

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 304**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

G01N 33/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.12.2015 PCT/EP2015/078201**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.06.2016 WO16087438**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2015 E 15807616 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019 EP 3227459**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para detectar Staphylococcus aureus resistente a la meticilina que contiene mecC**

30 Prioridad:

02.12.2014 US 201414558220

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

31.10.2019

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**JOHNSON, JENNY A. y
HAYES, ASHLEY**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 729 304 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

Composiciones y procedimientos para detectar *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina que contiene *mecC*

Campo de la invención

La presente divulgación se refiere al campo del diagnóstico bacteriano y, más en particular, a la detección de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) que contiene secuencias de ácido nucleico de *mecC*.

Antecedentes de la invención

Staphylococcus aureus ("*S. aureus*" o "SA") es una bacteria anaeróbica facultativa, grampositiva, cuyo reservorio natural incluye la piel y la nariz humanas y también puede habitar en heridas. La mayoría de las personas que portan *S. aureus* no muestran signos de infección; sin embargo, *S. aureus* puede volverse invasiva y provocar infección en el cuerpo si se rompe la barrera normal. *S. aureus* puede provocar una serie de enfermedades que van desde infecciones menores de la piel, tales como granos, forúnculos y abscesos, hasta enfermedades graves tales como neumonía, meningitis y sepsis. Los tejidos distintos de la piel y la nariz pueden infectarse cuando se rompen las barreras, por ejemplo, el revestimiento de la piel o la mucosa, lo que da lugar a forúnculos y ántrax. Las infecciones por *S. aureus* pueden propagarse entre las personas a través del contacto de la piel con una persona infectada o el contacto con objetos usados por una persona infectada.

S. aureus posee una capacidad notable para desarrollar resistencia a los principales antibióticos, incluyendo las penicilinas (meticilina, oxacilina, cloxacilina y flucloxacilina), que le han otorgado la etiqueta de "superbacteria". *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) es una bacteria que se ha vuelto resistente a las penicilinas y es responsable de varias infecciones humanas que son difíciles de tratar. SARM también se puede conocer como *S. aureus* resistente a la oxacilina (SARO) y *S. aureus* multiresistente, mientras que las cepas de *S. aureus* no resistentes a la meticilina a veces se denominan *S. aureus* sensible a la meticilina (SASM).

El gen requerido para la resistencia a la meticilina en estafilococos, *mecA*, codifica la proteína de unión a penicilina de baja afinidad 2a (PBP2a) (Niemeyer *et al.*, J. Bacteriol., (1996), 178(18):5464-5471). Una variante novedosa de *mecA* (*mecA*_{LGA251}), que se ha renombrado como *mecC*, fue identificada recientemente en cepas aisladas de *S. aureus* tanto de humanos como animales (Harrison *et al.*, Antimicrob. Agents Chemother., (2013), 57(3):1524-1528). Este homólogo comparte un 70 % de identidad de nucleótidos con el gen *mecA*, y su presencia plantea problemas de diagnóstico con el potencial de ser diagnosticado erróneamente como *S. aureus* sensible a la meticilina (Paterson *et al.*, Trends Microbiol., (2014), 22(1):42-47). Por tanto, existe la necesidad en la técnica de un procedimiento rápido y fiable para detectar específicamente SARM que contiene *mecC* de una manera sensible.

Sumario de la invención

Determinados modos de realización de la presente divulgación se refieren a procedimientos para la detección rápida de la presencia o ausencia de *Staphylococcus aureus* que contiene *mecC* (*mecC*-SARM) en una muestra biológica o no biológica, por ejemplo, detección múltiple de *mecC*-SARM por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real en un solo tubo de ensayo. Los modos de realización incluyen procedimientos de detección de *mecC*-SARM que comprenden realizar al menos una etapa de ciclado, que puede incluir una etapa de amplificación y una etapa de hibridación. Además, los modos de realización incluyen cebadores, pares de cebadores, sondas y kits que están diseñados para la detección de *mecC*-SARM en un solo tubo. Los procedimientos de detección están diseñados para dirigirse al gen *mecC*, lo que permite detectar *mecC*-SARM en una sola prueba.

