGCCAGCTGAGC CAATTCATGGACCAGA ACAACCCGCTGTCCGG GTTGACCCACAAGCGC CGACTGTCCGCGCTGG GGCCCGCGGTCTGTG ACGTGAGCGTGCCGG CTGGAGGTCC</b>	143	90.8	JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, May 2003, p. 2209-2212 Vol. 41, No. 5ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Oct. 1994, p. 2380-2386 Vol. 38, No. 10
MTb CIII a	Rifampicina	<b>GGTGGCACAGGCCAA TTCGCCGATCGATGCG GACGGTCGCTTC</b>	144	80.9	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Junio 2005, p. 2200-2209 Vol. 49 No. 6
MTb CIIIb	Rifampicina	<b>CCGCGCGTGTGGTC CGCCGCAAGGCGGGCG AGGTGGAGTACGTGCC CTCGTCTGAGGTGGAC TACATGGA</b>	145	87.8	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Junio 2005, p. 2200-2209 Vol. 49, No. 6
MTb	Pirazinamida	<b>CAGTCGCCCGAACGT ATGGTGGACGTATGCG GGCGTTGATCATCGTC GACGTGCAGAACGACT TCTGCGAGGGTGGCTC GCTGGCGGTAACCGGT GGCGCCGCGCTGGCCC GCGCCATCAGCGACTA CCTGGCCGAAGCGGCG GACTACCA</b>	146	91.2	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Ago. 2004, p. 3209-3210 Vol. 48, No. 8; Microbiology (1997), 143 , 3367-3373; JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Feb. 2007, p. 595-599 Vol. 45, No. 2
MTb	Pirazinamida	<b>CAATCGAGGCGGTGT TCTACAAGGGTGCCTA CACCGGAGCGTACAGC GGCTTCGAAGGAGTCG ACGAGAACGGCACGCC ACTGCTGAATTGGCTG CGGCAACGCGGCGTCG</b>	147	87.9	Como más arriba
MTb	Pirazinamida	<b>GATGCGCACCGCCAG CGTCGAGTTGGTTTGC AGCTCCTGATGGCACC GC</b>	148	83.1	Como más arriba

ES 2 725 003 T3

Organismo	Fármaco	Amplicón-Sensibilidad	SEQ ID NO	DiseñoTm	Referencia
MTb	Pirazinamida	<b>GCGGCGGACTACCAT</b> CACGTCGTGGCAACCA AGGACTTCCACATCGA CCCGGGTGACCACTTC TCCGGCACACCGGACT ATTCCTCGTCGTGGCC ACCGCATTGCGTCAGC GGTACTCCCGGCGCGG ACTTCCATCCCAGTCT GGACACGTCGGCAATC	149	89.5	Como más arriba
MTb	Pirazinamida	<b>GCAACGCGGCGT</b> <b>CGA</b> TGAGGTCGATGTGGTC	150	88.3	Como más arriba
		GGTATTGCCACCGATC ATTGTGTGCGCCAGAC GGCCGAGGACGCGGTA CGCAATGGCTTGGCCA CCAGGG			
MTb	Pirazinamida	<b>GCTTGGCCACCAGG</b> TGCTGGTGGACCTGAC AGCGGGTGTGTCGGCC GATACCACCGTCGCCG CGCTGGAGGAGATGCG CACCGCCAG	151	90.1	Como más arriba
MTb	Estreptomicina	<b>CCGCGTGTACACCAC</b> CACTCCGAAGAAGCCG AACTCGGCGCTTCGGA AGGTTGCCCGCGTGAA GTTGACGAGTCAGGTC GAGGTCACGGCGTACA TTCCCGGCGAGGGCCA CAACCTGCAGGAGCAC TCGATGGTGTGGTGC GCGGCGGCCGGGTGAA GGACCTGCCTGGTGTG CGCT	152	91.5	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 1994, p. 228-233 Vol. 38, No. 2; ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY , Oct. 2001, p. 2877-2884 Vol. 45, No. 10; JOURNAL OF BACTERIOLOGY, May 2005, p. 3548-3550 Vol. 187, No. 10;
MTb	Estreptomicina	<b>GGATTGACGGTAGGT</b> GGAGAAGAAGCACCG GCCAACTACGTGCCAG CAGCCGCGGTAATACG TAGGGTGCAGCGT	153	84.5	Como más arriba
MTb	Estreptomicina	<b>CCCGCCTGGGGAGTA</b> CGGCCGCAAGGCTAAA ACTCAAAGGAATTGAC GGGGGCCCGCACAAGC GGCGGAGCATG	154	86.7	Como más arriba

ES 2 725 003 T3

Organismo	Fármaco	Amplicón-Sensibilidad	SEQ ID NO	DiseñoTm	Referencia
MTb	Isoniazid	<b>TAGCCAAAGTCTTGA CTGATTCCAGAAAAG GGAGTCATATTGTCTA GTGTGTCCTCTATAACC GGACTACGCCGAACAG CTCCGGACGGCCGACC TGCGCGTGACCCGACC GCGCGTCGCCGTCTCTG GAAGCAGTGAATGCGC</b>	155	86.82	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Abr. 2003, p. 1241-1250 Vol. 47, No. 4;
MTb	Isoniazid	<b>TGTGATATATCACCT TTGCCTGACAGCGACT TCACGGCACGATGGAA TGTCGCAACCAAATGC ATTGTCCGCTTTGATG ATGAGGAGAGTCATGC CACTGCTAACCATTGG CGATCAATTCCCCG</b>	156	83	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Mar. 1997, p. 600-606 Vol. 41, No. 3; ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Ago. 2006, p. 2640-2649 Vol. 50, No. 8;
MTb	Isoniazid	<b>ACCAGCTCACCGCTC TCATCGGCGGTGACCT</b>	157	85.7	Como más arriba
		<b>GTCCAAGGTGCGACGCC AAGCAGCCCGGCGACT ACTTCACCACTATCAC C</b>			
MTb	Isoniazid	<b>GCGTTCAGCAAGCTC AATGACGAGTTCGAGG ACCGCGACGCCAGAT CCTGGGGGTTTCGATT GACAGCGAATTCGCG</b>	158	84	Como más arriba
MTb	Isoniazid	<b>CTGTGCGCATGCAAC TGGCGCAAGGGCGACC CGACGCTAGACGCTGG CGAACTCCTCAAGGCT TCGGCCTAACCGGA</b>	159	87.4	Como más arriba

Organismo	Fármaco	Amplicón-Sensibilidad	SEQ ID NO	DiseñoTm	Referencia
MTb	isoniazid	<p><b>CAAACGGATTCTGGT</b>  <b>TAGCGGAATCATCACC</b>  GACTCGTCGATCGCGT  TTCACATCGCACGGGT  AGCCCAGGAGCAGGG  CGCCCAGCTGGTGCTC  ACCGGGTTCGACCGGC  TGCGGCTGATTAGCG  CATCACCAGCCGGCTG  CCGGCAAAGGCCCGC  TGCTCGAACTCGACGT  GCAAACGAGGAGCA  CCTGGCCAGCTTGGCC  GGCCGGGTGACCGAGG  CGATCGGGGCGGGCAA  CAAGCTCGACGGGGTG  GTGCATTGATTGGGT  TCATGCCGCAGACCGG  GATGGGCATCAACC</p>	160	92.6	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Ago. 2006, p. 2640-2649 Vol. 50, No. 8
MTb	isoniazid	<p><b>AAGTACGGTGTGCGT</b>  <b>TCGAATCTCGTTGCCG</b>  CAGGCCCTATCCGGAC  GCTGGCGATGAGTGCG  ATCGTCGGCGGTGCGC  TCGGCGAGGAGGCCGG  CGCCAGATCCAGCTG  CTCGAGGAG</p>	161	90.4	Como más arriba
MTb	isoniazid	<p><b>GAGCCGATTTACGA</b>  <b>ACCGGTGGGGACGTTT</b>  ATGGTCCCCGCCGTT  TGTGCGCATAACCGTGA  TCTGAGGCGTAAACGA  G</p>	162	84.5	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Abr. 2003, p. 1241-1250 Vol. 47, No. 4
Mtb	isoniazid	<p><b>TGGGCCGGATGGAAT</b>  <b>CGAAACCGCTGCGCCG</b>  GGGCCATAAAATGATT  ATCGGCATGCGGGGTT  CCTATGGCGGCGTGGT  CATGATTGGCATGCTG  TCGTCGGTGGTTCGGAC  TTGGGTTGTTCAACCC  GCTATCGGTGGGGGCC</p> <p>GGGTTGATCCTCGGCC  GGATGGCATATAAAGA  GGACAAACAAAACCG  GTTGCTGCGGGTTCGC  AGCGAGGCCAAGGCC  AATGTGCGGCGCTTCG  TCGACGACATTTGTT  CGTCGTC</p>	163	90.2	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Abr. 2003, p. 1241-1250 Vol. 47, No. 4

ES 2 725 003 T3

Organismo	Fármaco	Amplicón-Sensibilidad	SEQ ID NO	DiseñoTm	Referencia
MTb	isoniazid	<b>CTGCTGCGCAATTCG</b> TAGGGCGTCAATACAC CCGCAGCCAGGGCCTC GCTGCCCAGAAAGGGA TCCGTCATGGTCTGAAG TGTGCTGAGTCACACC GACAAACGTCACGAGC GTAACCCCAGTGCGAA AGTCCCCGCCGAAAT CGCAGCCACGTTACGC TCGTGGACATACCGAT TTCGGCCCCGGCCGCGG CGAGACGATAGGTTGT CGGGGTGACTGCCACA GCCACTGAAGGGGCCA AACCCCCATTCTGTATC CCGTTACAGTCCTGGTT ACCGGAGGAAACCGG GGGATC	164	90.5	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Abr. 2003, p. 1241-1250 Vol. 47, No. 4
MTb	isoniazid	<b>GCCGACAGACCATCC</b> GGCTGTCTGGAACCAC CCGGTTCGTTGACCCAC ATACCGTCGAGCCCGA TCATCACGGCTACGAC	165	85.3	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Abr. 2003, p. 1241-1250 Vol. 47 No. 4
MTb	isoniazid	<b>TCCGACGATCCGTTT</b> TACTTCCCACCTGCCG GCTACCAGCATGCCGT GCCCGAACGGTGTG CGCTC	166	85.8	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Abr. 2003, p. 1241-1250 Vol. 47 No. 4
MTb	isoniazid	<b>GACTTCCTCGACGAA</b> CCCCTTGAGGACATTC TGTCGACGCCGAAAT TTCCCATGTCTTCGGC GACACCAAGCTGGGTA GCGCGGTGCCACCCC GCCGGTATTGATCGTG CAGGC	167	87.4	Como más arriba
Mtb	isoniazid	<b>TTCAACCCGATGACC</b> TACGCCGGCATGGCGA GACTGGCCGTGATCGC GGCCAAGGTGATCACC	168	84.7	Como más arriba

ES 2 725 003 T3

Organismo	Fármaco	Amplicón-Sensibilidad	SEQ ID NO	DiseñoTm	Referencia
MTb	isoniazid	<p><b>TGGGGTCTATGTCCT</b>  <b>GATTGTTTCGATATCCG</b>            AACTTCGCGATCACA            TCCGTGATCACAGCCC            GATAACACCAACTCCT            GGAAGGAATGCTGTGC            CCGAGCAACACCCACC</p> <p>CATTACAGAAACCACC            ACCGGAGCCGCTAGCA            ACGGCTGTCCCGTCGT            GGGTCATATGAAATAC            CCCGTCGAGGGCGGGC            GAAACCAGGACTGGTG            GCCCAACCGGCTCAA            GTATACTTTATGGGGC            AGTCCCGCCGCCTTT            GGTCTGACCACCGGG            TTGGCC<b>GAGTTT</b>CTGA            AGTACTGC</p>	169	88.9	<p>ANTIMICROBIAL AGENTS AND            CHEMOTHERAPY, Ago. 2006,            p. 2640-2649 Vol. 50, No. 8;            ANTIMICROBIAL AGENTS AND            CHEMOTHERAPY, Oct. 2005, p.            4068-4074 Vol. 49, No. 10;            JOURNAL OF CLINICAL            MICROBIOLOGY, Oct. 2003, p.            4630-4635 Vol. 41, No. 10</p>
Mtb	isoniazid	<p><b>GGCTCAATCTGAAGG</b>  <b>TACTGCACCAAAACCC</b>            GGCCGTCGCTGACCCG            ATGGGTGCGGCGTTTCG            ACTATGCCGCGGAGGT            CGCGACCATCGACGTT            GACGCCCTGACGCGGG            ACATCGAGGAAGTGAT            GACCACCTCGAGCCG            TGGTGGCCCCGCGACT            ACGGCCACTACGGGCC            GCTGTTTATCCGGATG            GCGTGGCACGCTGCCG            GCACCTACCGCATCCA            CGACGGCCGCGGCGGC            GCCGGGGGCGGCATGC            AGCGGTTTCGCGCCGCT            TAACAGCTGGCCC</p>	170	94.1	Como más arriba

Organismo	Fármaco	Amplicón-Sensibilidad	SEQ ID NO	DiseñoTm	Referencia
MTb	isoniazid	<p><b>TTCGCGCCGCTTAAC</b>            AGCTGGCCCGACAACG            CCAGCTTGGACAAGGC            GCGCCGGCTGCTGTGG            CCGGTCAAGAAGAAGT            ACGGCAAGAAGCTCTC            ATGGGCGGACCTGATT            GTTTTCGCCGGCAACT            GCGCGCTGGAATCGAT            GGGCTTCAAGACGTTT            GGGTTCGGCTTCGGCC            GGGTCGACCAGTGGGA            GCCCGATGAGGTCTAT            TGGGGCAAGGAAGCC            ACCTGGCTCGGCGATG            AGCGTTACAGCGGTAA            GCGGGATCTGGAGAAC            CCGCTGGCCGCGGTGC            AGATGGGGCTGATCTA            CGTGAACCCGGAGGGG            CCGAACGGCAACCCGG            ACCCATGGCCGCGGC            GGTCGACATTTCGCGAG            ACGTTTCGGCGCATGG            CCATGAACGACGTCGA            AACAGCGGCCCGCCAG</p>	171	93.6	Como más arriba
		<p>CTGTAAGCGCTCTGCA            AAGCCGCTACCGGTA            CTTGCTGCAGCTTTGTC            GCCGGCTGATCGTCGG            CGGTCACACTTTCGGT            AAGACCCATGGCGCCG            GCCCGCCGATCTGGT            CGCCCCGAACCCGAG            GCTGCTCCGCTGGAGC            AGATGGGCTTGGGCTG            GAAGAGCTCGTAGCCG            GGGCTTGGGCTCCGAC            GAGGCGACCTCGTCTA            CCCGAACCCGACCTTC            TCGAGCATTGGCACCG            GAACC</p>			
Mtb	isoniazid	<p><b>GTATGGCACCGGAAC</b>            CGGTAAGGACGCGATC            ACCAGCGGCATCGAGG            TCGTATGGACGAACAC            CCCGACGAAATGGGAC            AACAGTTTCTCGAGA            TCCTGTACGGCTACGA            GTGGGAGCTGACGAAG            AGCCCTGCTGGCGCTT            GGCAATACACCGCCAA            GGA</p>	172	87.8	

ES 2 725 003 T3

Organismo	Fármaco	Amplicón-Sensibilidad	SEQ ID NO	DiseñoTm	Referencia
		<p><b>CGCTCCCCGACGATG</b>            CTGGCCACTGACCTCT            CGCTGCGGGTGGATCC            GATCTATGAGCGGATC            ACGCGTCGCTGGCTGG            AACACCCCGAGGAATT            GGCCGACGAGTTCGCC            AAGGCCTGGTACAAGC            TGATCCACCGAGACAT            GGGTCCCGTTGCGAGA            TACCTTGGGCCGCTGG            TCCCAAGCAGACCCT</p>	173		
Mtb	isoniazid	<p>GCTGTGGCAGGATCCG            GTCCTGCGGTCAGCC            ACGACCTCGTCGGCGA            AGCCGAGATTGCCAGC            CTTAAGAGCCAGATCC            GGGCATCGGGATTGAC            TGTCTCACAGCTAGTT            TCGACCGCATGGGCGG            CGGCGTCGTCGTTCCG            TGGTAGCGACAAGCGC            GGCGGCGCCAACGGTG            GTCGCATCCGCCTGCA            GCCACAAGTC</p>		92.5	Como más arriba
MTb	isoniazid	<p><b>CCTGCAGCCACAAGT</b>            CGGGTGGGAGGTCAAC            GACCCCGACGGGGATC            TGCGCAAGGTCATTCG</p>	174	91.7	Como más arriba
		<p>CACCCTGGAAGAGATC            CAGGAGTCATTCAACT            CCGCGGCGCCGGGGAA            CATCAAAGTGTCTTC            GCCGACCTCGTCGTGC            TCGGTGGCTGTGCCGC            CATAGAGAAAGCAGC            AAAGGCGGCTGGCCAC            AACATCACGGTGCCCT            TCACCCCGGGCCGCAC            GGATGCGTCGCAGGAA            CAAACCGACGTGGAAT            CCTTTGCCGTGCTGGA            GCCCAAGGCAGATGGC            TTCCGAAACTACCTCG            GAAAGGGCAACCCGTT            GCCGGCCGAGTACATG            CTGCTCGACAAGGCGA            ACCTGC</p>			

ES 2 725 003 T3

Organismo	Fármaco	Amplicón-Sensibilidad	SEQ ID NO	DiseñoTm	Referencia
Mtb	isoniazid	<b>CGGCCGAGTACATGC</b> TGCTCGACAAGGCGAA CCTGCTTACGCTCAGT GCCCTGAGATGACGG TGCTGGTAGGTGGCCT GCGGTCCTCGGCGCA AACTACAAGCGCTTAC CGCTGGGCGTGTTCAC CGAGGCCTCCGAGTCA CTGACCAACGACTTCT TCGTGAACCTGCTCGA CATGGGTATCACCTGG GAGCC	175	89.4	Como más arriba
Mtb	isoniazid	<b>GGCAAGGATGGCAGT</b> GGCAAGGTGAAGTGG ACCGGCAGCCGCGTGG ACCTGGTCTTCGGGTC CAACTCGGAGTTGCGG GCGCTTGTCGAGGTCT ATGGCGCCGATGACGC GCAGCCGAAGTTCGTG CAGGACTTCGTGCTG CCTGGGACAAGGTGAT GAACCTCGACAGGTTC GACGTGC	176	90.3	Como más arriba
MTb	Etambutol	<b>GGCGGGCATGTTTCT</b> GGCTGTCTGGCTGCCG CTGGACAACGGCCTTC GGCCCGAGCCGATCAT CGCC	177	87.6	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2
MTb	Etambutol	<b>GGCGATGATTTCCA</b> GTACCCGGCGTGGTCCG GTTGGCCGGTCTAACC TACAGGCTTTGG	178	82.2	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2
MTb	etambutol	<b>TCGGCGACAACCTCC</b> GCGGCCCGCATCCTC	179	92.9	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2

Organismo	Fármaco	Amplicón-Sensibilidad	SEQ ID NO	DiseñoTm	Referencia
		ACCGCCCTTAACCGCG TCGCCTACCATCGAGC CTCGTGCCCCACGACG GTAATGAGCGATCTCA CCGGATCGCACGCCTA GCAGCCGTCGTCTCGG GAATCGCGGGTCTGCT GCTGTGCGGCATCGTT CCGCTGCTTCCGGTGA ACCAAACCACCGCGAC CATCTTCTGGCCGAG GGCAGCACCGCCGACG GCAACATCACCCAGAT CACCGCCCCTCTGGTA TCCGGGGC			
MTb	etambutol	<b>ACTCGGTTTATCAG</b> ACGCCCGGCGCGCTCA AGAAGGCCGTGATGCT CCTCGGCGTGCTGGCG GTCTGGTAGCCATGG	180	87.5	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2
MTb	etambutol	<b>GTATACATCGGTGCT</b> TGCCCAGCTGGCGGCG GTGAGCACCGCCGGCG TCTGGATGCGCCTGCC CGCCACCCTGGCCGGA ATCGCCTGCTGGCTGA TCGTCAGCCGTTTCGT GCTGCGGCGGCTGGGA CCGGGCCCCGGGCGGGC TGGCGTCCAACCGGGT CGCTGTGTTACCGCT GGTGC	181	94.7	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2
MTb	etambutol	<b>GCGACCGATGGACTG</b> CTGGCGCCGCTGGCGG TGCTGGCCGCGGCGTT GTCGCTGATCACCGTG GTGG	182	89.6	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2