La presente divulgación proporciona procedimientos para detectar la presencia o ausencia de *mecC*-SARM en una muestra biológica de un individuo. Dichos procedimientos en general incluyen realizar al menos una etapa de ciclado, que incluye una etapa de amplificación y una etapa de unión al tinte. Típicamente, la etapa de amplificación incluye poner en contacto la muestra con una pluralidad de pares de cebadores para *mecC*-SARM para producir uno o más productos de amplificación de *mecC*-SARM si una molécula de ácido nucleico de *mecC*-SARM está presente en la muestra, y la etapa de unión a tinte incluye poner en contacto el producto de amplificación de *mecC*-SARM con un tinte de unión a ADN bicatenario. Dichos procedimientos también incluyen detectar la presencia o ausencia de unión del tinte de unión a ADN bicatenario en el producto de amplificación, en el que la presencia de unión es indicativa de la presencia de *mecC*-SARM en la muestra, y en el que la ausencia de unión es indicativa de la ausencia de *mecC*-SARM en la muestra. Un tinte de unión a ADN bicatenario representativo es el bromuro de etidio. Además, dichos procedimientos también pueden incluir determinar la temperatura de fusión entre el producto de amplificación de *mecC*-SARM y el tinte de unión a ADN bicatenario, en el que la temperatura de fusión confirma la presencia o ausencia de *mecC*-SARM.

En un aspecto, se proporciona un procedimiento para detectar *Staphylococcus aureus* que contiene *mecC* (*mecC*-SARM) en una muestra, que comprende realizar una etapa de amplificación que comprende poner en contacto la muestra con un cebador oligonucleotídico para *orfX* y un cebador oligonucleotídico para *mecC*-SARM para producir un producto de amplificación si *mecC*-SARM está presente en la muestra; realizar una etapa de hibridación que comprende poner en contacto el producto de amplificación con una o más sondas oligonucleotídicas para *mecC*-SARM detectables; y detectar la presencia o ausencia del producto amplificado, en el que la presencia del producto amplificado es indicativa de la presencia de *mecC*-SARM en la muestra y en el que la ausencia del producto amplificado es indicativa de la ausencia de *mecC*-SARM en la muestra; en el que el cebador oligonucleotídico para *mecC*-SARM comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6 y 8; en el que el cebador oligonucleotídico para *orfX* comprende la secuencia de SEQ ID NO: 9; y en el que una de las una o más sondas oligonucleotídicas para *mecC*-SARM detectables comprende la secuencia de SEQ ID NO: 10, o un complemento de la misma. En algunos modos de realización del procedimiento, la etapa de hibridación comprende poner en contacto el producto de amplificación con una sonda que está marcada con un resto fluorescente donador y un resto fluorescente aceptador correspondiente y la etapa de detección comprende detectar la presencia o ausencia de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) entre el resto fluorescente donador y el resto fluorescente aceptador de la sonda, en la que la presencia o ausencia de fluorescencia es indicativa de la presencia o ausencia de *mecC*-SARM en la muestra. En algunos modos de realización, la sonda oligonucleotídica para *mecC*-SARM detectable consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 10, o un complemento de la misma. En algunos modos de realización, la sonda oligonucleotídica para *mecC*-SARM detectable tiene 40 nucleótidos o menos. En algunos modos de realización, la amplificación emplea una enzima polimerasa que tiene una actividad de nucleasa de 5' a 3'. En algunos modos de realización, el resto fluorescente donador y el resto fluorescente aceptador correspondiente están separados por no más de 8 nucleótidos entre sí en la sonda. En algunos modos de realización, el resto fluorescente aceptador es un extintor. En algunos modos de realización, el cebador oligonucleotídico para *orfX* consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 9. En algunos modos de realización, el cebador oligonucleotídico para *orfX* y el cebador oligonucleotídico para *mecC*-SARM tienen 40 nucleótidos o menos.

En un modo de realización particular, el procedimiento para detectar *Staphylococcus aureus* que contiene *mecC* en una muestra incluye realizar una etapa de amplificación que incluye poner en contacto la muestra con un cebador oligonucleotídico para *orfX* y un cebador oligonucleotídico para *mecC*-SARM para producir un producto de amplificación si *mecC*-SARM está presente en la muestra; realizar una etapa de hibridación que incluye poner en contacto el producto de amplificación con una o más sondas oligonucleotídicas para *mecC*-SARM detectables; y detectar la presencia o ausencia del producto amplificado, en el que la presencia del producto amplificado es indicativa de la presencia de *mecC*-SARM en la muestra y en el que la ausencia del producto amplificado es indicativa de la ausencia de *mecC*-SARM en la muestra; en el que el cebador oligonucleotídico para *orfX* comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 9, y el cebador *mecC*-SARM comprende o consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, y 8; y en el que la sonda para *mecC*-SARM detectable comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 10, o un complemento de la misma.

En algunos modos de realización, la amplificación puede emplear una enzima polimerasa que tiene actividad de nucleasa de 5' a 3'. Por tanto, los primer y segundo restos fluorescentes pueden estar en no más de 8 nucleótidos entre sí a lo largo de la longitud de la sonda. En otro aspecto, las sondas para *mecC*-SARM incluyen una secuencia de ácido nucleico que permite la formación de estructuras secundarias. Dicha formación de estructura secundaria en general da como resultado la proximidad espacial entre el primer y segundo resto fluorescente. De acuerdo con este procedimiento, el segundo resto fluorescente en la sonda puede ser un extintor.

La presente divulgación también proporciona kits para detectar uno o más ácidos nucleicos de *mecC*-SARM. El kit puede incluir un conjunto o una pluralidad de conjuntos de cebadores para *mecC*-SARM específicos para la amplificación de la diana génica de *mecC*; y una o más sondas para *mecC*-SARM detectables específicas para la detección de los productos de amplificación de *mecC*-SARM.

En un aspecto, se proporciona un kit para detectar un ácido nucleico de *Staphylococcus aureus* que contiene *mecC* (*mecC*-SARM), que comprende un primer cebador oligonucleotídico que comprende o que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6 y 8; un segundo cebador oligonucleotídico configurado para hibridarse con una parte de un gen *orfX* y que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 9; y una sonda oligonucleotídica marcada de manera detectable configurada para hibridarse con un amplicón generado por el primer y el segundo cebador oligonucleotídico y que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 10, o un complemento de la misma. En algunos modos de realización, la tercera sonda oligonucleotídica marcada de manera detectable comprende un resto fluorescente donador y un resto fluorescente aceptador correspondiente. En algunos modos de realización, el resto fluorescente donador y el resto fluorescente aceptador correspondiente están separados por no más de 8 nucleótidos entre sí en la sonda. En algunos modos de realización, el resto fluorescente aceptador es un extintor. En algunos modos de realización, el kit comprende además nucleósidos trifosfato, un ácido nucleico polimerasa y tampones necesarios para la función de la polimerasa de ácido nucleico. En algunos modos de realización, el segundo cebador oligonucleotídico consiste

en la secuencia de SEQ ID NO: 9. En algunos modos de realización, la sonda oligonucleotídica detectable es una sonda oligonucleotídica para *mecC*-SARM y consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 10, o un complemento de la misma. En algunos modos de realización, el primer y segundo cebadores oligonucleotídicos y/o la sonda oligonucleotídica tienen 40 nucleótidos o menos. En algunos modos de realización, el kit también puede incluir un prospecto e instrucciones para usar los cebadores, sondas y restos fluorofóricos para detectar la presencia o ausencia de *mecC*-SARM en una muestra.