Organismo	Fármaco	Amplicón-Sensibilidad	SEQ ID NO	DiseñoTm	Referencia
MMTb	etambutol	CGCCATCACCGACTC CGCGGGCACCGCCGGA GGGAAGGGCCCCGGTTCG GGATCAACGGGTTCGCA CGCGGCCTGCCGTTTC GGATTGGACCCGGCAC GTACCCCGGTGATGGG CAGCTACGGGGAGAAC AACCTGGCCGCCACGG CCACCTCGGCTGGTA CCAGTTACCGCCCGC AGCCCGGACCGGCCGC TGGTGGTGGTTTCCGC GGCCGGCGCCATCTGG TCCTACAAGGAGGACG GCGATTTTCATCTACGG CCAGTCCCTGAACTG CAGTGGGGCGTCACCG GCCCGGACGGCCGCAT	183	94.8	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2
		CCAGCCACTGGGGCAG GTATTTCCGATCGACA TCGGACCGCAA			
MMTb	etambutol	TTCGGCTTCCTGCTC TGGCATGTCATCGGCG CGAATTCGTTCGGACGA CGGCTACATCCTGGGC ATGGCCCGAGTCGCCG ACCACGCCGGCTACAT GTCCA ACTATTTCCGC TGGTTCGGCAGCCCGG AGGATCCCTTCGGCTG GTATTACAACCTGCTG GCGCTGATGACCCATG TCAGCGACGCCAGTCT GTGGATGCGCCTGCCA GACCTGGCCGCCGGGC TAGTGTGCTGGCTGCT GCTGTGCGGTGAGGTG CTGCCCCGCTCGGGC CGGCGGTGGAGGCCAG CAAACC	184	92.9	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2;
MTb	etambutol	TCAACAACGGCCTGC GGCCGGAGGGCATCAT CGCGCTCGGCTCGCTG GTCACCTATGTGCTGA TCGAGCGGTCCAT	185	87.5	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2;
MMTb	etambutol	CACCGTCATCCTGAC CGTGGTGTTCGCCGAC CAGACCCTGTCAACGG TGTTGGAAGCCACCAG GGTTCGCGCCAAAA	186	85.4	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2;

ES 2 725 003 T3

Organismo	Fármaco	Amplicón-Sensibilidad	SEQ ID NO	DiseñoTm	Referencia
MTb	etambutol	<b>GGCTGGTCCAACGTG</b> CGGGCGTTTGTCCGGCG GCTGCGGACTGGCCGA CGACGTACTCGTCGAG CCTGATACCAATGC	187	87.1	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2;
Mtb	etambutol	<b>TTCGCCCGAGCAAAG</b> ATGCCCGCCGATGCCG TCGCGGTCCGGGTGGT GGCCGAGGATCTGTGC CTGACACCGGAGGACT GGATCGCGGTGACCCC GCCGCGGGTACCGGAC CTGCGTCACTGCAGG AATATGTGGGCTCGAC GCAGCCGGTGCTGCTG GACTGGGCGGTTCGGTT TGGCCTTCCCGTGCCA GCAGCCGATGCTGCAC GCCAATGGCATCGCCG	188	92.8	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2;
		AAATCCCGAAGTTCCG CATCACACCGGACTAC TCGGCTAAGAAGCTGG ACACCGACACGTGGGA AGACGGCACTAACGG			
MTb	etambutol	<b>ATGTCACGCTGCAAC</b> TGGTGCGGGTGGGCGA CCCGCGGGCATTCCGGC TGCGTACCCACCGACG AGGAGGACCGCGTAGT CGCCTTTCTGGAGAAG ACGGAGGATC	189	88.9	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2;

Organismo	Fármaco	Amplicón-Sensibilidad	SEQ ID NO	DiseñoTm	Referencia
MTb	etambutol	<b>CGCGAACTGAACCAG</b> ATGGGCATTTGCCAGG CGGTGGTGCCGTATC CGGACTTCTTGCGCTG ACCGCGCGCACACTGC GCCAGACCGAGTTCAT CGCGCTGCGCAAGCTG GCCGGTGCCGAGCGCA CCGAGCTCAATAGGGC CCTGCTGAGCGTGGAC CGTTTTGTGCGCCGGG ACAGTCCGCTACCGGT GGACGCGGGCATCCGT GCGCAATTGCTCGAGC GGTTCGGCATGTTTCGG CATCCGGATGTTCGATT GCCGTGCTGGCGGCCG GCGTGACCGATTTCGAC CGGGCTGGCCCGCGAA CTGCTGGAGCGCAGCG GGCTGGTGGCGCTGCG CAATGTGATAGACCAG CAGTTCGCGCAGCGCT CCGACATGCTTAAGGC GCATACCGC	190	93.9	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2;
MTb	etambutol	<b>GAGCAGGTGCTTTCC</b> CGCGCGACGGAGCGA GTGCGTGCTGGGGTAC TCGGCGAAATACGTTT GGCAACAGAG	191	85.5	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2;
MTb	etambutol	<b>GGGTTCCATATGGCGG</b> CGTGGTCATGATTGGC ATGCTGTCTCGGTGG TCGGACTTGGGTTGTT CAACC	192	82.9	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2;
MTb	etambutol	<b>CGATCCCGATAGGTG</b> TTTGGCCGGCTTGCGG ATCAGACCCCGATTTT GGGGTGAGGCGGAATC CATAGCGTCGATGGCA CAGCGCCGGTCACGCC GGCGAACAGCTTCTTC	193	93.2	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2;

ES 2 725 003 T3

Organismo	Fármaco	Amplicón-Sensibilidad	SEQ ID NO	DiseñoTm	Referencia
		GATTGAAGGGAAATGA AGATGACCTCGCTTAT CGATTACATCCTGAGC CTGTTCCGCAGCGAAG ACGCCGCCCGGTTCGTT CGTTGCCGCTCCGGGA CGGGCCATGACCAGTG CCGGGCTGATCGATAT CGCGCCGCACCAAATC TCATCGGTGGCGGCCA ATGTGGTGCCGGGTCT GAATCTGGGTGCC			
MTb	etambutol	<b>ATCACAGGAGTGGAG</b> TTTTGAACGCAACGAC GGCAGGTGCTGTGCAA TTCAACGTCTTAGGAC CACTGGAATAAACCT CCGGGGCACCAAACCTG CCATTGGGAACGCCGA AACAACGTGCCGTGCT CGCCATGCTGTTGCTA TCCCGGAACCAAGTCG TAGCGGCCGACGCACT GGTCCAGGCAATCTGG GAGAAGTCGCCACCTG CACGAGCCCGACGCAC CGTCCACACGTACATT TGCAACCTTCGCCGGA CCCTGAGCGATGCAGG CGTTGATTTCGCGCAAC ATCTT	194	92	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2;
MTb	etambutol	<b>TACGAACCACACGTT</b> GCGCAGACATCACACT AGACTACTTGTGTAAC GGCGCCCTGTCGGGTA GCCAA	195	83.6	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2;
MTb	etambutol	<b>GCTTGACGCCGCTAC</b> GGCACTGGCGCAGCGC ACTGGCCACGGCGCTG GCAGCACCTGCGAACT CAACTTC	196	90.5	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2;
MTb	etambutol	<b>CAGCCGATGCCGCTG</b> TCAAGGGCCACCGACC CGGTACATCGCACGGC GTGCCGAGATCCTGGG TTCTTACCGCATCGGC G	197	90.2	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2;

ES 2 725 003 T3

Organismo	Fármaco	Amplicón-Sensibilidad	SEQ ID NO	DiseñoTm	Referencia
MTb	etambutol	<b>ACAGCGCCAACGTCA</b> GCCGCCACCACGCCGT CATCGTCGACACGGGC ACCAACTACGTCATCA ACGACCTCCGATCGTC	198	88.5	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2000, p. 326-336 Vol. 44, No. 2;
MTb	Capreomicina /Viomicina	<b>TCGCCGCTAGGCTGA</b> CCGCGTGTCAATCGTG ACGCCATACGAGGACC TGCTGCGCTTCGTGCT CGAAACGGGTACGCC AAATCCGACCCGACCCG GCACCGGAACCCGCAG CCTGTTCCGCCAGCAG AT	199	90.3	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Ago. 2005, p. 3192-3197 Vol. 49, No. 8
MTb	Capreomicina /Viomicina	<b>CGGGTACGCCCAAAT</b> CCGACCCGACCCGGCAC CGGAACCCGCAGCCTG TTCGGCCAGCAGATGC GCTATGATTTGTCCGGC CGTTTCCCGCTGCTC ACTACCAAGAAAGTCC ATTTCAAATCGGTAGC CTACGAGCTGCTGTGG TTTTTGC GCGGCGATT CCAATATCGGTTGGCT GCACGAGCACGGAGTC ACCATCTGG	200	88.8	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Ago. 2005, p. 3192-3197 Vol. 49, No. 8
MTb	Capreomicina /Viomicina	<b>ATTCCAATATCGGTT</b> <b>GGCTGCACGAGCACG</b> GAGTCACCATCTGGGA CGAATGGGCAAGTGAT ACAGGCCAACTCGGGC CGATCTACGGTGTACA ATGGCGATCGTGG	201	84.7	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Ago. 2005, p. 3192-3197 Vol. 49, No. 8
MTb	Capreomicina /Viomicina	<b>GGTGAGCACATCGAC</b> CAGATCAGCGCGGCGC TGGATTTGCTGCGCAC CGATCCCGATTCCCGG CGCATCATCGTGTCCG CCTGGAACGTCCGGCGA AATCGAGCGGATGGCG CTGCCGCCCTGTATG CGTTCTTCCAGTTCTAC GTCGCCGATGGCCGGC TGAGCTGTCACTCTA CCAACGCAGCGCCGAC CTGTTTCTGGGTGTGC CGTTCAACATCGCCAG CTAT	202	90.9	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Ago. 2005, p. 3192-3197 Vol. 49, No. 8

Organismo	Fármaco	Amplicón-Sensibilidad	SEQ ID NO	DiseñoTm	Referencia
MTb	Capreomicina /Viomicina	CGCCGACCTGTTTCT GGGTGTGCCGTTCAA CATCGCCAGCTATGC GTTGCTCACCCACAT GATGGCCGCCAGGC CGGCTTGTGGTTCGG CGAGTTCATCTGGAC CGGTGGCGACTGCCA CATCTACGACAATCA CGTCGAGCAAGTACG GCTGCAGCTCAGCCG CGAGCCGCGGCCATA	203	89.9	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Ago. 2005, p. 3192-3197 Vol. 49, No. 8
		TCCGAAACTACTTCT AGCCG			
MTb	oxifloxacina Moxifloxacina /Gatifloxacina /Sitafloxacina/ Ofloxacina/ Levofloxacina/ Sparfloxacina)	GCAACTACCACCCGC ACGGCGACGCGTGCAT CTACGACAGCCTGGTG CGCATGGCCCAGCCCT GGTCGCTGCGCTAC	204	88.3	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Ago. 2005, p. 3192-3197 Vol. 49, No. 8
MTb - <i>Mycobacterium tuberculosis</i>					

- Las secuencias co-amplificadas de ADN de MTb enriquecido y ADN de MTb de control se desnaturalizan simultáneamente, y a continuación se hibridan para producir homodúplex de ADN de MTb de control amplificado y ADN de MTb enriquecido, y también producen heterodúplex de ADN de Mtb de control y enriquecido. Un colorante de saturación de unión a ADN bicatenario, tal como un colorante que fluoresce cuando interacciona con un ácido nucleico del dúplex, se incluye en la mezcla de amplificación para permitir la generación de datos de curvas de fusión de alta resolución de estos homodúplex y heterodúplex. Como tales, las muestras hibridadas de homodúplex y heterodúplex, además del ADN de MTb de control, se someten a análisis de las curvas de fusión de alta resolución que se monitoriza usando fluorescencia u otros métodos de detección del colorante de unión.
- Los datos obtenidos de la monitorización de la fusión de alta resolución de los homodúplex, heterodúplex y ADN de MTb de control se introducen en un sistema de cálculo para analizar los datos. Entonces se calcula una comparación matemática de los datos de la muestra de ADN de MTb de control sin ADN de muestra enriquecido añadido con la muestra que contiene los homodúplex y heterodúplex co-amplificados. La comparación matemática, después de la normalización de las curvas por temperatura y puntos iniciales y finales, permite la resta de cada punto de datos a lo largo de la curva de fusión de la muestra que contiene el producto co-amplificado de los datos de la muestra de ADN de Mtb de control. El gráfico resultante para muestras invariables que tienen secuencias que no son sustancialmente diferentes del ADN de MTb de control es esencialmente una línea recta con variación menor de aproximadamente cero. Una gráfica para muestras que tienen ADN de heterodúplex (por ejemplo, ADN de control con ADN de muestra enriquecido) que contiene apareamientos erróneos del apareamiento de bases mostrará un cambio en la curva de fusión, y cuando se someta al algoritmo de resta producirá un gráfico claramente diferente del gráfico plano de secuencias de control e invariables.
- Las muestras que contienen gráficos variables de los gráficos de muestra de control se puntúan como variables en la región diana de fármaco (por ejemplo, diana de ácido nucleico), y es probable que los microorganismos sean menos susceptibles (por ejemplo, resistentes) a la acción del fármaco para esta región genética. Por tanto, varias regiones del ácido nucleico diana de fármaco pueden amplificarse simultáneamente en diferentes cámaras de reacción para un único paciente o para múltiples pacientes.
- Los sistemas y métodos divulgados permiten el rápido cribado para fármacos adecuados para el tratamiento de casos individuales de MTb. Usando un enfoque tal puede prescribirse una pauta farmacéutica personalizada rápida a un paciente con MTb, que puede conllevar a menos fármacos por paciente, mayores tasas de cumplimiento de las pautas de tratamiento, y/o una reducción definitiva en la tasa de generación de MDR-MTb.

## II. Cebadores novedosos

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

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

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

La Figura 1 puede contrastarse con la Figura 2 para ilustrar el diseño de los cebadores que tienen la  $T_m$  dentro de un intervalo de la  $T_m$  del ácido nucleico diana. La Figura 2 muestra que la amplificación convencional con cebadores y un ácido nucleico diana carecen de un solapamiento de temperatura (como se muestra en la Figura 1) y requiere variaciones de temperatura extremas durante la amplificación, correspondientes a los ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión, para producir un producto amplificado. Tales intervalos de temperatura extremos permiten la formación de productos no deseados.

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

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

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

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

Por ejemplo, se han usado cebadores sintetizados con tanto química de enlace fosfodiéster convencional como

químicas de LNA para proporcionar valores de  $T_m$  del cebador próximas a los valores de  $T_m$  de la secuencia de ácidos nucleicos diana. Sin embargo, es posible que ciertos ácidos nucleicos diana puedan tener valores de  $T_m$  más bajos que los de los cebadores, y puede necesitarse incluir una química desestabilizante de la hibridación para reducir los valores de  $T_m$  del cebador de manera que el valor de  $T_m$  del cebador esté dentro de un intervalo de los valores de  $T_m$  de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

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

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

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

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

En algunos ejemplos, las temperaturas del ciclado térmico pueden seleccionarse en un estrecho intervalo de temperatura para limitar sustancialmente la amplificación para amplificar la secuencia de ácidos nucleicos diana. Como tales, las condiciones de los ciclos térmicos pueden modificarse para amplificar la secuencia de ácidos nucleicos diana modificando la temperatura de hibridación para que sea sustancialmente la misma que la base de

temperatura más baja del pico de fusión para el amplicón. Por tanto, las condiciones de los ciclos térmicos pueden modificarse para amplificar la secuencia de ácidos nucleicos diana modificando la temperatura de hibridación para que sea sustancialmente la misma que la base de temperatura más alta para el pico de fusión del amplicón.

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

10 En algunos ejemplos, la T<sub>m</sub> del cebador puede seleccionarse de manera que la amplificación se realice a condiciones de amplificación isotermas en el intervalo de T<sub>m</sub> de la secuencia de ácidos nucleicos diana para garantizar la formación de productos apropiada.

15 La presente divulgación incluye un método de diseño de un conjunto de cebadores que tiene una T<sub>m</sub> con un ácido nucleico diana que está dentro de un estrecho intervalo de la T<sub>m</sub> de la secuencia de ácidos nucleicos diana. Como tal, el conjunto de cebadores se diseña de manera que la T<sub>m</sub> del cebador se solape con la curva de distribución de la T<sub>m</sub> de la secuencia de ácidos nucleicos diana. Por ejemplo, el conjunto de cebadores puede usarse en ensayos de PCR en tiempo real de manera que la T<sub>m</sub> del cebador se solape con la curva de distribución de la T<sub>m</sub> para la secuencia de ácidos nucleicos diana de manera que pueda usarse un estrecho intervalo de temperatura para amplificar la secuencia de ácidos nucleicos diana. Por ejemplo, el cebador se puede diseñar de manera que tenga una T<sub>m</sub> del cebador que esté dentro de aproximadamente 15 °C de la T<sub>m</sub> del ácido nucleico diana, más preferentemente dentro de 10 °C, incluso más preferentemente dentro de 5 °C, todavía más preferentemente dentro de 2,5 °C, y lo más preferentemente sustancialmente la misma T<sub>m</sub> que la T<sub>m</sub> del ácido nucleico diana. Por tanto, esto puede incluir valores de T<sub>m</sub> del cebador que se solapan con la curva de T<sub>m</sub> del amplicón.

20 La presente divulgación incluye un proceso iterativo para diseñar cebadores. Un proceso iterativo tal puede incluir identificar una secuencia de ácidos nucleicos diana inicial como el amplicón diana, en el que la secuencia de ácidos nucleicos diana puede asociarse a una actividad biológica particular, tal como posible resistencia a fármacos. La secuencia de ácidos nucleicos diana se amplifica entonces con el fin de producir un producto amplificado, y el valor de T<sub>m</sub> del producto amplificado (por ejemplo, amplicón) se determina usando análisis de las curvas de fusión convencional. El análisis de las curvas de fusión se utiliza entonces para determinar o calcular nuevos cebadores o conjuntos de cebadores para su uso en la amplificación del ácido nucleico diana. Los cebadores determinados o calculados se diseñan entonces con valores de T<sub>m</sub> del cebador dentro del intervalo del pico de fusión generado por la fusión del producto amplificado. Los cebadores se preparan o sintetizan entonces para tener los valores de T<sub>m</sub> del cebador diseñado.

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

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

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

40 En algunos ejemplos, la T<sub>m</sub> del cebador puede modificarse alterando el % de GC de la secuencia del cebador. Cambiando el % de GC, la T<sub>m</sub> del cebador puede cambiarse selectivamente. Normalmente, el aumentar el % de GC puede aumentar la T<sub>m</sub>, y el disminuir el % de GC puede disminuir la T<sub>m</sub>. Sin embargo, hay casos en los que se desea un alto % de GC % que aumentará excesivamente la T<sub>m</sub>. En tales casos pueden usarse desestabilizadores para permitir la inclusión de cebadores de alto contenido de % de GC o para el uso de secuencias de ácidos

nucleicos diana de alto % de GC. Los desestabilizadores pueden disminuir selectivamente la temperatura del procedimiento de amplificación. Ejemplos de desestabilizadores incluyen DMSO, AgCl, y otros.

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

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

### III. Amplificación/enriquecimiento de ácidos nucleicos diana

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

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

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

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

reconoce que una técnica tal puede aplicarse a cualquier microorganismo.