También se divulga un oligonucleótido que comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8, o un complemento de las mismas. También se divulga un oligonucleótido que comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionados de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, o un complemento de las mismas. También se divulga que el oligonucleótido tiene 100 nucleótidos o menos. La presente divulgación también proporciona un oligonucleótido que incluye un ácido nucleico que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %, etc.) con una de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12, o un complemento de las mismas, cuyo oligonucleótido tiene 100 nucleótidos o menos. En general, estos oligonucleótidos pueden ser ácidos nucleicos cebadores, ácidos nucleicos sonda o similares en estos modos de realización. También se divulga que los oligonucleótidos tienen 40 nucleótidos o menos (por ejemplo, 35 nucleótidos o menos, 30 nucleótidos o menos, etc.). También se divulga que los oligonucleótidos comprenden al menos un nucleótido modificado, por ejemplo, para alterar la estabilidad de hibridación del ácido nucleico con respecto a los nucleótidos no modificados. Opcionalmente, los oligonucleótidos comprenden al menos un marcador y/o al menos un resto extintor. También se divulga que los oligonucleótidos incluyen al menos una variación modificada conservativamente. Las "variaciones modificadas conservativamente" o, simplemente, las "variaciones conservativas" de una secuencia de ácido nucleico particular se refieren a los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas o, cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Un experto reconocerá que las sustituciones, deleciones o adiciones individuales que alteran, añaden o delecionan un aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos (típicamente menos de un 5 %, más típicamente menos de un 4 %, 2 % o 1 %) en una secuencia codificada son "variaciones modificadas conservativamente" en las que las alteraciones dan como resultado la deleción de un aminoácido, la adición de un aminoácido o la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar.

En un aspecto, se proporciona un par de cebadores oligonucleotídicos para la amplificación de la diana génica de *mecC*-SARM que incluye un primer cebador oligonucleotídico que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6 y 8 y un segundo cebador oligonucleotídico configurado para hibridarse con una parte de un gen *orfX* y que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 9. En algunos modos de realización, el primer cebador oligonucleotídico consiste en una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6 y 8, y el segundo cebador oligonucleotídico consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 9. En algunos modos de realización, los oligonucleótidos tienen 100 nucleótidos o menos. La presente divulgación además proporciona un oligonucleótido que incluye un ácido nucleico que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %, etc.) con una de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o un complemento de las mismas, cuyo oligonucleótido tiene 100 nucleótidos o menos. En determinados modos de realización, los oligonucleótidos tienen 40 nucleótidos o menos (por ejemplo, 35 nucleótidos o menos, 30 nucleótidos o menos, etc.).

También se divulga un conjunto de oligonucleótidos para la amplificación y detección de la diana génica de *mecC*-SARM que incluye al menos una secuencia de ácido nucleico de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, o un complemento de las mismas, y una sonda detectable para la detección del producto de amplificación de *mecC*-SARM que incluye la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 10.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o en las pruebas de la presente materia objeto, se describen a continuación procedimientos y materiales adecuados. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son solo ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

Los detalles de uno o más modos de realización de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción a continuación. Otras características, objetivos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de los dibujos y la descripción detallada, y a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

La FIGURA 1 muestra las curvas de crecimiento de la PCR de experimentos que usan varios cebadores específicos para *mecC*-SARM en comparación con un cebador (RE2) específico para SARM que contiene *mecA*.

La FIGURA 2 muestra las curvas de crecimiento de la PCR de experimentos que usan tres cebadores diferentes específicos para *mecC*-SARM. Dos cebadores (AHREMECC01 y AHREMECC03) muestran un rendimiento de curva de crecimiento similar con respecto a la fluorescencia y el valor de inflexión. El tercer cebador (AHREMECC02) tenía una fluorescencia reducida y valores de inflexión retardados.

La FIGURA 3 muestra las curvas de crecimiento de la PCR de experimentos que usan varios cebadores específicos para *mecC*-SARM, todos con un rendimiento de la curva de crecimiento similar.

La FIGURA 4 muestra un diagrama esquemático de la tipificación de SARM basada en la tipificación de RE (extremidad derecha de *mecSCC*).