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

La técnica de amplificación del genoma completo puede usarse con una o muchas ADN polimerasas con el fin de mejorar los resultados de enriquecimiento tanto reduciendo el tiempo requerido para el enriquecimiento como aumentando la cantidad de material enriquecido resultante. Esto puede usarse para amplificar ARN y/o ADN. Por tanto, la técnica de amplificación puede usarse con enzimas transcriptasa inversa tanto solas como en combinación con enzimas ADN polimerasa para enriquecer muestras para componentes de ARN del material lisado. Adicionalmente, la técnica de amplificación puede usarse con uno o muchos parámetros de cebado de ácidos nucleicos diana diferentes. Ejemplos de los parámetros de cebado que pueden modularse incluyen los siguientes: los cebadores de tamaño; cebadores aleatorios; cantidad de cebadores aleatorios; cebadores diana específicos; cebadores específicos de región; y combinaciones de los mismos. La modulación de tales parámetros de cebado puede mejorar la amplificación del genoma completo o la amplificación específica de región dentro de las muestras. Además, la técnica de amplificación puede usarse con diversas mezclas de tampón para mejorar el enriquecimiento de la muestra. Además, la técnica de amplificación puede usarse con diversas concentraciones de elementos estructurales de ácido nucleico, que pueden proceder de fuentes naturales o sintéticas. Todavía más, la técnica de amplificación puede realizarse en cualquier instrumento capaz de mantener una temperatura constante o temperatura variable durante un estrecho intervalo de temperatura (por ejemplo, un instrumento capaz de mantener una temperatura establecida, tanto establemente como con perfiles térmicos programables). Las condiciones de reacción pueden incluir alguna variación de temperatura dentro del intervalo de temperatura durante el proceso de enriquecimiento con el fin de mejorar la cantidad de material genético enriquecido o para especificar el enriquecimiento de regiones específicas del material genético, tal como la secuencia de ácidos nucleicos diana.

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

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

Puede realizarse una técnica de amplificación a modo de ejemplo del siguiente modo: los ácidos nucleicos diana de la muestra de prueba se combinan en un tampón de polimerización adecuado con sales apropiadas, con un cebador de oligonucleótidos aleatorio (por ejemplo, 6, 11 o 22 bases, o cualquiera de los cebadores o longitudes de cebadores presentados en la Tabla 2), y los ácidos nucleicos se desnaturalizan a una temperatura suficientemente alta para garantizar que la desnaturalización sea al menos sustancialmente completa, preferentemente completa; las muestras desnaturalizadas se mantienen a casi condiciones desnaturalizantes, o en un entorno de temperatura que permitirá que la secuencia de ácidos nucleicos diana de la muestra experimente condiciones de hibridación

desestabilizadas; las muestras se enfrían entonces suficientemente para permitir que los cebadores se hibriden con la secuencia diana, en el que la secuencia diana está contenida dentro de cualquiera del genoma completo o fragmentos del mismo; elementos estructurales de ácido nucleico apropiados se añaden a la mezcla, que son tanto trifosfatos de desoxinucleótido, o trifosfatos de ribonucleótido, como bases de ácido nucleico posiblemente no naturales o artificiales que pueden incorporarse con los productos formados; enzimas apropiadas (por ejemplo, ADN polimerasa, ARN polimerasa, transcriptasa inversa, cualquier combinación de las mismas, o similares) para los objetivos de enriquecimiento se combinan entonces; y la amplificación se realiza a la estrecha temperatura con el fin de amplificar selectivamente la secuencia de ácidos nucleicos diana.

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

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

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

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

Se combinan la secuencia de ácidos nucleicos diana normal o secuencia de sonda normal (por ejemplo, ácido nucleico de control) con el material genético de la muestra (por ejemplo, ácido nucleico de muestra), y entonces se aplica en un único tubo de reacción. Alternativamente, el ácido nucleico de control y el ácido nucleico de muestra pueden mezclarse después de procedimientos de amplificación separados. Un ácido nucleico de control del ácido nucleico diana normal solo también se amplifica simultáneamente (sin embargo, con mejoras para distinguir hebras individuales de ácidos nucleicos, puede ser posible ejecutar el control dentro de la misma reacción como la muestra que está siendo interrogada). Los perfiles de desnaturalización del ácido nucleico de control y el ácido nucleico de muestra pueden entonces determinarse por análisis de las curvas de fusión de alta resolución de los ácidos nucleicos de control y de la muestra. Regiones de ácido nucleico normal, o de tipo silvestre, a modo de ejemplo con mutaciones conocidas que se corresponden con un cambio en la resistencia a fármacos se enumeran en la Tabla 3.

Los datos del perfil de desnaturalización para estas pruebas pueden almacenarse electrónicamente. Como tales, los datos de control o de la muestra pueden recuperarse de un análisis previo de manera que pueden usarse para una comparación de los resultados. La capacidad de guardar los datos del perfil de desnaturalización puede eliminar la necesidad de realizar siempre una reacción de control con cada serie de la muestra de prueba. Los datos para las muestras se comparan con los datos para el control de diana normal, y cualquier diferencia o variación entre los dos conjuntos de datos se puntúa como una variación en la región diana para la muestra desconocida. Cuando la

muestra incluye una variación, la muestra (es decir, el microorganismo) se clasifica como que es posiblemente resistente al fármaco que se dirige a la región genética (por ejemplo, secuencia de ácidos nucleicos diana) que es el objeto de la prueba.

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

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

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

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

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

un único paciente o para múltiples pacientes.

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

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

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

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

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

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

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

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

En algunos ejemplos, la amplificación y/o desnaturalización puede usarse para confirmar la presencia de secuencias de tipo silvestres.

En algunos ejemplos, la amplificación y/o desnaturalización puede usarse para confirmar la presencia de secuencias de tipo silvestres para demostrar adicionalmente que la muestra de prueba procede de un organismo que será sensible al fármaco representado por esa región.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

25 Se divulgan en el presente documento métodos para estudiar ADN y/o ARN de una muestra microbiológica u otra muestra biológica para variaciones genéticas. Los ácidos nucleicos pueden ser intactos, fragmentados, o porciones del ácido nucleico del organismo entero o la región diana del ácido nucleico. Los cebadores pueden seleccionarse de una región de o adyacente a la porción del ácido nucleico diana que va a interrogarse. Los cebadores pueden ser no fluorescentes, fluorescentes, o capaces de producir tanto una señal electrostática como electroquímica.

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

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

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

55 Los siguientes Aspectos de Ejemplo de aspectos específicos para llevar a cabo la presente invención se ofrecen solo con fines ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

## Aspectos de Ejemplo

EJEMPLO 1 - AMPLIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS REGIONES DE SENSIBILIDAD AL FÁRMACO DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*A. Amplificación del genoma completo de ADN genómico de *M. tuberculosis*

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

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

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

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

## B. Preparación de muestras

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

35 El material de sobrenadante del protocolo de lisis contiene el ADN micobacteriano, y se transfiere a un tubo de microcentrifuga nuevo.

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

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

Combinar:

45 10x tampón FI15: (Tris-HCl 500 mM (pH 8,0); 5 mg/ml de albúmina de suero bovino (no acetilada); MgCl<sub>2</sub> 10 mM, 40 % de sulfóxido de dimetilo) usar a 1x concentración final.

10 x trifosfatos de desoxinucleótido (2 mM cada uno) usar a 1x.

10x LC Green I (Idaho Technology, Inc.) usar a 0,5x.

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

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

FI15-MTb FOR: CCGAAACGTCGGCATCGCAAACCTC (SEQ ID NO. 205)

FI15-MTb REV: TGCCCGTGTGTAGAAAGCCCGTGTGGAA (SEQ ID NO. 206)

Gen de la familia PPE

Añadir Mycobuffer/muestra de ADN a la reacción.

Amplificar según el siguiente protocolo:

5 Desnaturalización a 95 °C: 1 min

Activación a 75 °C: 10 minutos

90 ciclos de:

85 °C durante 30 s

75 °C durante 30 s con una adquisición fluorescente

10 1 ciclo de fusión:

95 °C durante 10 s

60 °C durante 10 s

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

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

D. Método de detección alternativo para el producto amplificado

Alternativa a la detección por PCR en tiempo real: detección electroquímica

20 Usando los mismos cebadores básicos con la siguiente adenda:

FI15-MTb FOR: Biotina- CCGGAAACGTCGGCATCGCAAATC (SEQ ID NO. 205)

FI15-MTb REV: Fluoresceína-TGCCCGTGTGTAGAAAGCCCGTGTGGAA (SEQ ID NO. 206)

Realizar la amplificación como antes. Sacar la muestra y realizar la detección electroquímica según las indicaciones del fabricante (AnzenBio). En resumen, disponer en el chip detector electroquímico (AnzenBio), incubar 20 minutos.

25 El chip de neutravidina se une a la biotina sobre el cebador directo (o inverso..dependiendo del diseño definitivo) y el chip se lava con 1x solución salina tamponada con fosfato + 1 % de Tween 20 (PBST), 3 veces. Añadir anticuerpo anti-fluoresceína conjugado con peroxidasa de rábano picante, incubar 20 minutos. Lavar la placa 3x con 1x PBST, añadir TMB (tampón de detección electroquímica) e incubar 1 minuto. Medir la formación de señales con el detector PSD-8. Las señales superiores a 5 se puntúan como positivas, aquellas inferiores a 5 se puntúan como negativas.

30 Debe incluirse una muestra negativa de referencia, y muestra positiva, para confirmar estos resultados.

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

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

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

40 E. Enriquecimiento molecular por amplificación del genoma completo

Protocolo de enriquecimiento molecular:

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

45

## ES 2 725 003 T3

genoma completo. Básicamente, las muestras se someten al siguiente protocolo:

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

La disolución de incubación de ADN es:

1-5 ul de ADN

1x tampón Thermopol (New England Biolabs)

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

En un volumen total de 15 ul

Desnaturalizar durante 2 minutos a 96 °C

Enfriar a temperatura ambiente durante 10 minutos

Disponer sobre hielo

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

Las concentraciones finales de componentes son:

dNTPs 400 uM

1x tampón Thermopol

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

20 4 % de sulfóxido de dimetilo

Proteína del gen 32 de T4 (30 ng/ul)

Incubar 8 h a 50 °C

Incubar 15 minutos a 80 °C

Mantener a 4 °C hasta uso.

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

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

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

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

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

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

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

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

vacío.

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

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

Este material se usa para procesos aguas abajo.

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

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

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

Los componentes de reacción son los siguientes:

Mezcla de reacción:

10x tampón de PCR (Tris-HCl 500 mM, pH 8,5, 5 mg/ml de BSA (no acetilado), MgCl<sub>2</sub> 40 mM)

20 10x dNTP 2mM cada uno (también puede usarse dUTP 4 mM para fines de limpieza de la contaminación) Enzima (ADN polimerasa termotable) exonucleasa Tfi + (Invitrogen, Carlsbad, CA)

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

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

25 CFP32 FOR: TCGTTCATCACCGATCC (SEQ ID NO. 207)

CFP32 REV: GTGAGCAGTTCGTTCCA (SEQ ID NO. 208)

CFP32 TM: FLUORESCÉINA-TCAACGAGACGGGCACGCT-BHQ1 (SEQ ID NO. 209)

IS6110 de transposasa:

IS6110 FOR; TGCGAGCGTAGGCGTC (SEQ ID NO. 210)

30 IS6110 REV: GTCCAGCGCCGCTTC (SEQ ID NO. 211)

IS6110 TM: FLUORESCÉINA-CTGCTACCCACAGCCGGTTAGGT-BHQ1 (SEQ ID NO. 212)

Gen de la proteína de la familia PPE:

BTTb FOR; GCCAGCATTGAGGAT (SEQ ID NO. 213)

BTTb REV; CAATTCGGGCACCAATAA (SEQ ID NO. 214)

35 BTTb TM; FLUORESCÉINA-TGCGATGCCGACGTTTCCG-BHQ1 (SEQ ID NO. 215)

IS6110 es una diana que no es fiable para la cuantificación ya que está presente en el genoma de MTb > 1/genoma.

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

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

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

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

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

Se usa el umbral de cruce calculado del instrumento Roche LightCycler 480, o prácticamente cualquier máquina de PCR en tiempo real, para calcular la concentración de la diana del fármaco RPOB 'de tipo silvestre' (rifampicina) para añadir a la reacción de cribado. La disolución madre de control (dilución 1:1.000.000 de disolución maestra) se diluye 10x durante cada 4 ciclos que la muestra cruza el nivel inicial después del ciclo 18, en el caso del ejemplo anterior con un valor de CT de 32, es decir, 14 ciclos o 5000x dilución ( $10^{3,69}$ ). Esto puede presentarse fácilmente como un diagrama para el usuario o como un simple trozo de software que calculará los volúmenes a mezclar antes de la amplificación y/o fusión.

El ADN de la muestra y una cantidad igual de 'ADN normal, de tipo silvestre, no mutado, no resistente' de RPOB se añade a la reacción. La reacción consiste en los siguientes componentes:

10x tampón de PCR (Tris-HCl 500 mM, pH 8,5, 5 mg/ml de BSA, MgCl<sub>2</sub> 30 mM)

10 x mezcla de dNTP (sin dUTP)

Oligonucleótidos a 0,5 uM (final) cada uno

LCGreen + o colorante LCGreen (Idaho Technology, Inc)

Enzima (Tfi (exo +)) u otra polimerasa termostable con actividad de corrección de lectura.

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

RPOB FOR: CAAGGAGTTCTTCGGCACC (SEQ ID NO. 13)

RPOB REV: GGACCTCCAGCCCGGCA (SEQ ID NO. 14)

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

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

95 °C durante 10 minutos

40 ciclos de:

95 °C durante 10 s

57 °C durante 10 s

72 °C durante 40 s

1 ciclo de fusión:

95 °C durante 10 s

5 50 °C durante 10 s

70 °C durante 30 s

95 °C durante 0 s con adquisiciones de fluorescencia establecidas a 25-35 adquisiciones/grado C (fusión de alta resolución). Los datos pueden entonces analizarse usando el módulo de curvas de fusión de alta resolución que pronto va a ser comercializado para el instrumento LC 480 o usando el software LightScanner de (Idaho Technology, Inc.). Ambos paquetes permiten establecer las muestras del nivel inicial (las muestras de control positivo, como patrones). Además, cualquier dispositivo que pueda medir la cantidad de ADN bicatenario (ADNbc) a temperaturas específicas durante la fusión puede usarse para generar curvas de fusión. Los parámetros de la curva por defecto son normalmente suficientes, aunque ocasionalmente los parámetros deben modificarse para estar seguros de que las muestras de control están siendo llamadas con exactitud. Si las muestras de control son llamadas con exactitud, entonces los resultados de la reacción pueden considerarse aceptables y puede hacerse la llamada de diagnóstico. Así, una diferencia entre la curva de fusión de tipo silvestre de control y una curva de fusión de una muestra desconocida es indicativa de una mutación puntual o polimorfismo entre las muestras. En este caso, con la región rpoB de MTb, la diferencia entre las curvas de fusión es indicativa de la presencia de ADN resistente a rifampicina en una muestra de prueba, y así puede usarse para diagnosticar la presencia de MTb resistente a rifampicina en una muestra. De una manera similar, esta técnica puede aplicarse a analizar cualquier región de ADN en la que haya mutaciones conocidas que se correlacionan con un cambio en un fenotipo, y es especialmente poderosa para la evaluación de resistencia o sensibilidad a fármacos.

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

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

30 Protocolo de prueba de MTb:

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

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

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

Añadir 2 ul de muestras.

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

Ejecutar en LC480 bajo el protocolo de ejecución de cfp32.

40 Desnaturalizar 10 min a 95 °C

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

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

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

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

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

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

## ES 2 725 003 T3

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

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

Poner una tapa de la placa sobre la placa y centrifugar

Ejecutar en LC480 bajo el protocolo de ejecución de rpob.

5 Desnaturalizar: 10 min a 95 °C

Amplificar: 95 °C durante 10 s

57 °C durante 10 s

72 °C durante 40 s con adquisición individual

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

Sacar la placa de LC480 y centrifugar para recoger cualquier condensación de la parte superior.

Rampa del protocolo de fusión hasta 95 °C durante 1 s

50 °C durante 1 s

15 70 °C durante 30 s Empezar a recoger los datos de fusión continuamente a 30 adquisiciones/grado C. Recogida de datos finales a 95 °C

Fundir las muestras en el instrumento HR-1.

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

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

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

Tasa de la rampa 0,07

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

Adquisición final a 96 °C

Enfriar a 40 °C

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

Análisis de datos

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

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

30 Seleccionar las muestras a analizar y hacer clic en “continuar”

En “análisis” seleccionar normalizar

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

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

Hacer clic en OK

35 En “Análisis” seleccionar el desplazamiento de la temperatura

En muestras seleccionar una muestra de tipo silvestre a normalizar

Ajustar los cursores para ampliar la región de fusión

Seleccionar OK

En "Análisis" seleccionar gráfico de diferencias

Seleccionar muestra de tipo silvestre a normalizar.

Mover los cursores para seleccionar la región de interés

Hacer clic en OK

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

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

### EJEMPLO 3: DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A AGENTES ANTIFÚNGICOS

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

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

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

- 35 Con el fin de determinar el patrón de resistencia a terbinafina, un agente antifúngico común usado para infecciones por *Saccharomyces* y *Candida*, se usaron los cebadores de la Tabla 2 para amplificar el amplicón correspondiente de la Tabla 3 usando el método presentado en el Ejemplo 2. Se usaron el ADN aislado de *S. cerevisiae* de tipo silvestre o un molde que contiene una mutación en el gen ERG1 que confiere resistencia a terbinafina como materiales de partida, y los resultados del análisis de diferencias de la curva de fusión se muestran en la Figura 11.
- 40 La secuencia mutada se distingue fácilmente de la secuencia de tipo silvestre. Así, este método puede usarse para determinar la resistencia o sensibilidad a fármacos en infecciones fúngicas, además de otras infecciones patógenas.

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

- 45 Taxanos tales como taxol, paclitaxel y docetaxel son potentes agentes quimioterapéuticos usados para tratar amplias variedades de cánceres. Su mecanismo de acción es compartido por epítomas y funcionan uniendo y estabilizando polímeros de tubulina en células. Se han descrito sitios de unión para estos fármacos sobre la tubulina (Rao, S., Orr, G.A., Chaudhary, A.G., Kingston, D.G., y Horwitz, S.B. (1995) J. Biol. Chem 270:20235-20238) y mutaciones en esta región o beta tubulina pueden producir resistencia a taxanos (Tabla 3). Se purificó el molde de ADN por medios estándar y se sometió al método presentado en el Ejemplo 2, usando cebadores de la Tabla 2 para

amplificar las regiones correspondientes en la Tabla 3. Dos amplicones con mutaciones que causaron resistencia a taxanos (B-tub R282Q y B-tub T247I) fueron fácilmente distinguibles de dos reacciones independientes con ADN de tipo silvestre (wt1 y wt2; FIGURA 12) usando esta metodología. Así, este método podría usarse para diagnosticar sensibilidad o resistencia a agentes quimioterapéuticos para permitir a los médicos la oportunidad de entender mejor la naturaleza del cáncer y qué tratamientos es probable que sean eficaces o ineficaces.

EJEMPLO 5:

La malaria es una enfermedad infecciosa producida por el parásito llamado *Plasmodia*. Hay cuatro especies identificadas de este parásito que causan la malaria humana, concretamente, *Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, *P. ovale* y *P. malariae*. 300-500 millones de personas se infectan cada año. El tratamiento más común es la cloroquina, pero la resistencia a la cloroquina ha sido cada vez mayor. Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) utiliza un método para detectar mutaciones resistentes a la cloroquina que dura 28 días.

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

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

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

La Figura 14 muestra los gráficos de diferencia de las curvas de fusión de 2 series independientes usando el método presentado en el Ejemplo 2 para discriminar entre ADN de tipo silvestre y resistente a ZDV. Los cebadores presentados en la Tabla 2 se usaron para amplificar las regiones presentadas en la Tabla 3. Este ejemplo demuestra claramente que este método es aplicable a determinar resistencia a fármacos o también sensibilidad en patógenos virales.

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

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

La Figura 15 demuestra que este método puede discriminar entre infecciones por staph multirresistentes e infecciones por staph normales. Usando los cebadores presentados en la Tabla 2 para amplificar la región desvelada en la Tabla 3, con el método presentado en el Ejemplo 2, este método podría distinguir entre regiones de tipo silvestres del ADN de staph y regiones con una única mutación puntual que produce multirresistencia.

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

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

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

Las condiciones de reacción son:

1: 10x tampón FI-15 (Tris-HCl 50 mM, 8,0; 0,25 mg/ml de BSA nativo (no acetilado); MgCl<sub>2</sub> 2 mM; 4 % de DMSO; 2 mM de cada dNTP)

2: Enzima Gene-Choice HS-Taq Polimerasa, aunque son aceptables otras ADN polimerasas termostables.

3: Cebadores a 0,5 uM final

4: Ciclos térmicos: 90 - 10 s

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

La Figura 16 muestra los resultados de esta reacción a diferentes temperaturas para el ciclado térmico. Este experimento se realizó en una PCR para simular las condiciones de un bloque térmico en el laboratorio, que cuando se estableció a 80 °C presentó un ciclo de temperatura de +/- 5 °C. Cada par de pocillos realizado a una única temperatura contiene una primera reacción que usa un molde positivo para ADN de MTb, y la segunda un molde negativo para ADN de MTb preparado similarmente. El producto de amplificación de 150 pb esperado aparece a todas las condiciones del ciclo de temperatura probadas solo en muestras positivas para MTb, pero no se amplifica en muestras de control. Así, la prueba de amplificación de ADN en el campo podría usarse para evaluar infecciones por MTb en muestras humanas, usando solo un protocolo estándar de recogida y preparación de muestras, un bloque de calentamiento para amplificar un producto específico, y un medio para detectar dicho producto. Esto tiene el potencial de permitir el diagnóstico en el campo de la infección por MTb sin la necesidad de enviar las muestras a un centro de prueba designado. Además, puede dar un resultado rápido, que solo requiere poco más de una hora de tiempo de ciclado térmico para amplificar el producto.

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

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

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

Cebador directo: caccacgctcaccgatgatgccctgctttg Tm 77C  
 Cebador inverso: actgggagccattaaccgcatcggtgctg Tm 75C

Molde:  
 actgggagccattaaccgcatcggtgctgctccgcccagggtgctgcccagattggtgattttgctggcgcttccggttacggctggcg

ctgaatgtgccagaggctcatccaaagcagggtcatcggtgagcgtggtg Tm = 92C

Reactivos:

10x tampón (mismo que antes)

dNTPS (2 mM cada uno)

MgCl 3 mM

Cebadores a 0,5 uM cada uno

Colorante: LC Green (Idaho Technology, Inc Sal Lake City, UT)

Enzima: Tfi (exo -) Invitrogen

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

Referencias

Las siguientes patentes de EE.UU. y publicaciones pre-concedidas se citan aquí; 4.683.195; 4.965.188; 6.214.587; 6.692.918; 5.219.727; 5.476.774; 5.314.809; 6.040.166; 6.197.563; 6.001.611; 6.617.137; 7.074.600; 6.977.148; 6.740.745; 6.033.881; 7.160.998; 7.081.226; 20070054311; 20050233363; 20050181394; 20040248105; y

20070020672.

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y con fines de claridad de comprensión, será fácilmente evidente para un experto en la técnica a la luz de las enseñanzas de esta invención que ciertos cambios y modificaciones pueden hacerse a la misma.

5 Listado de secuencias

<110> Signal Diagnostics

Caplin, Brian Erich

<120> SISTEMA Y MÉTODO DE ANÁLISIS DE ALTA RESOLUCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS PARA DETECTAR VARIACIONES DE SECUENCIA

10 <130> SIDI-0003

<150> US 60/908,604

<151> 2007-03-28

<160> 215

<170> PatentIn version 3.3

15 <210> 1

<211> 21

<212> ADN

<213> Virus de inmunodeficiencia humana

<400> 1

20 aaggccaatg gacatatcaa a 21

<210> 2

<211> 17

<212> DNA

<213> Virus de inmunodeficiencia humana

25 <400> 2

gggcaccctt cattctt 17

<210> 3

<211> 25

<212> ADN

30 <213> Malaria

<400> 3

tatttatta agtgtatgtg taatg 25

<210> 4

<211> 25

35 <212> ADN

<213> Malaria

<400> 4

caatttggtt taaagtctt ttagc 25

<210> 5  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 5 <400> 5  
 tcccacgtct ccattt 16  
 <210> 6  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 10 <213> Homo Sapiens  
 <400> 6  
 tgagttccgg cactgt 16  
 <210> 7  
 <211> 22  
 15 <212> ADN  
 <213> S. cerevisiae  
 <400> 7  
 ttcaatgcta agaatcctgc tc 22  
 <210> 8  
 20 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> S. cerevisiae  
 <400> 8  
 agattgcat atgatcacta cc 22  
 25 <210> 9  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Staphylococcus aureus  
 <400> 9  
 30 aaagctgcaa atattaagga 20  
 <210> 10  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Staphylococcus aureus  
 35 <400> 10  
 ggcaatataa cctgcac 17  
 <210> 11

<211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 11  
 5 gagcgtgtgg tggcag 17  
 <210> 12  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 10 <400> 12  
 cgtctgtcg gttgact 17  
 <210> 13  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 15 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 13  
 caaggagttc ttcggcacc 19  
 <210> 14  
 <211> 17  
 20 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 14  
 ggacctccag cccggca 17  
 <210> 15  
 25 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 15  
 ggtggcacag gccaat 16  
 30 <210> 16  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 16  
 35 gaagcgaccg tccgca 16  
 <210> 17  
 <211> 15

<212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 17  
 ccgcgctgc tggc 15  
 5 <210> 18  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 18  
 10 tccatgtagt ccacctcag 19  
 <210> 19  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 15 <400> 19  
 cagtcgcccg aacgta 16  
 <210> 20  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 20 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 20  
 tggtagtccg ccgct 15  
 <210> 21  
 <211> 18  
 25 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 21  
 caatcgaggc ggtgttct 18  
 <210> 22  
 30 <211> 13  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 22  
 cgacgccgctg ttg 13  
 35 <210> 23  
 <211> 14  
 <212> ADN

<213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 23  
 gatgcgacc gccca        14  
 <210> 24  
 5 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 24  
 gcggtgcat caggag        16  
 10 <210> 25  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 25  
 15 gcggcggact accat        15  
 <210> 26  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 20 <400> 26  
 gattgccgac gtgtccag        18  
 <210> 27  
 <211> 13  
 <212> ADN  
 25 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 27  
 gcaacgcggc gtc        13  
 <210> 28  
 <211> 15  
 30 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 28  
 ccctggtggc caagc        15  
 <210> 29  
 35 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 29  
 gcttgccac caggg 15  
 <210> 30  
 <211> 15  
 5 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 30  
 ctggcgggtgc gcatc 15  
 <210> 31  
 10 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 31  
 ccgcgtgtac accacca 17  
 15 <210> 32  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 32  
 20 agcgcacacc aggcag 16  
 <210> 33  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 25 <400> 33  
 ggattgacgg taggtggaga 20  
 <210> 34  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 30 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 34  
 acgctcgcac cctacgtatt a 21  
 <210> 35  
 <211> 14  
 35 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 35

cccgcctggg gagt        14  
 <210> 36  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 5 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 36  
 catgctccgc cgctt        15  
 <210> 37  
 <211> 20  
 10 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 37  
 tagccaaagt ctgactgat        20  
 <210> 38  
 15 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 38  
 ggcattcac tgcttc        16  
 20 <210> 39  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 39  
 25 tgtgatatat caccttgcc t        21  
 <210> 40  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 30 <400> 40  
 cggggaattg atcgcc        16  
 <210> 41  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 35 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 41  
 accagctcac cgctc        15

<210> 42  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 5 <400> 42  
 ggtgatagtg gtgaagtagt 20  
 <210> 43  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 10 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 43  
 gcgttcagca agctca 16  
 <210> 44  
 <211> 16  
 15 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 44  
 cgcgattcg ctgtca 16  
 <210> 45  
 20 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 45  
 ctgtgcgcat gcaac 15  
 25 <210> 46  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 46  
 30 tcccggttag gccga 15  
 <210> 47  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 35 <400> 47  
 caaacgatt ctggttagcg 20  
 <210> 48

<211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 48  
 5 ggttgatgcc catcccg 17  
 <210> 49  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 10 <400> 49  
 caagtacggt gtgcggt 17  
 <210> 50  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 15 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 50  
 gccgacgatc gcactc 16  
 <210> 51  
 <211> 18  
 20 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 51  
 gagccgattt cacgaacc 18  
 <210> 52  
 25 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 52  
 ctcgtttacg cctcaga 17  
 30 <210> 53  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 53  
 35 tgggccggat ggaatc 16  
 <210> 54  
 <211> 17

<212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 54  
 gacgacgaac gaaatgt      17  
 5 <210> 55  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 55  
 10 ctgctgcgca attcgta      17  
 <210> 56  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 15 <400> 56  
 gatcccccg tttcct      16  
 <210> 57  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 20 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 57  
 gccgacagac catcc      15  
 <210> 58  
 <211> 16  
 25 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 58  
 gtcgtagccg tgatga      16  
 <210> 59  
 30 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 59  
 tccgacgac cgttctac      18  
 35 <210> 60  
 <211> 17  
 <212> ADN

<213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 60  
 gagcgcaaca ccgttc 17  
 <210> 61  
 5 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 61  
 gacttcctcg acgaacc 17  
 10 <210> 62  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 62  
 15 gcctgcacga tcaatacc 18  
 <210> 63  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 20 <400> 63  
 ttcaaccgga tgacctag 19  
 <210> 64  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 25 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 64  
 ggtgatcacc ttggccg 17  
 <210> 65  
 <211> 17  
 30 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 65  
 tggggctctat gtcctga 17  
 <210> 66  
 35 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 66  
 gcagtacctt cagattgag      19  
 <210> 67  
 <211> 19  
 5 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 67  
 ggctcaatct gaaggtact      19  
 <210> 68  
 10 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 68  
 gggccagctg ttaag      15  
 15 <210> 69  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 69  
 20 ttcgcccgc ttaac      15  
 <210> 70  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 25 <400> 70  
 ggtccggtg ccatac      16  
 <210> 71  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 30 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 71  
 gtatggcacc ggaacc      16  
 <210> 72  
 <211> 17  
 35 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 72

tccttgccgg tgtattg      17  
 <210> 73  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 5 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 73  
 cgctccccga cgatg      15  
 <210> 74  
 <211> 16  
 10 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 74  
 gactgtggc tgcagg      16  
 <210> 75  
 15 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 75  
 cctgcagcca caagt      15  
 20 <210> 76  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 76  
 25 gcaggttcgc cttgtc      16  
 <210> 77  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 30 <400> 77  
 cggccgagta catgc      15  
 <210> 78  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 35 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 78  
 ggctcccagg tgatac      16

<210> 79  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Mycobacterium tuberculosis  
5 <400> 79  
ggcaaggatg gcagt 15  
<210> 80  
<211> 15  
<212> ADN  
10 <213> Mycobacterium tuberculosis  
<400> 80  
gcacgtcgaa cctgt 15  
<210> 81  
<211> 15  
15 <212> ADN  
<213> Mycobacterium tuberculosis  
<400> 81  
ggcgggcatg ttct 15  
<210> 82  
20 <211> 15  
<212> ADN  
<213> Mycobacterium tuberculosis  
<400> 82  
ggcgatgac ggctc 15  
25 <210> 83  
<211> 17  
<212> ADN  
<213> Mycobacterium tuberculosis  
<400> 83  
30 ggcgatgatt tcccagt 17  
<210> 84  
<211> 16  
<212> ADN  
<213> Mycobacterium tuberculosis  
35 <400> 84  
gccaaagcct gtaggt 16  
<210> 85

<211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 85  
 5 tcggcgacaa cctcc 15  
 <210> 86  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 10 <400> 86  
 gccccggata ccagag 16  
 <210> 87  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 15 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 87  
 actcggttta tcacgacg 18  
 <210> 88  
 <211> 16  
 20 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 88  
 ccatggctac caggac 16  
 <210> 89  
 25 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 89  
 gtatacatcg gtgcttgc 18  
 30 <210> 90  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 90  
 35 gcaccagcgg tgaaca 16  
 <210> 91  
 <211> 15

<212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 91  
 gcgaccgatg gactg 15  
 5 <210> 92  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 92  
 10 ccaccacggt gatcag 16  
 <210> 93  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 15 <400> 93  
 cgccatcacc gactc 15  
 <210> 94  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 20 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 94  
 ttgcggtccg atgtc 15  
 <210> 95  
 <211> 16  
 25 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 95  
 ttcggcttc tgctct 16  
 <210> 96  
 30 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 96  
 ggttgctgg cctcc 15  
 35 <210> 97  
 <211> 15  
 <212> ADN

<213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 97  
 tcaacaacgg cctgc 15  
 <210> 98  
 5 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 98  
 atggaccgct cgatca 16  
 10 <210> 99  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 99  
 15 caccgtcatc ctgacc 16  
 <210> 100  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 20 <400> 100  
 tttggcgcg aacc 15  
 <210> 101  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 25 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 101  
 ggctgtcca acgtg 15  
 <210> 102  
 <211> 18  
 30 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 102  
 gcattgtat caggctcg 18  
 <210> 103  
 35 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 103  
 ttcgcccgag caaag 15  
 <210> 104  
 <211> 15  
 5 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 104  
 ccgtagtgc cgtct 15  
 <210> 105  
 10 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 105  
 atgtcacgct gcaac 15  
 15 <210> 106  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 106  
 20 gatcctccgt cttctcca 18  
 <210> 107  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 25 <400> 107  
 cgcgaaactga accaga 16  
 <210> 108  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 30 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 108  
 gcggtatgcg cotta 15  
 <210> 109  
 <211> 16  
 35 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 109

gagcaggtgc ttccc 16  
 <210> 110  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 5 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 110  
 ctctgttgcc gaacg 15  
 <210> 111  
 <211> 15  
 10 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 111  
 gggttcctat ggcgg 15  
 <210> 112  
 15 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 112  
 ggtgaacaa cccaagtc 18  
 20 <210> 113  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 113  
 25 cgatcccgat aggtgttt 18  
 <210> 114  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 30 <400> 114  
 ggcaccacaga tcagac 17  
 <210> 115  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 35 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 115  
 atcacaggag tggagtt 17

<210> 116  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 5 <400> 116  
 aagatgttgc gcgaat 16  
 <210> 117  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 10 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 117  
 tacgaaccac acgttgc 17  
 <210> 118  
 <211> 16  
 15 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 118  
 gttggctacc cgacag 16  
 <210> 119  
 20 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 119  
 gcttgacgcc gctac 15  
 25 <210> 120  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 120  
 30 gaagttgagt tcgcaggt 18  
 <210> 121  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 35 <400> 121  
 cagccgatgc cgctg 15  
 <210> 122

<211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 122  
 5 cgccgatgcg gtaagaa 17  
 <210> 123  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 10 <400> 123  
 acagcgccaa cgta 15  
 <210> 124  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 15 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 124  
 gacgatcgga ggtcgt 16  
 <210> 125  
 <211> 15  
 20 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 125  
 tcgccgctag gctga 15  
 <210> 126  
 25 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 126  
 atctgctggc cgaac 15  
 30 <210> 127  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 127  
 35 cgggtacgcc caaat 15  
 <210> 128  
 <211> 16

<212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 128  
 ccagatggtg actccg        16  
 5 <210> 129  
    <211> 18  
    <212> ADN  
    <213> Mycobacterium tuberculosis  
    <400> 129  
 10 attccaatat cggttggc        18  
    <210> 130  
    <211> 16  
    <212> ADN  
    <213> Mycobacterium tuberculosis  
 15 <400> 130  
    ccacgatcgc cattgt        16  
    <210> 131  
    <211> 16  
    <212> ADN  
 20 <213> Mycobacterium tuberculosis  
    <400> 131  
    ggtgagcaca tcgacc        16  
    <210> 132  
    <211> 17  
 25 <212> ADN  
    <213> Mycobacterium tuberculosis  
    <400> 132  
    atagctggcg atgttga        17  
    <210> 133  
 30 <211> 15  
    <212> ADN  
    <213> Mycobacterium tuberculosis  
    <400> 133  
    cgccgacctg ttct        15  
 35 <210> 134  
    <211> 18  
    <212> ADN

ES 2 725 003 T3

<213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 134  
 cggctagaag tagttcg 18  
 <210> 135  
 5 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 135  
 gcaactacca cccgca 16  
 10 <210> 136  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 136  
 15 gtagcgcagc gacca 15  
 <210> 137  
 <211> 81  
 <212> ADN  
 <213> Virus de inmunodeficiencia humana  
 20 <400> 137  
 aaggccaatg gacatatcaa atttatcaag agccatttaa aaatctgaaa acaggaaaat 60  
 atgcaagaat gaggggtgcc c 81  
 <210> 138  
 <211> 62  
 <212> ADN  
 25 <213> Malaria  
 <400> 138  
 tatttattta agtgtatgtg taatgaataa aatttttgct aaaagaactt taacaaaat 60  
 tg 62  
 <210> 139  
 30 <211> 90  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 139  
 tcccacgtct ccatttcttt atgcctggct ttgccctct caccagccgt ggaagccagc 60  
 agtatcgagc tctcacagtg ccggaactca 90

ES 2 725 003 T3

	<210> 140		
	<211> 67		
	<212> ADN		
	<213> S. cerevisiae		
5	<400> 140		
	ttcaatgcta agaatcctgc tcctatgcac ggtcacgtta ttcttggtag tgatcatatg	60	
	ccaatct	67	
	<210> 141		
	<211> 74		
	<212> ADN		
10	<213> Staphylococcus aureus		
	<400> 141		
	aaagctgcaa atattaagga aaataatacc attggttgta gacacatfff aggtaaagtg	60	
	caggttatat tgcc	74	
	<210> 142		
	<211> 81		
15	<212> ADN		
	<213> Mycobacterium tuberculosis		
	<400> 142		
	gagcgtgtgg tggtcagcca gctggtgcgg tcgccggggg tgtacttcga cgagaccatt	60	
	gacaagtcca ccgacaagac g	81	
	<210> 143		
20	<211> 137		
	<212> ADN		
	<213> Mycobacterium tuberculosis		
	<400> 143		
	caaggagttc ttcggcacca gccagctgag ccaattcatg gaccagaaca acccgctgtc	60	
	ggggttgacc cacaagcgcc gactgtcggc gctggggccc ggcggtctgt cacgtgagcg	120	
	tgccgggctg gaggtcc	137	
25	<210> 144		
	<211> 43		
	<212> ADN		
	<213> Mycobacterium tuberculosis		
	<400> 144		
30	ggtggcacag gccaatcgc cgatcgatgc ggacggtcgc ttc	43	
	<210> 145		
	<211> 71		

ES 2 725 003 T3

<212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 145  
 ccgcgcgtgc tgggccgccc caaggcgggc gaggtggagt acgtgccctc gtctgaggtg 60  
 gactacatgg a 71

5 <210> 146  
 <211> 151  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 146  
 cagtcgcccc aacgtatggt ggacgtatgc gggcgttgat catcgtcgac gtgcagaacg 60  
 acttctgcga ggggggctcg ctggcggtaa ccggtggcgc cgcgctggcc cgcgccatca 120  
 10 gcgactacct ggcggaagcg gcgactacc a 151  
 <210> 147  
 <211> 111  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

15 <400> 147  
 caatcgaggc ggtggtctac aagggtgcct acaccggagc gtacagcggc ttcgaaggag 60  
 tcgacgagaa cggcacgcca ctgctgaatt ggctgcccga acgcggcgtc g 111  
 <210> 148  
 <211> 49  
 <212> ADN

20 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 148  
 gatgcgacc gccagcgtcg agtggttg cagctcctga tggcaccgc 49  
 <210> 149  
 <211> 159

25 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 149  
 gggcgggact accatcacgt cgtggcaacc aaggacttcc acatcgaccg gggtgaccac 60  
 ttctccggca caccggacta ttctcgtcgc tggccaccgc attgctcag cggactccc 120  
 ggcgaggact tccatcccag tctggacacg tcggcaatc 159  
 <210> 150

30 <211> 101

ES 2 725 003 T3

<212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 150  
 gcaacgcggc gtcgatgagg tcgatgtggt cggtattgcc accgatcatt gtgtgcgcca 60  
 gacggccgag gacgcggtac gcaatggctt ggccaccagg g 101