Descripción detallada de la invención

El diagnóstico de una infección por *mecC*-SARM mediante amplificación de ácido nucleico proporciona un procedimiento para detectar con rapidez y precisión la infección bacteriana. Se describe un ensayo ultrarrápido para detectar *mecC*-SARM en una muestra en el presente documento. Se proporcionan cebadores y sondas para detectar *mecC*-SARM, así como artículos de fabricación o kits que contienen dichos cebadores y sondas. La mayor sensibilidad de la PCR en tiempo real para la detección de *mecC*-SARM en comparación con otros procedimientos, así como las características mejoradas de la PCR en tiempo real, incluyendo la contención de la muestra y la detección en tiempo real del producto amplificado, hacen factible la implementación de esta tecnología para el diagnóstico de rutina de infecciones por *mecC*-SARM en el laboratorio clínico.

Similar a *mecA*, el gen homólogo de resistencia a la meticilina, *mecC*, codifica una proteína de unión a la penicilina resistente a la meticilina alterada (PBP2a o PBP2'), una proteína de unión a la penicilina con afinidad reducida por anillos β -lactámicos (el sitio activo primario de los antibióticos β -lactámicos tales como penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos) (Guignard *et al.*, 2005, Curr Opin Pharmacol 5 (5): 479-89), que no está presente en cepas susceptibles y se cree que se han adquirido de una especie distantemente relacionada. *MecC* se porta sobre un elemento genético móvil, el casete cromosómico estafilocócico *mec* (*SCCmec*) de cepas de SARM. Los elementos SCC también se producen en *S. aureus* sensible pero no portan el gen *mecC* o portan un gen *mecC* no funcional. Dichas cepas pueden ser una fuente de resultados positivos falsos, porque pueden tener el mismo punto de unión de la extremidad derecha.

Sin embargo, la detección de SARM de la muestra nasal mediante la detección del gen *mecC* y un gen específico de *S. aureus* da lugar a valores predictivos positivos bajos (VPP) debido a la presencia de cantidades variables tanto de *S. aureus* no resistente como de Estafilococos negativos para la coagulasa resistente a la meticilina (MRCoNS). Una combinación de estos no se puede distinguir de SARM, debido a la presencia de ambas dianas. Dependiendo de la prevalencia de SARM, esta situación lleva hasta un 30 % de resultados positivos falsos. Para un mejor VPP, la diana elegida debe ser única para SARM. La única diana actualmente conocida es el casete cromosómico estafilocócico (*SCCmec*), que amplifica el sitio de integración del transposón para el elemento genético que porta el gen *mecC*.

SCCmec, el elemento SCC de SARM (con el gen funcional *mecC*), es un transposón de longitud altamente variable (16 kb-67 kb) integrado en la parte 3' del marco de lectura abierto X de *S. aureus* (*orfX*) que contiene el gen *mecC*. *OrfX* no tiene una función definida en *S. aureus* y es exclusivo de *S. aureus*. La integración de *SCCmec* crea una firma única para SARM.

Los elementos *mecSCC* tienen dos componentes esenciales; el complejo génico *ccr* (*ccr*) y el complejo génico *mec* (*mec*). El complejo génico *ccr* está compuesto por genes *ccr* y marcos de lectura abiertos (ORF) circundantes, y el complejo génico *mec* está compuesto por el gen *mecC*, los genes reguladores y las secuencias de inserción en dirección 5' o en dirección 3' de *mecC*.

La clasificación de SARM se puede basar en diferentes genotipos de SARM. Una diana para la detección de SARM y la clasificación basada en genotipos puede ser el punto de unión de la extremidad derecha (RE) del *mecSCC*. Este procedimiento de tipificación de SARM se denomina por lo tanto tipificación RE (extremidad derecha de *mecSCC*). Este procedimiento de tipificación aprovecha el polimorfismo en la extremidad derecha de los ADN de *SCCmec* adyacentes al sitio de integración entre los diferentes tipos de *SCCmec*.