5 <210> 151  
 <211> 88  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 151  
 gcttgccac caggggtgctg gtggacctga cagcgggtgt gtcggccgat accaccgtcg 60  
 10 ccgcgctgga ggagatgcgc accgccag 88  
 <210> 152  
 <211> 179  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 15 <400> 152  
 ccgcgtgtac accaccactc cgaagaagcc gaactcggcg cttcgggaagg ttgcccgcgt 60  
 gaagttgacg agtcaggctcg aggtcacggc gtacattccc ggcgagggcc acaacctgca 120  
 ggagcactcg atggtgctgg tgcgcggcgg ccgggtgaag gacctgcctg gtgtgcgct 179  
 <210> 153  
 <211> 76  
 <212> ADN  
 20 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 153  
 ggattgacgg taggtggaga agaagcaccg gccaaactacg tgccagcagc cgcggttaata 60  
 cgtaggggtgc gagcgt 76  
 <210> 154  
 <211> 74  
 25 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 154  
 cccgcctggg gagtacggcc gcaaggctaa aactcaaagg aattgacggg ggccccgaca 60  
 agcggcggag catg 74  
 <210> 155  
 30 <211> 142

ES 2 725 003 T3

<212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 155  
 tagccaaagt cttgactgat tccagaaaag ggagtcatat tgtctagtgt gtcctctata 60  
 ccggactacg ccgaacagct ccggacggcc gacctgcgcg tgacccgacc gcgctcgcc 120  
 gtcctggaag cagtgaatgc gc 142

5 <210> 156  
 <211> 125  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 156  
 tgtgatatat cacctttgcc tgacagcgac ttcacggcac gatggaatgt cgcaaccaa 60  
 tgcattgtcc gctttgatga tgaggagagt catgccactg ctaaccattg gcgatcaatt 120  
 10 ccccg 125  
 <210> 157  
 <211> 80  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 15 <400> 157  
 accagctcac cgctctcatc ggcggtgacc tgtccaaggt cgacgccaag cagcccggcg 60  
 actacttcac cactatcacc 80  
 <210> 158  
 <211> 78  
 <212> ADN  
 20 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 158  
 gcgttcagca agctcaatga cgagttcgag gaccgcgacg cccagatcct gggggtttcg 60  
 attgacagcg aattcgcg 78  
 <210> 159  
 <211> 78  
 25 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 159  
 ctgtgcgcat gcaactggcg caagggcgac ccgacgctag acgctggcga actcctcaag 60  
 gcttcggcct aaccggga 78  
 <210> 160  
 30 <211> 299

ES 2 725 003 T3

<212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 160  
 caaacggatt ctggttagcg gaatcatcac cgactcgtcg atcgcgtttc acatcgcacg 60  
 ggtagcccag gagcagggcg cccagctggt gctcaccggg ttcgaccggc tgcggctgat 120  
 tcagcgcac accgaccggc tgccggcaaa ggccccgtg ctcgaactcg acgtgcaaaa 180  
 cgaggagcac ctggccagct tggccggccg ggtgaccgag gcgatcgggg cgggcaacaa 240  
 5 gctcgcggg gtggtgcatt cgattgggtt catgccgcag accgggatgg gcatcaacc 299  
 <210> 161  
 <211> 120  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 10 <400> 161  
 aagtacggtg tgcgttcgaa tctcgttgcc gcagggcccta tccggacgct ggcgatgagt 60  
 gcgatcgtcg gcggtgcgct cggcgaggag gccggcgccc agatccagct gctcggaggag 120  
 <210> 162  
 <211> 80  
 <212> ADN  
 15 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 162  
 gagccgattt cacgaaccgg tggggacggt catggtcccc gccggttgt gcgcataaccg 60  
 tgatctgagg cgtaaacgag 80  
 <210> 163  
 <211> 260  
 20 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 163  
 tgggcccgat ggaatcgaaa ccgctgcgcc ggggccataa aatgattatc ggcatgcggg 60  
 gttcctatgg cggcgtggtc atgattggca tgctgtcgtc ggtggtcgga cttgggttgt 120  
 tcaaccgcgt atcgggtggg gccgggttga tcctcggccg gatggcatat aaagaggaca 180  
 aacaaaaccg gttgctgcgg gtgcgcagcg aggccaaaggc caatgtgcgg cgcttcgtcg 240  
 acgacatttc gttcgtcgtc 260  
 <210> 164  
 25 <211> 292  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

ES 2 725 003 T3

<400> 164  
ctgctgcgca attcgtaggg cgtcaataca cccgcagcca gggcctcgct gccagaaag 60  
ggatccgtca tggtcgaagt gtgctgagtc acaccgacaa acgtcacgag cgtaacccca 120  
gtgcgaaagt tcccgccgga aatcgcagcc acgttacgct cgtggacata ccgatttcgg 180  
cccggccgcg gcgagacgat aggttgtcgg ggtgactgcc acagccactg aaggggcca 240  
acccccattc gtatcccgtt cagtccctggt taccggagga aaccggggga tc 292

<210> 165  
<211> 79  
5 <212> ADN  
<213> Mycobacterium tuberculosis  
<400> 165  
gccgacagac catccggctg tctggaacca cccggtcggt gaccacata ccgtcgagcc 60  
cgatcatcac ggctacgac 79

<210> 166  
10 <211> 68  
<212> ADN  
<213> Mycobacterium tuberculosis  
<400> 166  
tccgacgac cgttctactt cccacctgcc ggctaccagc atgccgtgcc cggaacggtg 60  
ttgcgctc 68

15 <210> 167  
<211> 116  
<212> ADN  
<213> Mycobacterium tuberculosis  
<400> 167  
gacttctcgc acgaaccctt tgaggacatt ctgtcgacgc cggaaatttc ccatgtcttc 60  
20 ggcgacacca agctgggtag cgcggtgccc accccgccgg tattgatcgt gcaggc 116

<210> 168  
<211> 63  
<212> ADN  
<213> Mycobacterium tuberculosis

25 <400> 168  
ttcaaccoga tgacctacgc cggcatggcg agactggccg tgatcgccgc caaggtgatc 60  
acc 63

<210> 169  
<211> 296  
<212> ADN

ES 2 725 003 T3

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 169

tggggtctat gtcctgattg ttcgatatcc gacacttcgc gatcacatcc gtgatcacag 60  
 cccgataaca ccaactcctg gaaggaatgc tgtgcccagag caacaccac ccattacaga 120  
 aaccaccacc ggagccgcta gcaacggctg tcccgtcgtg ggtcatatga aataccccgt 180  
 cgagggcggc ggaaccagc actggtggcc caaccggctc aaagtatact ttatggggca 240  
 gctcccgccg cctttggtcc tgaccaccgg gttggccgag tttctgaagg tactgc 296

<210> 170

5 <211> 284

<212> ADN

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 170

ggctcaatct gaaggtactg caccaaaacc cggccgtcgc tgaccgatg ggtgcggcgt 60  
 tcgactatgc cgcggaggtc gcgaccatcg acgttgacgc cctgacgcgg gacatcgagg 120  
 aagtgatgac cacctcgag ccgtggtggc ccgccgacta cggccactac gggccgctgt 180  
 ttatccggat ggcgtggcac gctgccggca cctaccgat ccacgacggc cgcggcggcg 240  
 ccggggggcg catgcagcgg ttcgcgccgc ttaacagctg gcc 284

10 <210> 171

<211> 660

<212> ADN

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 171

ttcgcgccgc ttaacagctg gcccgacaac gccagcttgg acaaggcgcg ccgctgctg 60  
 tggccggtca agaagaagta cggcaagaag ctctcatggg cggacctgat tgttttcgcc 120  
 ggcaactgcg cgctggaatc gatgggcttc aagacgttcg ggttcggctt cggccgggtc 180  
 gaccagtggg agcccgatga ggtctattgg ggcaaggaag ccacctggct cggcgatgag 240  
 cgttacagcg gtaagcggga tctggagaac ccgctggccg cgggtcagat ggggctgatc 300  
 tacgtgaacc cggaggggcc gaacggcaac ccggaccca tggccgcggc ggtcgacatt 360  
 cgcgagacgt ttcggcgcat ggccatgaac gacgtcgaaa cagcggcccg ccagctgtaa 420  
 gcgctctgca aagccgcgta ccggtacttg ctgcagcttt gtcgccggct gatcgtcggc 480  
 ggtcacactt tcggtaaac ccatggcgcc ggcccggccg atctggtcgg ccccgaacc 540  
 gaggctgctc cgctggagca gatgggcttg ggctggaaga gctcgtagcc ggggcttggg 600

15 <210> 172

<211> 162

<212> ADN

ES 2 725 003 T3

<213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 172  
 gtatggcacc ggaaccggtg aggacgcgat caccagcggc atcgaggtcg tatggacgaa 60  
 caccocgacg aaatgggaca acagtttcct cgagatcctg tacggctacg agtgggagct 120  
 gacgaagagc cctgctggcg cttggcaata caccgccaag ga 162  
 <210> 173  
 5 <211> 393  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 173  
 cgctccccga cgatgctggc cactgacctc tcgctgcggg tggatccgat ctatgagcgg 60  
 atcacgcgtc gctggctgga acaccccgag gaattggccg acgagttcgc caaggcctgg 120  
 tacaagctga tccaccgaga catgggtccc gttgcgagat accttggggc gctggtcccc 180  
 aagcagacc tgcgtgggca ggatccggtc cctgcgggtca gccacgacct cgtcggcgaa 240  
 gccgagattg ccagccttaa gagccagatc cgggcatcgg gattgactgt ctcacagcta 300  
 gtttcgaccg catgggcccg ggcgtcgtcg ttccgtggta gcgacaagcg cggcggcgcc 360  
 aacggtggtc gcatccgcct gcagccacaa gtc 393  
 10 <210> 174  
 <211> 356  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 174  
 cctgcagcca caagtccggg gggaggtcaa cgaccccgac ggggatctgc gcaaggtcat 60  
 tcgcaccctg gaagagatcc aggagtcatt caactccgcg gcgccgggga acatcaaagt 120  
 gtccttcgcc gacctcgtcg tgctcgggtg ctgtgccgcc atagagaaag cagcaaaggc 180  
 ggctggccac aacatcacg tgcccttcac cccgggccgc acggatgcgt cgcaggaaca 240  
 aaccgacgtg gaatcctttg ccgtgctgga gcccaaggca gatggcttcc gaaactacct 300  
 15 cggaaagggc aaccggttgc cggccgagta catgctgctc gacaaggcga acctgc 356  
 <210> 175  
 <211> 196  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 20 <400> 175

ES 2 725 003 T3

cggccgagta catgctgctc gacaaggcga acctgcttac gctcagtgcc cctgagatga 60  
 cgggtgctggt aggtggcctg cgcgtcctcg gcgcaaacta caagcgctta ccgctgggcg 120  
 tgttcaccga ggcctccgag tcaactgacca acgacttctt cgtgaacctg ctcgacatgg 180  
 gtatcacctg ggagcc 196  
 <210> 176  
 <211> 181  
 <212> ADN  
 5 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 176  
 ggcaaggatg gcagtggcaa ggtgaagtgg accggcagcc gcgtggacct ggtcttcggg 60  
 tccaactcgg agttgcgggc gcttgtcgag gtctatggcg ccgatgacgc gcagccgaag 120  
 ttcgtgcagg acttcgtcgc tgcctgggac aaggtgatga acctcgacag gttcgacgtg 180  
 c 181  
 <210> 177  
 <211> 67  
 10 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 177  
 ggcgggcatg tttctggctg tctggctgcc gctggacaac ggccttcggc ccgagccgat 60  
 catcgcc 67  
 <210> 178  
 15 <211> 59  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 178  
 ggcgatgatt tccagtagc cggcgtggtc ggtggccgg tctaacctac aggccttgg 59  
 20 <210> 179  
 <211> 263  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 179  
 tcggcgacaa cctccgcggc cccgcatact caccgcctt aaccgcgtcg cctaccatcg 60  
 agcctcgtgc cccacgacgg taatgagcga tctcaccgga tcgcacgcct agcagccgtc 120  
 gtctcgggaa tcgcgggtct gctgctgtgc ggcatcgctt cgctgcttcc ggtgaaccaa 180  
 accaccgcga ccatcttctg gccgcagggc agcaccgccg acggcaacat caccagatc 240  
 25 accgcccctc tggtatccgg ggc 263

ES 2 725 003 T3

<210> 180  
 <211> 79  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

5 <400> 180  
 actcggttta tcacgacgcc cggcgcgctc aagaaggccg tgatgctcct cggcgtgctg 60  
 gcggtcctgg tagccatgg 79  
 <210> 181  
 <211> 180  
 <212> ADN

10 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 181  
 gtatacatcg gtgcttgccc agctggcggc ggtgagcacc gccggcgtct ggatgcgctt 60  
 gcccgccacc ctggccggaa tcgctgctg gctgatcgtc agccgtttcg tgctgcggcg 120  
 gctgggaccg ggcccgggcg ggctggcgtc caaccgggctc gctgtgttca ccgctggtgc 180  
 <210> 182  
 <211> 67

15 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 182  
 gcgaccgatg gactgctggc gccgctggcg gtgctggccg cggcgttgctc gctgatcacc 60  
 gtggtgg 67  
 <210> 183

20 <211> 346  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 183  
 cgccatcacc gactccgcg gcaccgccg aggaaggcc cggctcggga tcaacgggtc 60  
 gcacgcggcg ctgccgttcg gattggacc gccacgtacc cgggtgatgg gcagctacgg 120  
 ggagaacaac ctggccgcca cggccacctc ggcctggtac cagttaccgc cccgcagccc 180  
 ggaccggccg ctggtggtgg tttccgcggc cggcgcctc tggctctaca aggaggacgg 240  
 cgatttcac tacggccagt ccctgaaact gcagtggggc gtcaccggcc cggacggccg 300  
 catccagcca ctggggcag tatttccgat cgacatcgga ccgcaa 346

25 <210> 184  
 <211> 293  
 <212> ADN

ES 2 725 003 T3

<213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 184  
 ttcggttcc tgctctggca tgatcatcggc gcgaattcgt cggacgacgg ctacatcctg 60  
 ggcattggccc gagtcgcccga ccacgcccgc tacatgtcca actatttccg ctggttcggc 120  
 agccccgagg atcccttcgg ctggtattac aacctgctgg cgctgatgac ccatgtcagc 180  
 gacgccagtc tgtggatgcg cctgccagac ctggccgccc ggctagtgtg ctggctgctg 240  
 ctgtcgcgtg aggtgctgcc ccgcctcggg ccggcgggtg aggccagcaa acc 293  
 <210> 185

5 <211> 76  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 185  
 tcaacaacgg cctgcccggc gagggcatca tcgcgctcgg ctcgctggtc acctatgtgc 60  
 tgatcgagcg gtccat 76

10 <210> 186  
 <211> 77  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 186  
 caccgtcatc ctgaccgtgg tgttcgccga ccagaccctg tcaacggtgt tggaagccac 60  
 cagggttcgc gccaaaa 77

<210> 187  
 <211> 77  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

20 <400> 187  
 ggctggtcca acgtgcccgc gtttgcggc ggctgcccgc tggccgacga cgtactcgtc 60  
 gagcctgata ccaatgc 77  
 <210> 188  
 <211> 302  
 <212> ADN

25 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 188

ES 2 725 003 T3

ttcgcccag caaagatgcc cgccgatgcc gtcgcggtcc gggtaggtggc cgaggatctg 60  
 tcgctgacac cggaggactg gatcgcggtg accccgccgc gggtagccgga cctgcgctca 120  
 ctgcaggaat atgtgggctc gacgcagccg gtgctgctgg actgggcggt cggtttgcc 180  
 ttcccgtgcc agcagccgat gctgcacgcc aatggcatcg cggaaatccc gaagttccgc 240  
 atcacaccgg actactcggc taagaagctg gacaccgaca cgtgggaaga cggcactaac 300  
 gg 302  
 <210> 189  
 <211> 105  
 <212> ADN  
 5 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 189  
 atgtcacgct gcaactggtg cgggtgggcg acccgccggc attcggctgc gtaccaccg 60  
 acgaggagga ccgcgtagtc gcctttctgg agaagacgga ggatc 105  
 <210> 190  
 <211> 392  
 10 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 190  
 cgcgaaactga accagatggg catttgccag gcgtaggtgc cggtagccgg acttcttgcg 60  
 ctgaccgcgc gcacactgcg ccagaccgag ttcatcgcgc tgcgcaagct ggccggtgcc 120  
 gagcgcaccg agctcaatag ggcctgctg agcgtggacc gttttgtgcg ccgggacagt 180  
 ccgctaccgg tggacgcggg catccgtgcg caattgctcg agcggttcgg catgttcggc 240  
 atccggatgt cgattgccgt gctggcggcc ggcgtgaccg attcgaccgg gctggccgcc 300  
 gaactgctgg agcgcagcgg gctggtggcg ctgcgcaatg tgatagacca gcagttcgcg 360  
 cagcgtccg acatgcttaa ggcgcatacc gc 392  
 15 <210> 191  
 <211> 72  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 191  
 gagcaggtgc tttcccgcgc gacggagcga gtgcgtgctg gggtagctcg cgaaatacgt 60  
 20 tcggcaacag ag 72  
 <210> 192  
 <211> 68  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

ES 2 725 003 T3

<400> 192  
 gggttcctat ggcggcgtgg tcatgattgg catgctgtcg tgggtggtcg gacttggggtt 60  
 gttcaacc 68  
 <210> 193  
 <211> 300  
 5 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 193  
 cgatcccgat aggtgttttg ccggcttgcg gatcagacct cgatttcggg gtgaggcgga 60  
 atccatagcg tcgatggcac agcgcgggtc acgcccgcga acagcttctt cgattgaagg 120  
 gaaatgaaga tgacctcgct tatcgattac atcctgagcc tgttccgcag cgaagacgcc 180  
 gcccggtcgt tcgttgccgc tccgggacgg gccatgacca gtgccgggct gatcgatata 240  
 gcgccgcacc aaatctcatc ggtggcggcc aatgtggtgc cgggtctgaa tctgggtgcc 300  
 <210> 194  
 10 <211> 292  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 194  
 atcacaggag tggagttttg aacgcaacga cggcaggtgc tgtgcaattc aacgtcttag 60  
 gaccactgga actaaacctc cggggcacca aactgccatt gggaacgccg aaacaacgtg 120  
 ccgtgctcgc catgctgttg ctatcccgga accaagtcgt agcggccgac gactgggtcc 180  
 aggcaatctg ggagaagtcg ccacctgcac gagcccgcag caccgtccac acgtacattt 240  
 gcaaccttcg ccggaccctg agcgatgcag gcgttgattc gcgcaacata tt 292  
 15 <210> 195  
 <211> 68  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 195  
 tacgaaccac acgttgcgca gacatcacac tagactactt gtgtaacggc gccctgtcgg 60  
 20 gtagccaa 68  
 <210> 196  
 <211> 70  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 25 <400> 196  
 gcttgacgcc gctacggcac tggcgcagcg cactggccac ggcgctggca gcacctgcga 60  
 actcaacttc 70

ES 2 725 003 T3

<210> 197  
 <211> 80  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

5 <400> 197  
 cagccgatgc cgctgtcaag ggccaccgac ccggtacatc gcacggcgtg ccgagatcct 60  
 gggttcttac cgcacggcg 80  
 <210> 198  
 <211> 79  
 <212> ADN

10 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 198  
 acagcgccaa cgctcagccgc caccacgccg tcatcgtcga cacgggcacc aactacgtca 60  
 tcaacgacct ccgatcgtc 79  
 <210> 199  
 <211> 129

15 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 199  
 tcgccgctag gctgaccgcg tgtcaatcgt gacgccatac gaggacctgc tgcgcttcgt 60  
 gctcgaaacg ggtacgcca aatccgaccg caccggcacc ggaacccgca gcctgttcgg 120  
 ccagcagat 129  
 <210> 200

20 <211> 200  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 200  
 cgggtacgcc caaatccgac cgcaccggca ccggaacccg cagcctgttc ggccagcaga 60  
 tgcgctatga tttgtcggcc ggtttcccgc tgctcaactac caagaaagtc catttcaaat 120  
 cggtagccta cgagctgctg tggtttttgc gcggcgattc caatatcggg tggctgcacg 180

25 agcacggagt caccatctgg 200  
 <210> 201  
 <211> 107  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

30 <400> 201

ES 2 725 003 T3

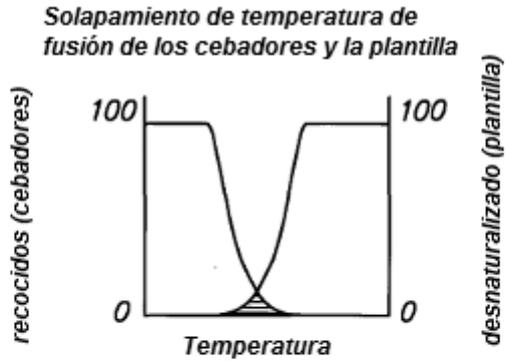
attccaatat cggttggctg cagcagcacg gagtcacat ctgggacgaa tgggcaagtg 60  
 atacaggcga actcgggccg atctacggtg tacaatggcg atcgtgg 107  
 <210> 202  
 <211> 228  
 <212> ADN  
 5 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 202  
 ggtgagcaca tcgaccagat cagcgcggcg ctggatttgc tgcgcaccga tcccgattcc 60  
 cggcgcacatca tcgtgtcggc ctggaacgtc ggcgaaatcg agcggatggc gctgccgccc 120  
 tgtcatgcgt tcttcagtt ctacgtcgcc gatggccggc tgagctgtca gctctaccaa 180  
 cgcagcgccg acctgtttct ggggtgtgcc ttcaacatcg ccagctat 228  
 <210> 203  
 <211> 200  
 10 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 203  
 cgccgacctg tttctgggtg tgccgttcaa catcgccagc tatgcgttgc tcaccacat 60  
 gatggccgcc caggccggct tgctcggcgg cgagttcatc tggaccggtg gcgactgcca 120  
 catctacgac aatcacgtcg agcaagtacg gctgcagctc agcccgagc cgcggccata 180  
 tccgaaacta cttctagccg 200  
 <210> 204  
 15 <211> 77  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 204  
 gcaactacca cccgcacggc gacgcgtcga tctacgacag cctggtgcgc atggcccagc 60  
 cctggtcgtc gcgctac 77  
 20 <210> 205  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 205  
 25 ccggaacgt cggcatcgca aactc 25  
 <210> 206  
 <211> 28  
 <212> ADN

<213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 206  
 tgcccgtgtt gtagaagccc gtgttgaa 28  
 <210> 207  
 5 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 207  
 tcgttcatca ccgatcc 17  
 10 <210> 208  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 208  
 15 gtgagcagtt cgttcca 17  
 <210> 209  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 20 <400> 209  
 tcaacgagac gggcagct 19  
 <210> 210  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 25 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 210  
 tgcgagcgta ggcgtc 16  
 <210> 211  
 <211> 15  
 30 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 211  
 gtccagcgcc gcttc 15  
 <210> 212  
 35 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

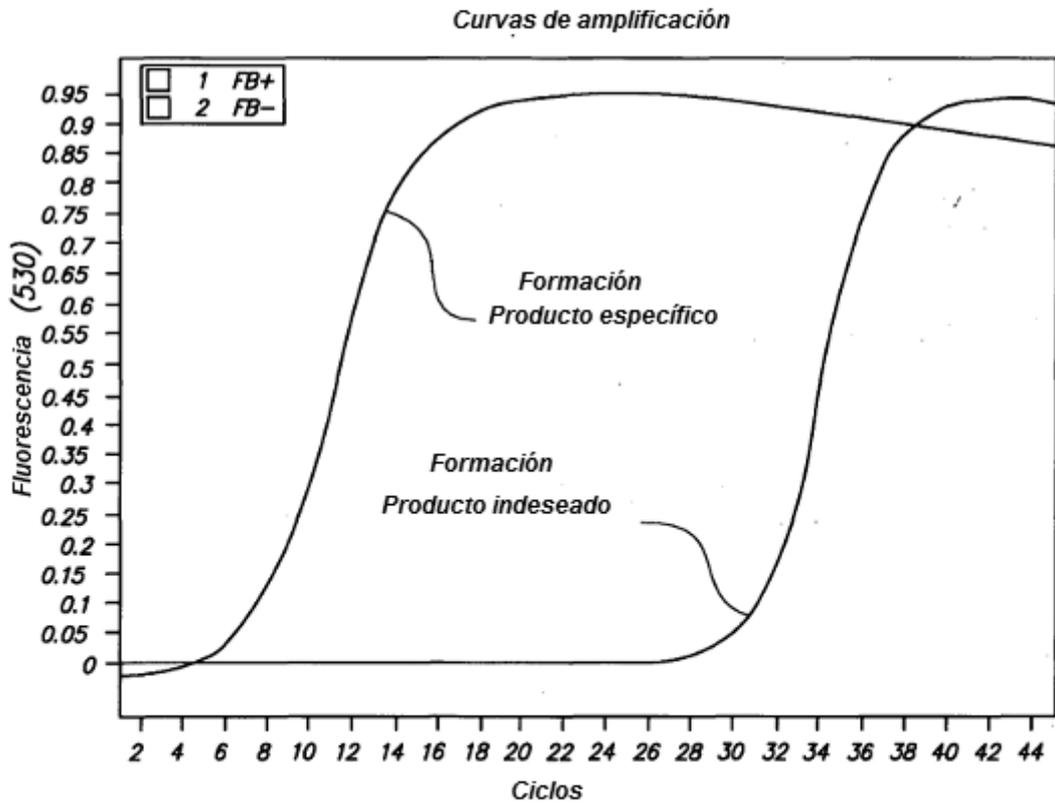
<400> 212  
ctgctaccca cagccggta ggt 23  
<210> 213  
<211> 15  
5 <212> ADN  
<213> Mycobacterium tuberculosis  
<400> 213  
gccagcattg aggat 15  
<210> 214  
10 <211> 18  
<212> ADN  
<213> Mycobacterium tuberculosis  
<400> 214  
caattcgggc accaataa 18  
15 <210> 215  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Mycobacterium tuberculosis  
<400> 215  
20 tgcgatgccg acgtttccg 19

**REIVINDICACIONES**

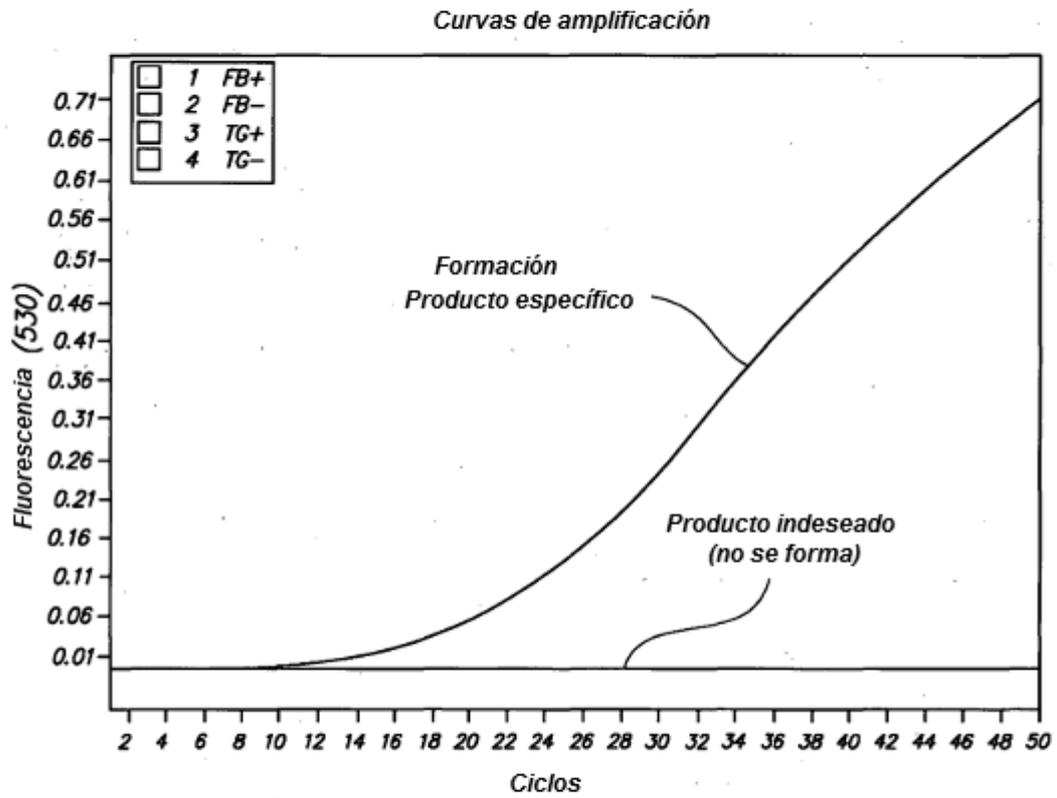
1. Un método para amplificar un ácido nucleico diana mediante PCR en tiempo real, en donde:
  - a. los cebadores de oligonucleótidos se hibridan en el ácido nucleico diana; y
  - b. el ácido nucleico diana se amplifica y desnaturaliza;
- 5 en donde los cebadores de oligonucleótidos están diseñados para tener una Tm de cebador que está dentro de 15 °C de la temperatura de fusión del ácido nucleico diana y en donde el método se lleva a cabo a una temperatura entre 75 °C y 90 °C.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende ensayar el producto de ácido nucleico amplificado y detectar una o más variaciones de secuencia de ácido nucleico en relación con una secuencia de referencia.
- 10 3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que las temperaturas de fusión de los cebadores de oligonucleótidos se solapan con la temperatura de fusión del ácido nucleico diana.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las temperaturas de fusión de uno o ambos de los cebadores de oligonucleótidos son iguales a la temperatura de fusión del ácido nucleico diana, o está dentro de 2,5 °C, 5 °C o 10 °C de la temperatura de fusión del ácido nucleico diana.
- 15 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ácido nucleico diana y los cebadores de oligonucleótidos están en un flujo dinámico de hibridación y desnaturalización.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la amplificación produce productos de amplificación específicos del ácido nucleico diana.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la amplificación disminuye la formación de productos de amplificación no específicos en comparación con la amplificación dentro de un amplio intervalo de temperatura.
- 20 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el producto de ácido nucleico diana amplificado se detecta mediante una lectura de detección colorimétrica, opcionalmente en el que la lectura es una señal positiva o negativa, y opcionalmente en el que el producto de ácido nucleico diana amplificado se detecta mediante fluorescencia emitida desde un tinte fluorescente de unión a ADN.
- 25 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en el que el ensayo se realiza mediante un análisis de curva de fusión de alta resolución.
10. El método de la reivindicación 9, en el que el análisis de la curva de fusión detecta uno o más apareamientos erróneos de pares de bases entre el producto de ácido nucleico diana amplificado y la secuencia de referencia.
- 30 11. El método de la reivindicación 10, en el que el ácido nucleico diana es de un microorganismo infeccioso, y comprende al menos un polimorfismo asociado con la capacidad de respuesta, sensibilidad o resistencia del microorganismo a un fármaco.
12. El método de la reivindicación 10, en el que el ácido nucleico diana es de un microorganismo infeccioso y la secuencia de referencia incluye al menos un polimorfismo asociado con la capacidad de respuesta, sensibilidad o resistencia a un fármaco.
- 35 13. El método de la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en el que dos o más variaciones en el ácido nucleico diana indican capacidad de respuesta, sensibilidad o resistencia a el fármaco.