La detección de *S. aureus* que contiene *mecC* (*mecC*-SARM) utiliza una estrategia para producir un amplicón en el punto de unión de RE entre el gen *orfX* de *S. aureus* y *SCCmec* que porta el gen *mecC* que confiere resistencia a la meticilina. Para lograr esto, un cebador está anclado en una región altamente conservada del gen *orfX* de *S. aureus* (cebador para *orfX*), y un segundo cebador está ubicado dentro del punto de unión de RE no conservado de *SCCmec* (cebador para RE o cebador para *mecC*-SARM). El amplicón resultante de los dos cebadores abarca parte del gen *orfX* y parte de *SCCmec*. Debido a la naturaleza no homóloga de *SCCmec* en el punto de unión de RE, son necesarios varios cebadores para RE diferentes para lograr la mayor cobertura de cepas únicas de SARM que portan genes *mecC*. En la presente divulgación, se determinó la secuencia específica de la región de RE de SARM que porta *mecC* para 14 cepas únicas de *mecC*, y se diseñaron

cebadores para RE a partir de esas secuencias para la detección inclusiva de cepas de SARM que portan *mecC*. Para detectar los amplicones resultantes, se pueden utilizar una o más sondas para *mecC*-SARM detectables en donde las sondas para *mecC*-SARM incluyen una secuencia que se puede hibridar parcial o totalmente con una parte del amplicón en una localización que contiene la región altamente conservada del gen *orfX*. Los cebadores se pueden usar en un kit para la detección de *mecC*-SARM, que también puede incluir un múltiplex para la detección inclusiva de SARM que porta genes *mecA* o *mecC*.

Los procedimientos divulgados pueden incluir realizar al menos una etapa de ciclado que incluya amplificar una o más partes de la diana génica de la molécula de ácido nucleico de *mecC*-SARM de una muestra usando uno o más pares de cebadores para *mecC*-SARM. "Cebadores para *mecC*-SARM", como se usa en el presente documento, se refiere a cebadores oligonucleotídicos que se acoplan específicamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica *mecC* en SARM en el punto de unión de RE no conservado de *SCCmec*, e inician la síntesis de ADN a partir de ahí en las condiciones apropiadas. Cada uno de los cebadores para *mecC*-SARM analizados se acopla a una diana dentro de o adyacente a la diana génica de la molécula de ácido nucleico de *mecC*-SARM respectiva, de modo que al menos una parte de cada producto de amplificación contiene una secuencia de ácido nucleico correspondiente a la diana. El uno o más productos de amplificación de *mecC* se producen siempre que uno o más del ácido nucleico de *mecC* esté presente en la muestra, por tanto la presencia del uno o más de productos de amplificación de *mecC* es indicativo de la presencia de *mecC*-SARM en la muestra. El producto de amplificación debe contener las secuencias de ácido nucleico que son complementarias a una o más sondas detectables para *mecC*-SARM. Cada etapa de ciclado incluye una etapa de amplificación, una etapa de hibridación y una etapa de detección, en la que la muestra se pone en contacto con una o más sondas detectables para *mecC*-SARM para la detección de la presencia o ausencia de *mecC*-SARM en la muestra.

Como se usa en el presente documento, el término "amplificación" se refiere al procedimiento de sintetizar moléculas de ácido nucleico que son complementarias a una o ambas cadenas de una molécula de ácido nucleico molde (por ejemplo, *mecC*). La amplificación de una molécula de ácido nucleico incluye típicamente desnaturalizar el ácido nucleico molde, aparear cebadores con el ácido nucleico molde a una temperatura que está por debajo de las temperaturas de fusión de los cebadores, y alargar enzimáticamente a partir de los cebadores para generar un producto de amplificación. La amplificación requiere típicamente la presencia de desoxirribonucleósidos trifosfato, una enzima ADN polimerasa (por ejemplo, Taq Platinum®) y un tampón apropiado y/o cofactores para la actividad óptima de la enzima polimerasa (por ejemplo, MgCl₂ y/o KCl).

El término "cebador" se usa en el presente documento como se conoce por los expertos en la técnica y se refiere a compuestos oligoméricos, principalmente a oligonucleótidos, pero también a oligonucleótidos modificados que pueden "cebar" la síntesis de ADN mediante una ADN polimerasa dependiente de molde, es decir, el extremo 3', por ejemplo, del oligonucleótido proporciona un grupo 3'-OH libre al que se pueden unir "nucleótidos" adicionales mediante una ADN polimerasa dependiente de molde que establece un enlace fosfodiéster 3' a 5' usando desoxinucleósidos trifosfato y liberando pirofosfato. Por lo tanto, no existe una diferencia fundamental entre un "cebador", un "oligonucleótido" o una "sonda", excepto posiblemente para la función deseada.