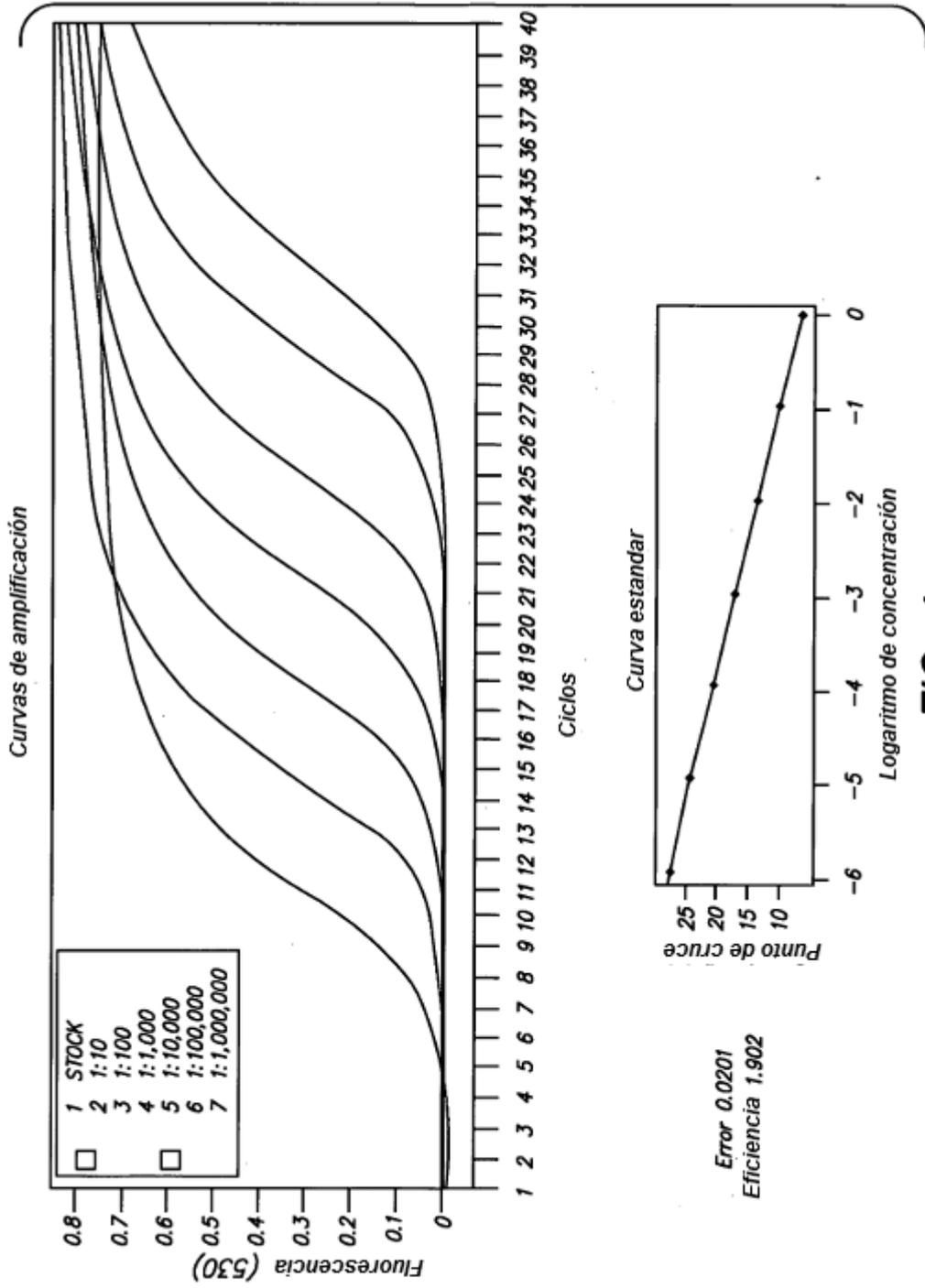
**FIG. 1**



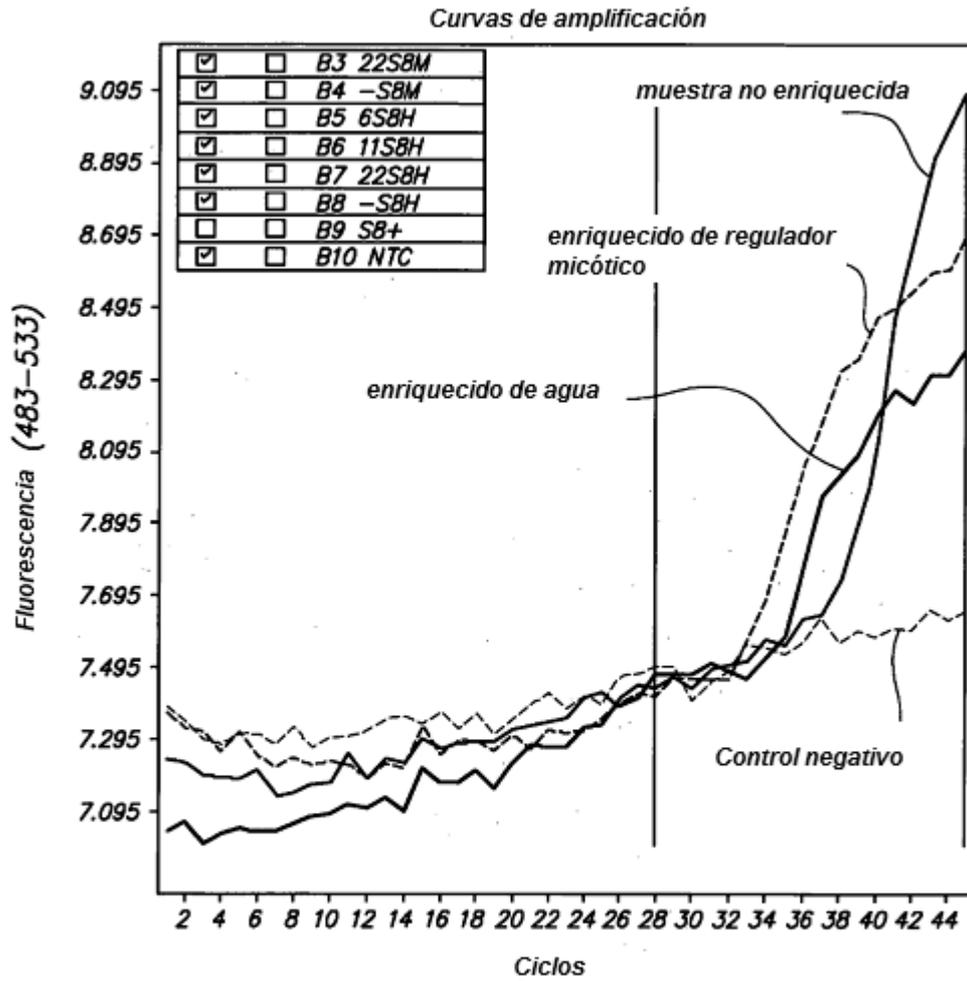
**FIG. 2**

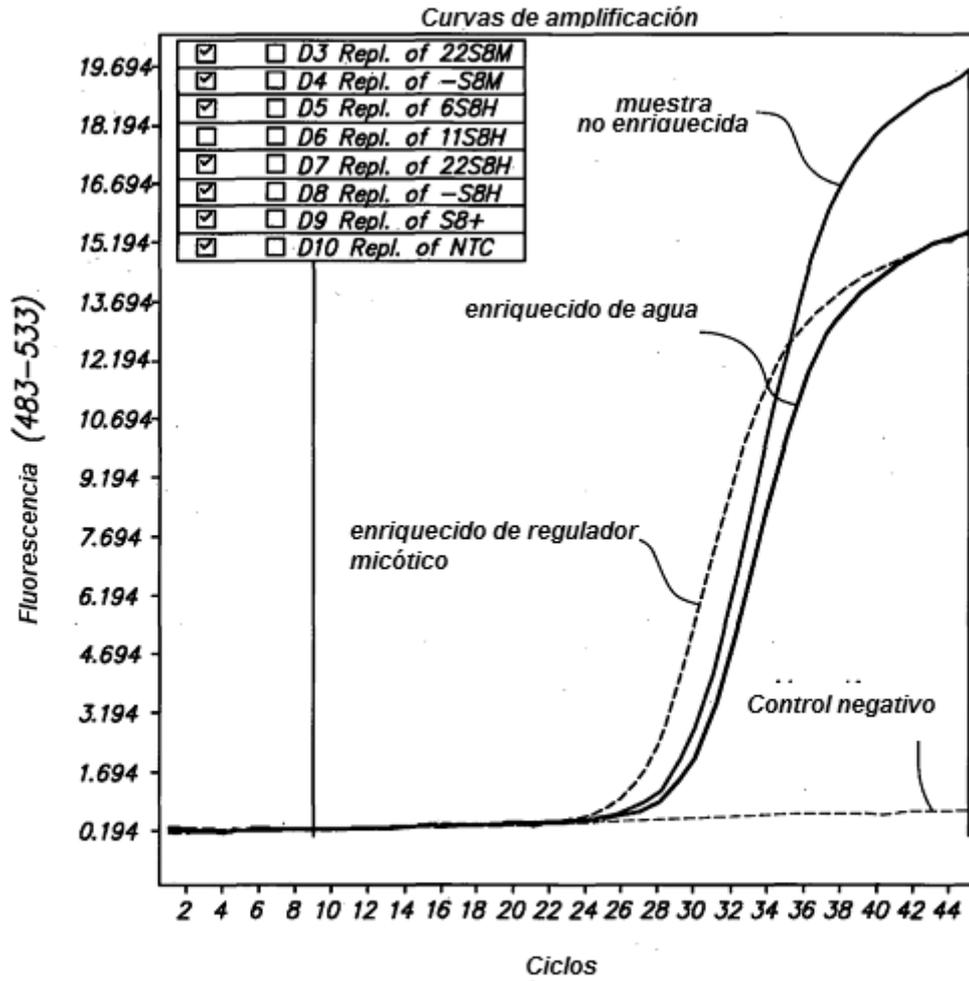


**FIG. 3**

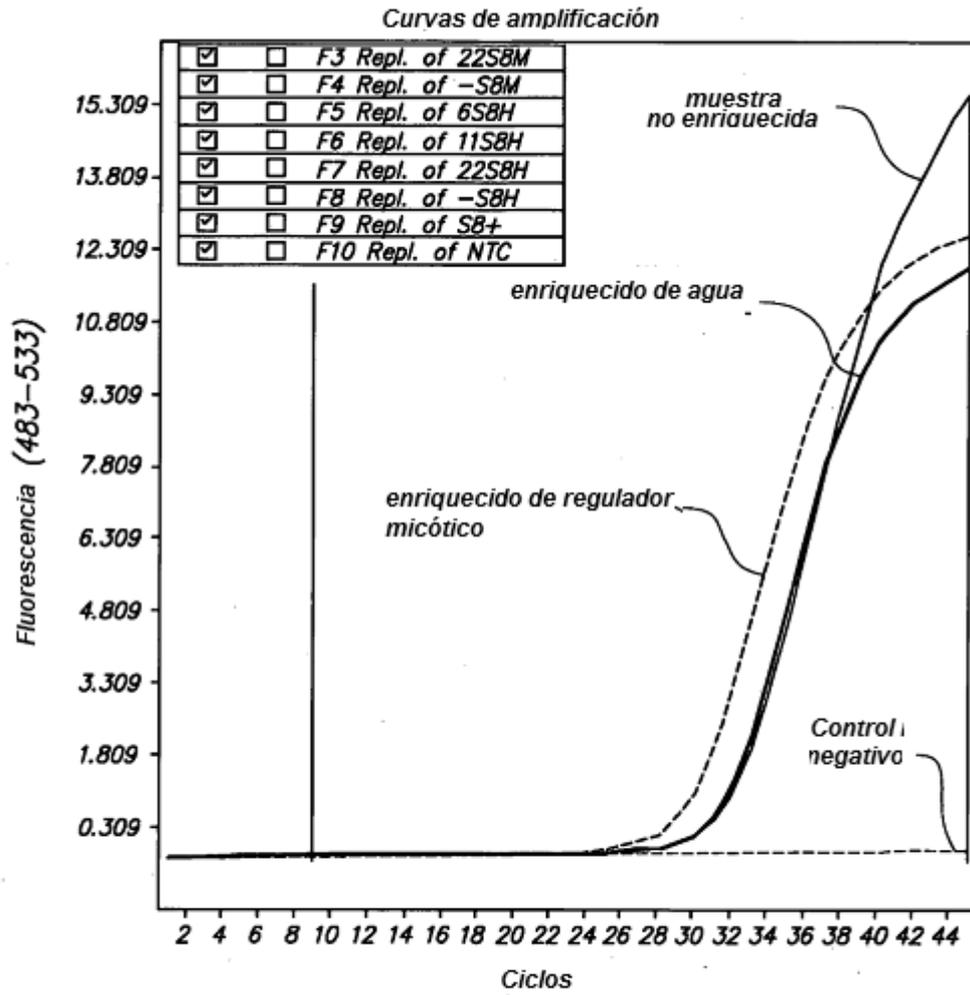


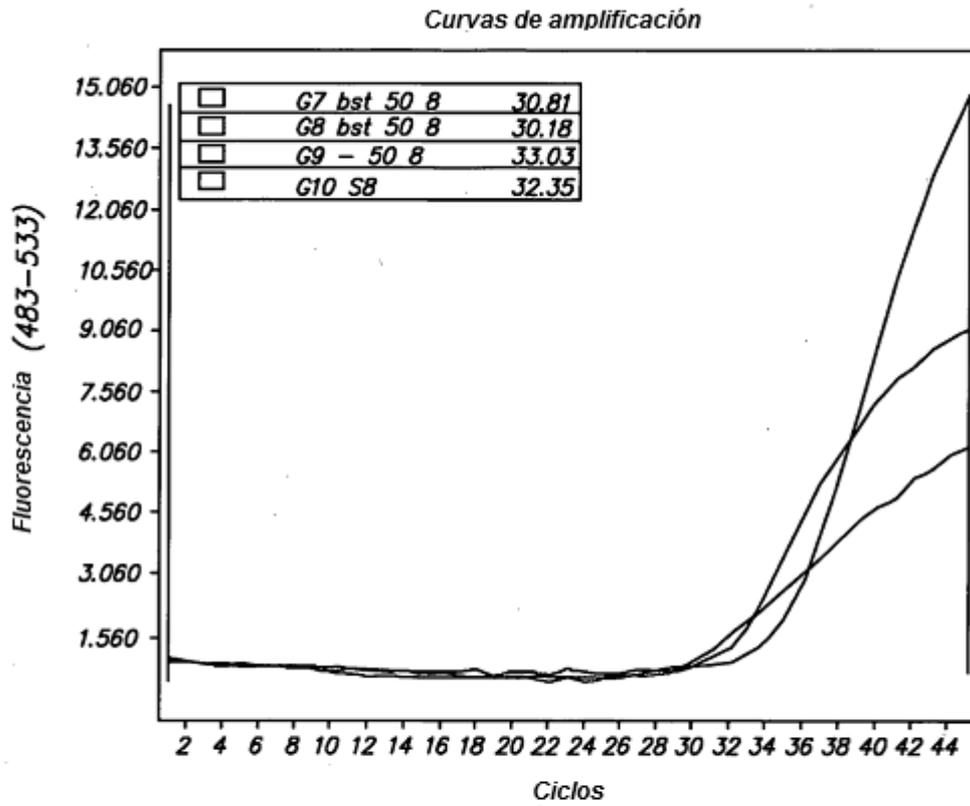
**FIG. 4**



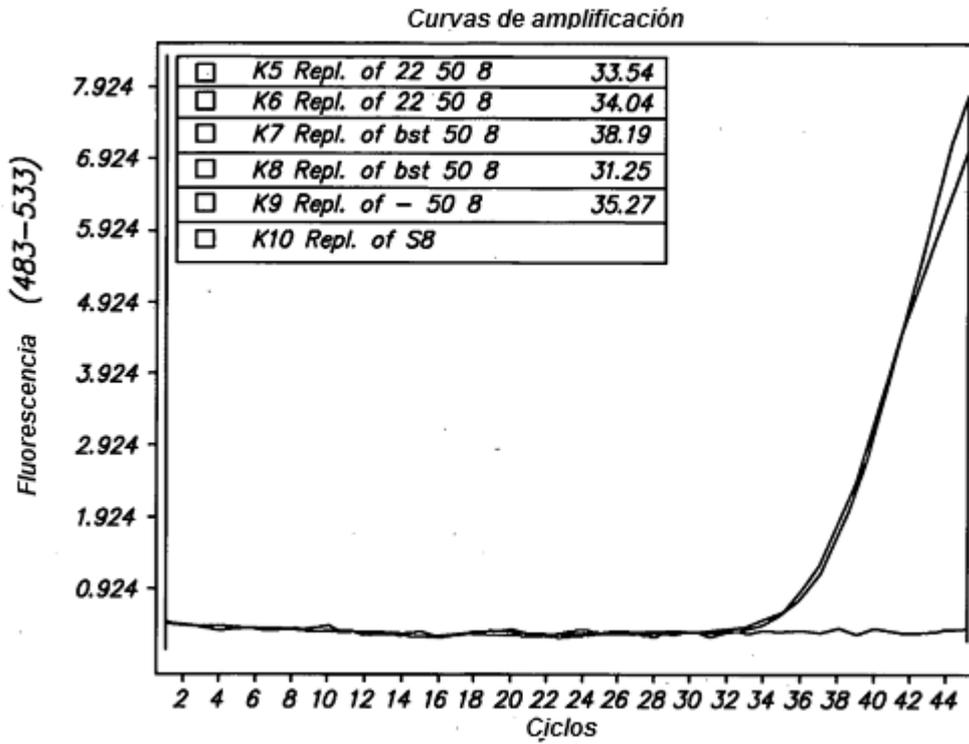


**FIG. 5B**



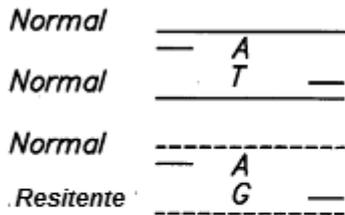


**FIG. 5D**



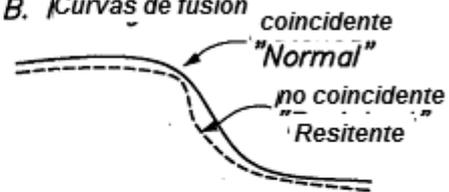
**FIG. 5E**

**A. Productos de amplificación**



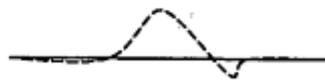
**FIG. 6A**

**B. Curvas de fusión**



**FIG. 6B**

**C. Parcelas de diferencia**



**FIG. 6C**

Elección de muestra

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A																								
B				S																				
C																								
D																								
E																								
F																								
G																								
H																								
I																								
J																								
K																								
L																								
M																								
N																								
O																								
P																								

muestra56  
Posición-C,8

a       b       c       d  
 e       Negativo       Desconocido     

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

Agrupado

Estandar:       Sensitivity:

Estandar diferente: Auto

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

Editar Grupos

Grupo:

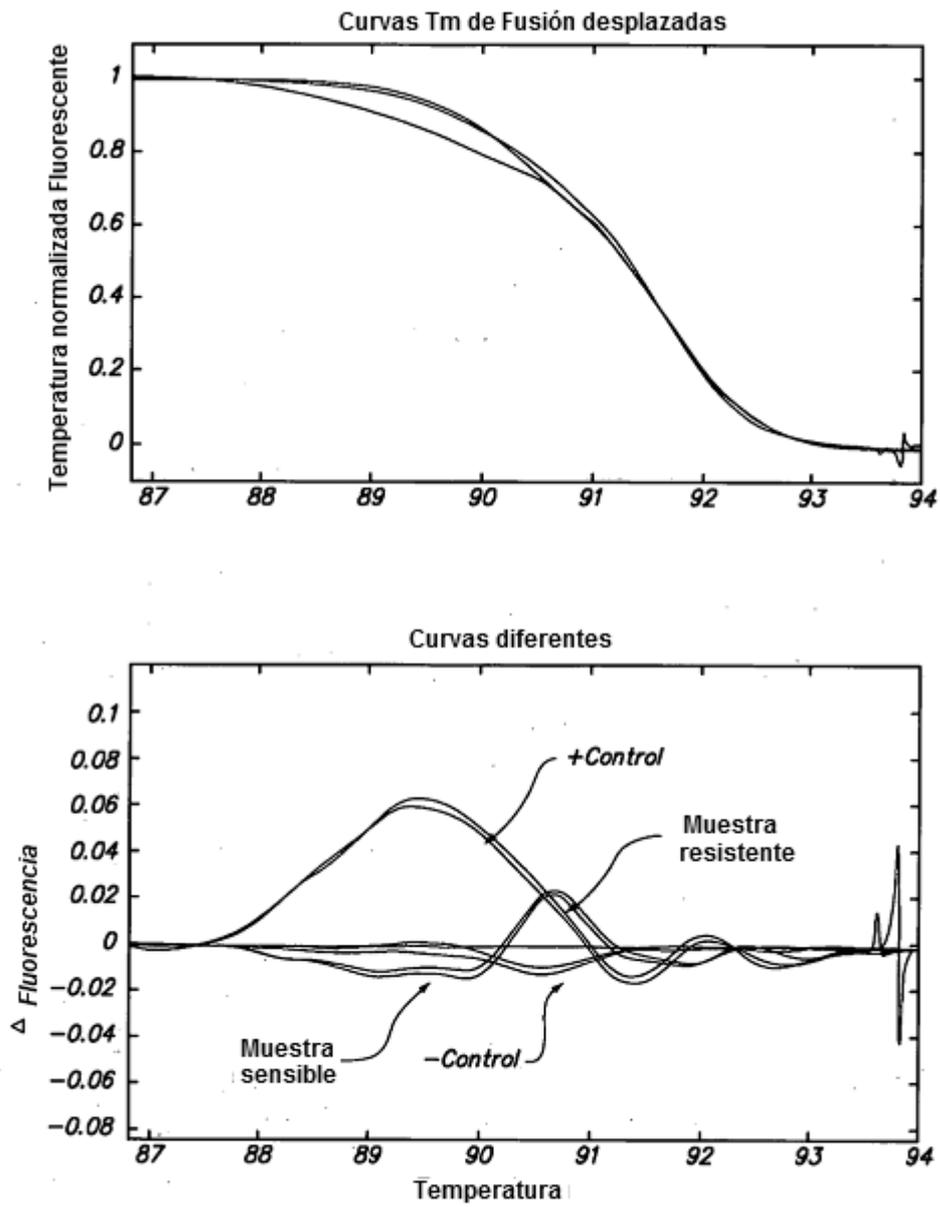
Seleccionar grupo virgen	Borrar grupo	Añadir Grupo
--------------------------	--------------	--------------

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

Nueva llamada:      

Estado:

FIG. 7A



**FIG. 7B**

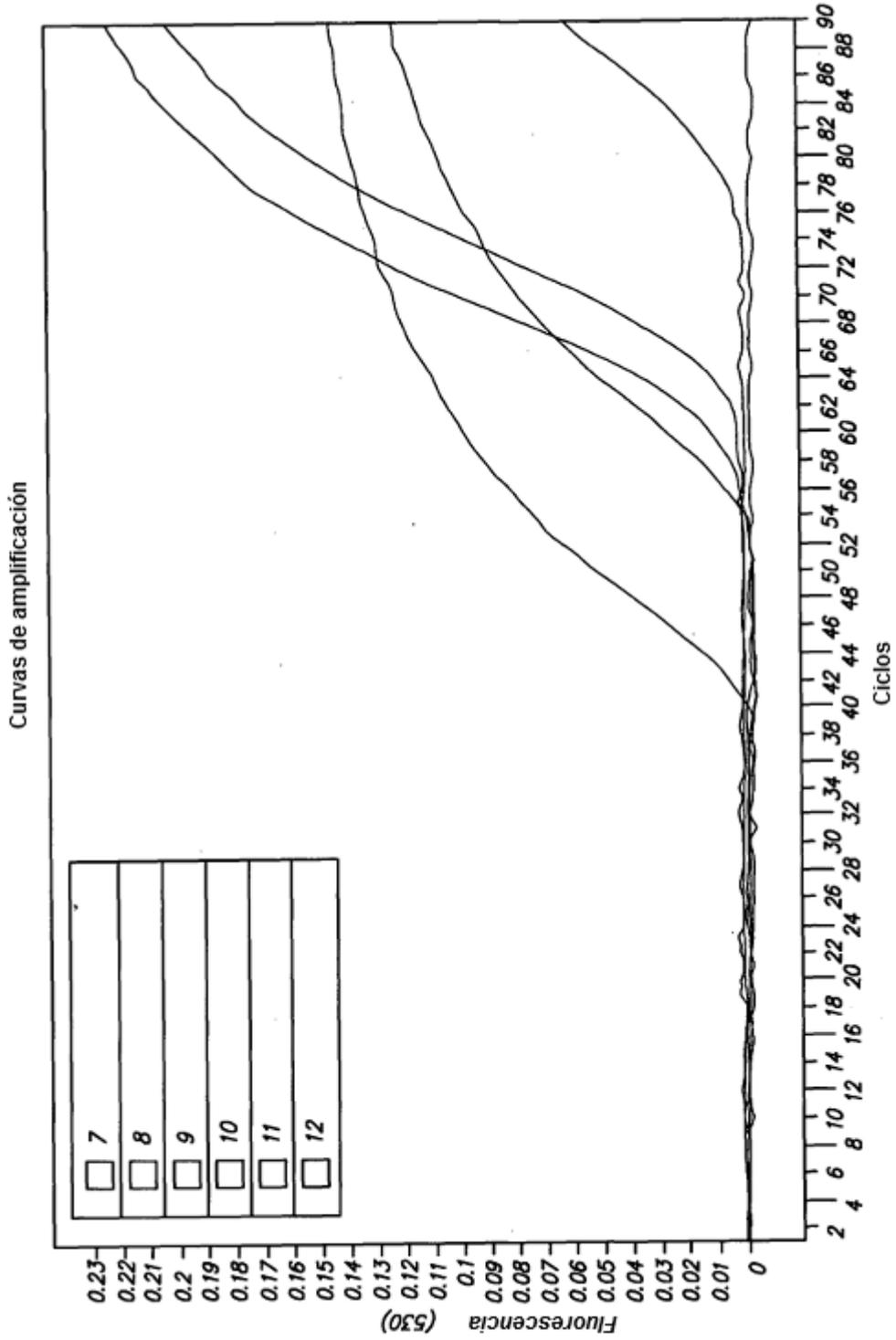
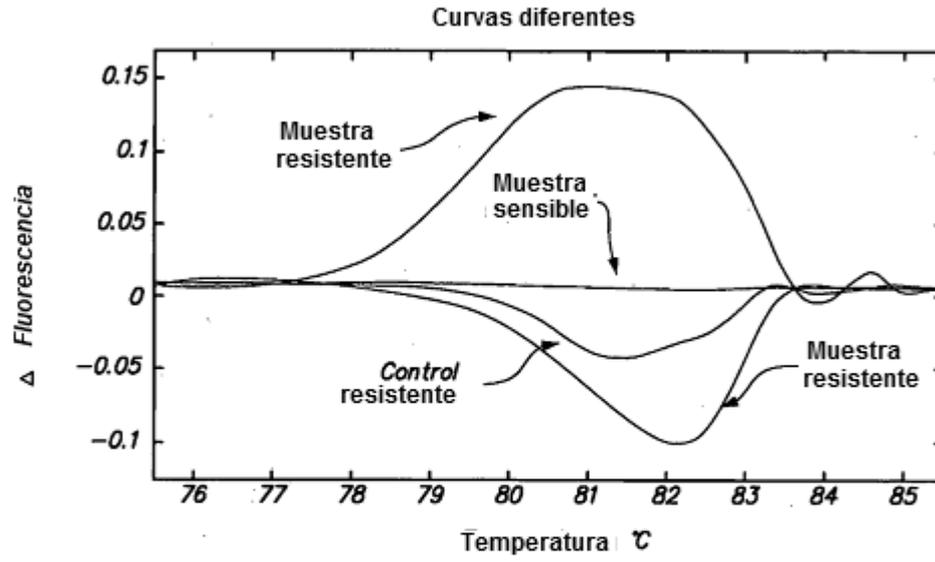
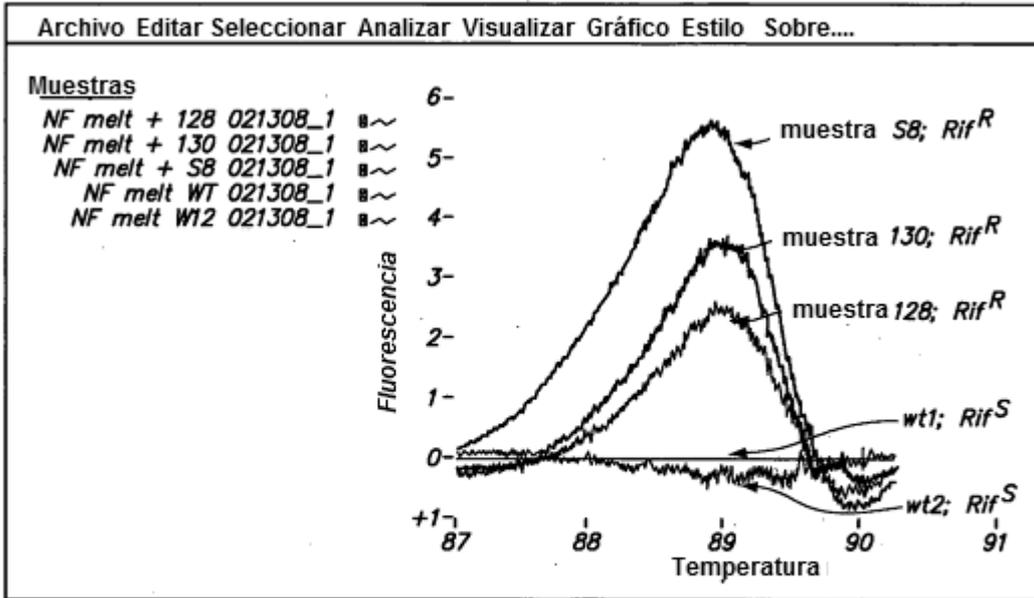