El término "hibridación" se refiere al apareamiento de una o más sondas con un producto de amplificación. Las condiciones de hibridación incluyen típicamente una temperatura que está por debajo de la temperatura de fusión de las sondas, pero que evita la hibridación inespecífica de las sondas.

El término "actividad nucleasa en dirección 5' a 3'" se refiere a una actividad de una ácido nucleico polimerasa, típicamente asociada a la síntesis de la hebra de ácido nucleico, por la que los nucleótidos se eliminan del extremo 5' de la hebra de ácido nucleico.

El término "polimerasa termoestable" se refiere a una enzima polimerasa que es termoestable, es decir, la enzima cataliza la formación de productos de extensión de cebador complementarios a un molde y no se desnaturaliza irreversiblemente cuando se somete a las temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para efectuar la desnaturalización de ácidos nucleicos molde bicatenarios. En general, la síntesis se inicia en el extremo 3' de cada cebador y continúa en la dirección de 5' a 3' a lo largo de la hebra molde. Las polimerasas termoestables se han aislado a partir de *Thermus flavus*, *T. ruber*, *T. thermophilus*, *T. aquaticus*, *T. lacteus*, *T. rubens*, *Bacillus stearothermophilus* y *Methanothermus fervidus*. Sin embargo, las polimerasas que no son termoestables también se pueden emplear en ensayos de PCR siempre que se reponga la enzima.

El término "complemento del mismo" se refiere a un ácido nucleico que tiene la misma longitud y es exactamente complementario a un ácido nucleico dado.

El término "extensión" o "alargamiento", cuando se usa con respecto a ácidos nucleicos, se refiere a cuando se incorporan nucleótidos adicionales (u otras moléculas análogas) en los ácidos nucleicos. Por ejemplo, un ácido nucleico se extiende opcionalmente por un biocatalizador que incorpora nucleótidos, tal como una polimerasa que añade típicamente nucleótidos en el extremo terminal 3' de un ácido nucleico.

Los términos "idéntico" o "identidad» en porcentaje en el contexto de dos o más secuencias de ácido nucleico, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, por ejemplo, medida usando uno de los algoritmos de comparación de secuencias disponibles para los expertos o mediante inspección visual. Los algoritmos modo de ejemplo que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los programas BLAST, que se describen en, por ejemplo, Altschul *et al.* (1990) "Basic local alignment search tool", *J. Mol. Biol.* 215:403-410, Gish *et al.* (1993) "Identification of protein coding regions by database similarity search", *Nature Genet.* 3:266-272, Madden *et al.* (1996) "Applications of network BLAST server", *Meth. Enzymol.* 266:131-141, Altschul *et al.* (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, y Zhang *et al.* (1997) "PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation", *Genome Res.* 7:649-656.