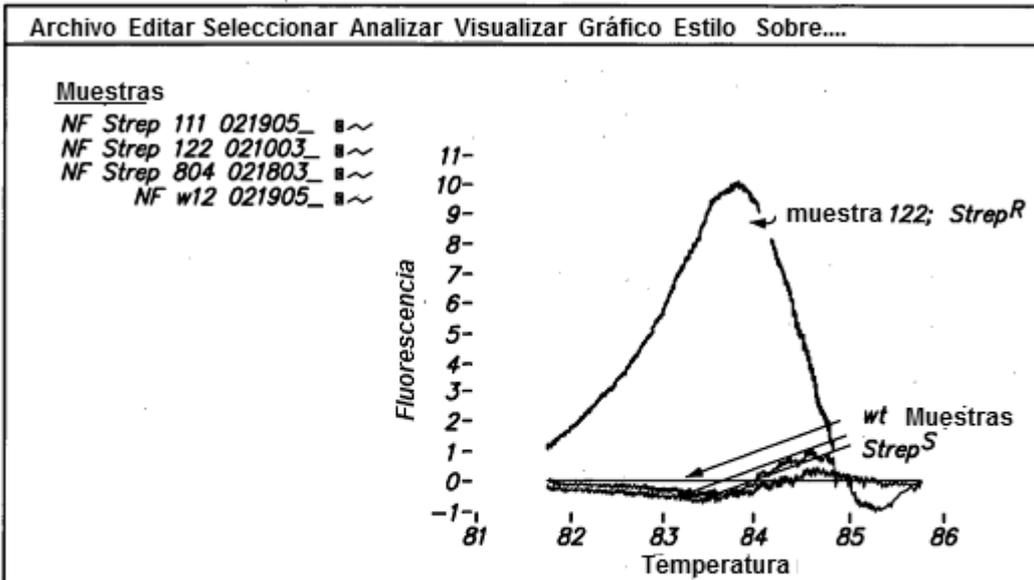
FIG. 8



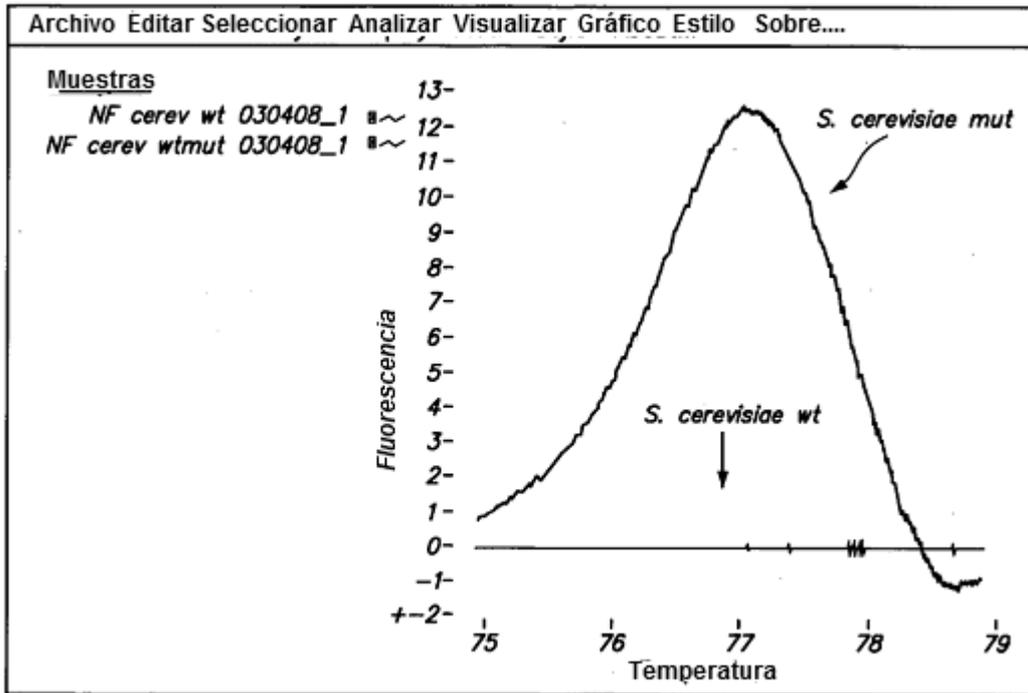
**FIG. 9**



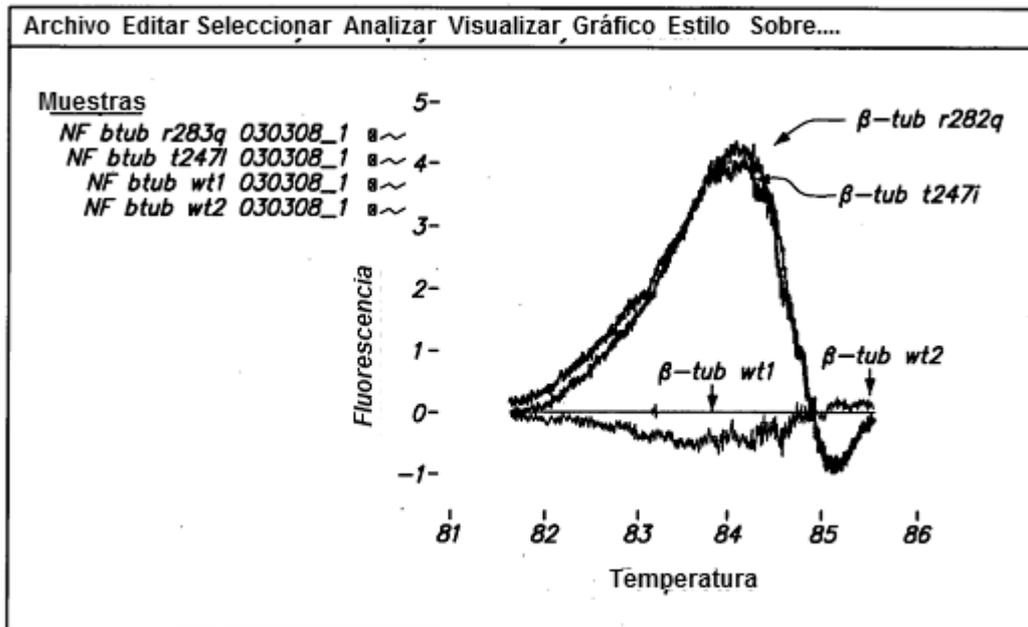
**FIG. 10A**



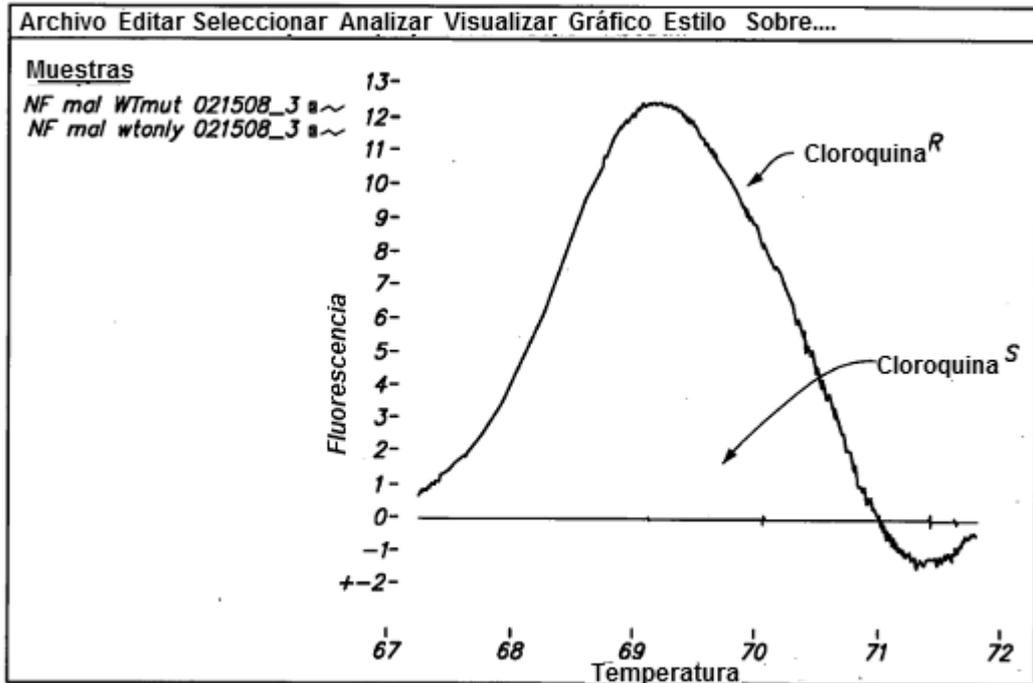
**FIG. 10B**



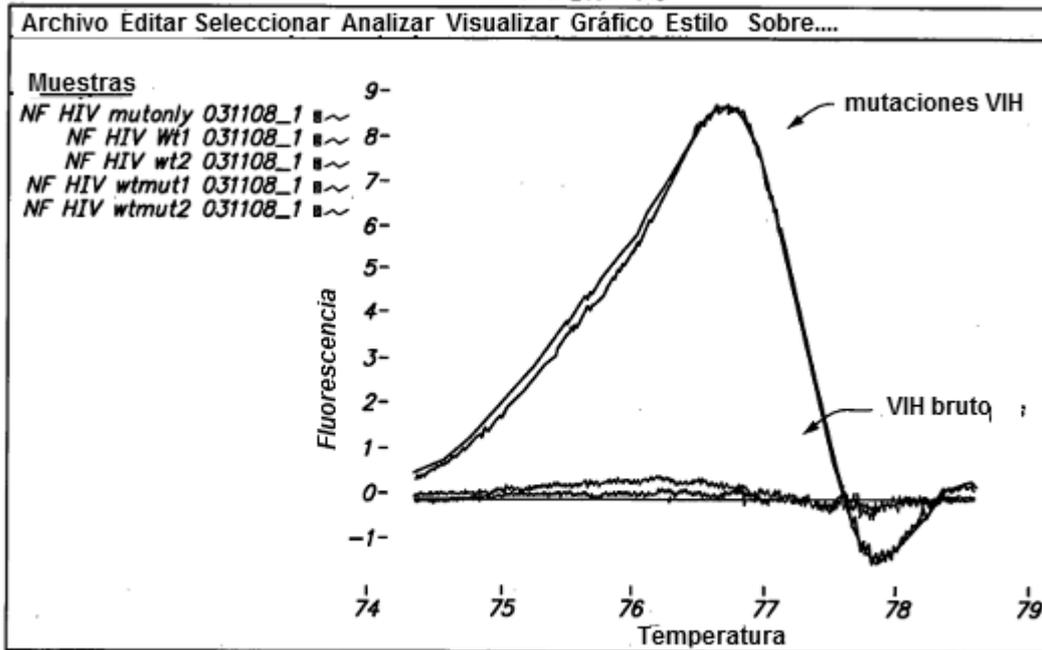
**FIG. 11**



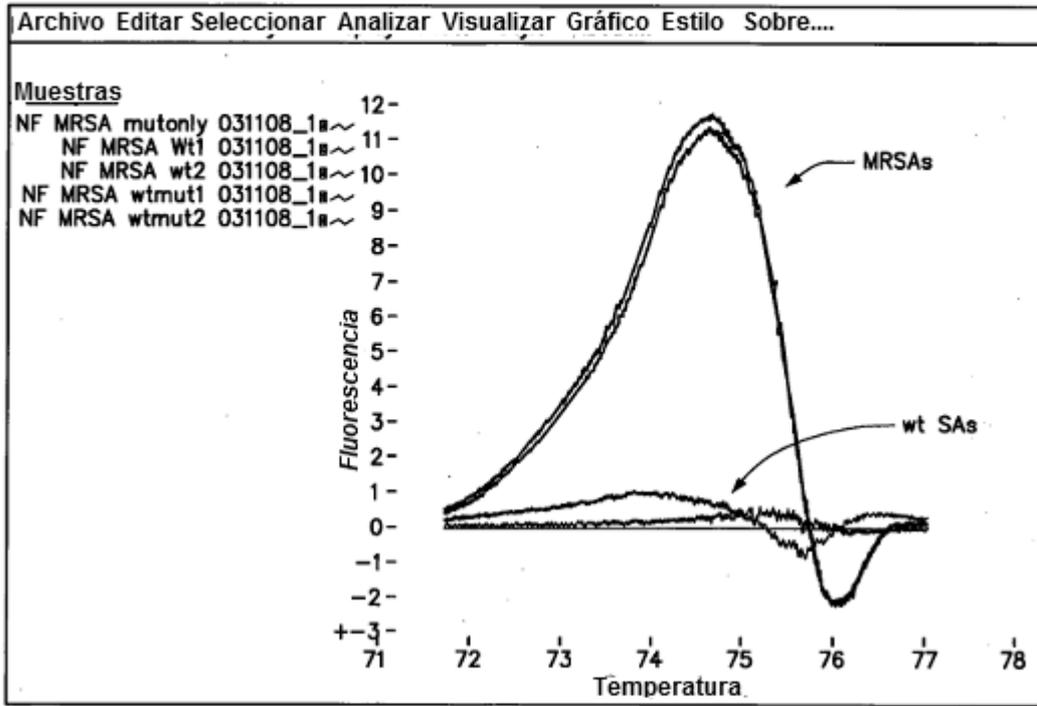
**FIG. 12**



**FIG. 13**

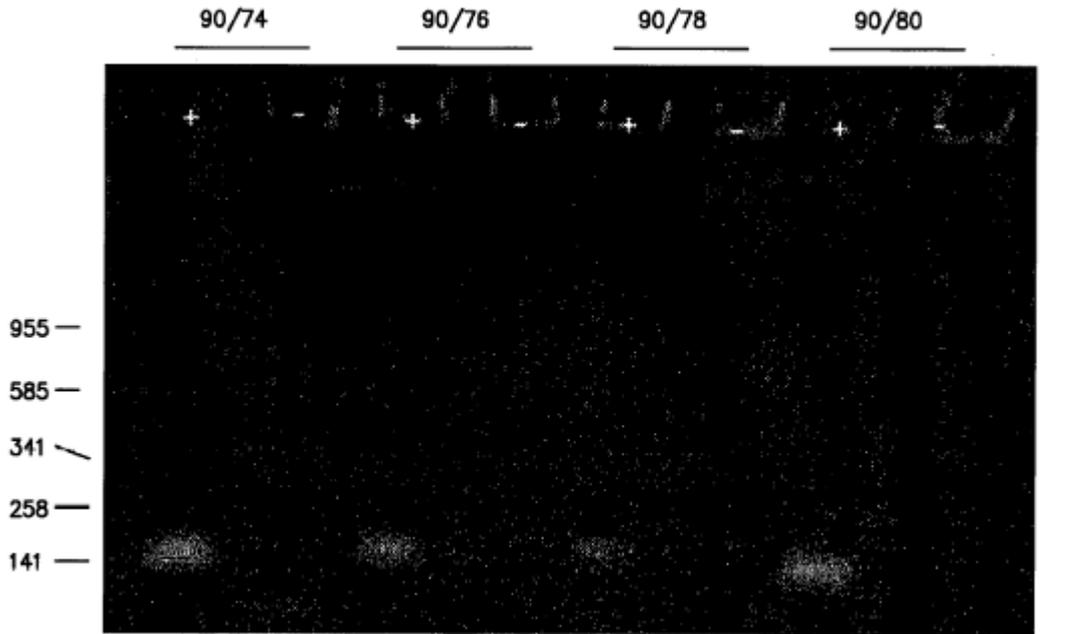


**FIG. 14**



**FIG. 15**

HTPCR Run



**FIG. 16**

1/50 bp  
MTb  
Producto

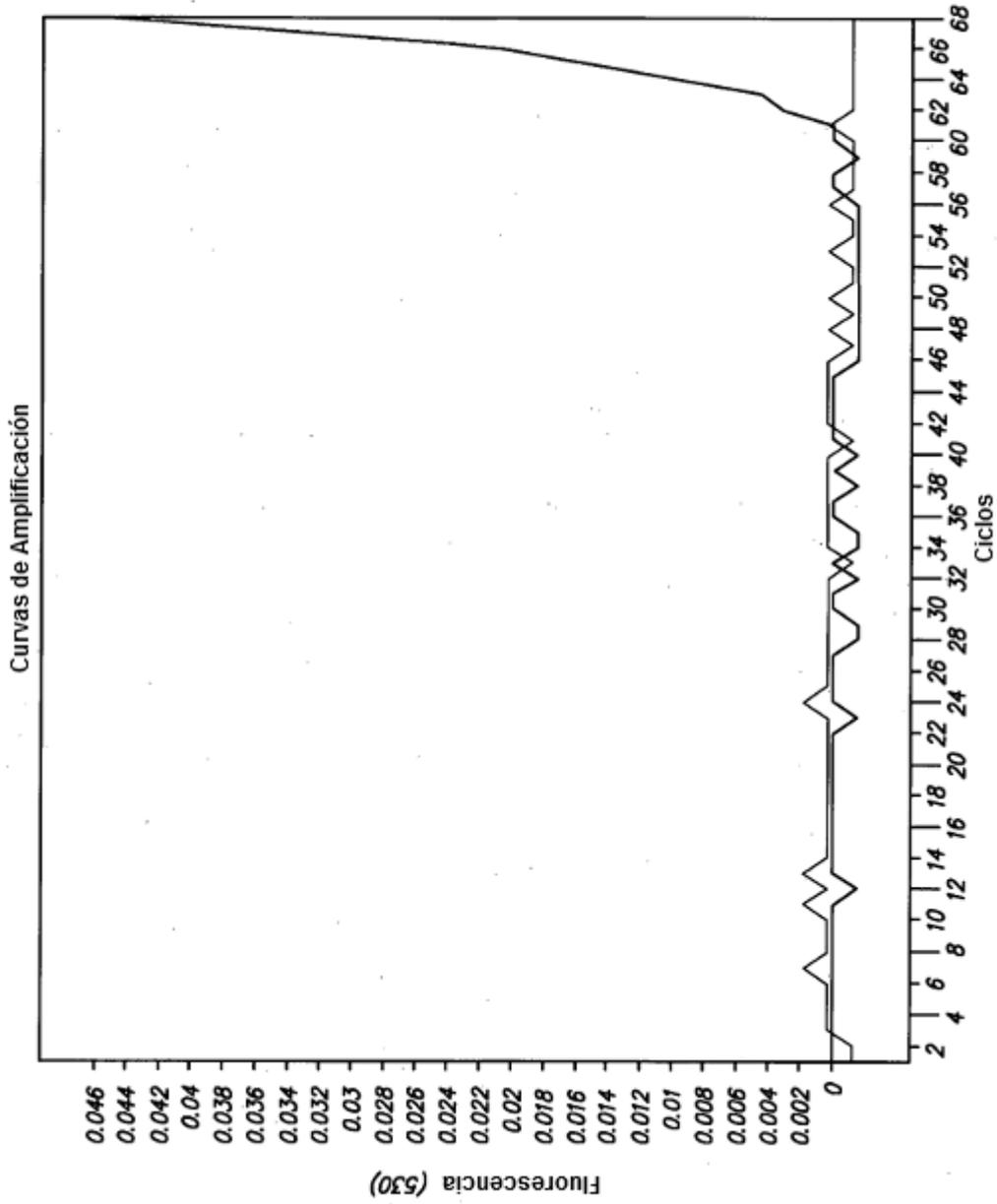


FIG. 17