Un "nucleótido modificado", en el contexto de un oligonucleótido, se refiere a una alteración en la que al menos un nucleótido de la secuencia oligonucleotídica se reemplaza por un nucleótido diferente que proporciona una propiedad deseada al oligonucleótido. Los nucleótidos modificados a modo de ejemplo que se pueden sustituir en los oligonucleótidos descritos en el presente documento incluyen, por ejemplo, una C5-metil-dC, una C5-etil-dC, un C5-metil-dU, un C5-etil-dU, una 2,6-diaminopurina, una C5-propinil-dC, un C5-propinil-dU, una C7-propinil-dA, una C7-propinil-dG, una C5-propargilamino-dC, un C5-propargilamino-dU, una C7-propargilamino-dA, una C7-propargilamino-dG, una 7-desaza-2-desoxixantósina, un análogo de pirazolopirimidina, un pseudo-dU, un nitropirrol, un nitroindol, 2'-0-metil-ribo-U, 2'-0-metil-ribo-C, una N4-etil-dC, una N6-metil-dA y similares. Muchos otros nucleótidos modificados que se pueden estar sustituidos en los oligonucleótidos se mencionan en este documento o se conocen de otro modo en la técnica. En determinados ejemplos, las sustituciones de nucleótidos modificados modifican las temperaturas de fusión (T_m) de los oligonucleótidos con relación a las temperaturas de fusión de los oligonucleótidos no modificados correspondientes. Para ilustrar adicionalmente, determinadas sustituciones de nucleótidos modificados pueden reducir la amplificación de ácido nucleico inespecífica (por ejemplo, minimizar la formación de dímeros de cebadores o similares), aumentar el rendimiento de un amplicón diana deseado y/o similares en algunos ejemplos. Los ejemplos de estos tipos de modificaciones de ácido nucleico se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 6.001.611.

***Staphylococcus aureus* que contiene *mecC* (*mecC*-SARM)**

La presente divulgación proporciona procedimientos para detectar *mecC*-SARM amplificando, por ejemplo, una parte de la secuencia de ácido nucleico de *mecC*. Las secuencias de ácido nucleico de SCC*mec* de varios subtipos de *mecC*-SARM están disponibles (por ejemplo, n.º de acceso GenBank FR823292). Específicamente, los cebadores y las sondas para amplificar y detectar dianas de moléculas de ácido nucleico de *mecC*-SARM se proporcionan por los modos de realización en la presente divulgación.

Para la detección de *mecC*-SARM, se proporcionan cebadores y sondas para amplificar los puntos de unión de RE de *mecC*-SARM. Los ácidos nucleicos de *mecC*-SARM distintos de los ejemplificados en el presente documento también se pueden usar para detectar *mecC*-SARM en una muestra. Por ejemplo, los expertos en la técnica pueden evaluar la especificidad y/o sensibilidad de variantes funcionales usando procedimientos de rutina. Las variantes funcionales representativas pueden incluir, por ejemplo, una o más delecciones, inserciones y/o sustituciones en los ácidos nucleicos de *mecC*-SARM divulgados en el presente documento.

Más específicamente, los oligonucleótidos de la divulgación incluyen, cada uno, un ácido nucleico con una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, una variante sustancialmente idéntica de la misma en la que la variante tiene al menos, por ejemplo, un 80 %, 90 % o 95 % de identidad de secuencia con una de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, o un complemento de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 y la variante.

TABLA I: Cebadores para *mecC*-SARM y sonda

SEQ NO	ID	SECUENCIA
1	Cebador para <i>mecC</i> -SARM	5'-TCTTACTATCAAAAAGATTGATAACTCTCGC-3'
2	Cebador para <i>mecC</i> -SARM	5'-CTCTTTTAGTTTCTATGTACTTTCTTACTATCAA-3'
3	Cebador para <i>mecC</i> -SARM	5'-GAATATCAAGTAACATCTCAGCAATGATAC-3'
4	Cebador para <i>mecC</i> -SARM	5'-ATCTGTATAAAATAGATTAGTCCTTTATTGCGTA-3'
5	Cebador para <i>mecC</i> -SARM	5'-TAGTAAGTGAGGTTGCTGAAATTGTACTA-3'
6	Cebador para <i>mecC</i> -SARM	5'-CAATTCTCATAAACCTCATACGTAAAGA-3'
7	Cebador para <i>mecC</i> -SARM	5'-ACGGCAATTCTCATAAACCTCA-3'
8	Cebador para <i>mecC</i> -SARM	5'-ACTCTCGCAAACATAACGGC-3'
9	Cebador para <i>orfX</i>	5'-GAAATACAAGGAAAGATGCTATCTTCC-3'
10	Sonda para <i>mecC</i> -SARM (<i>orfX</i>)	5'-TTGAACCAACGCATGACCCAAGGGC-3'

TABLA II: AMPLICONES

5

SEQ NO	ID	SECUENCIA
11		5'-GAAATACAAGGAAAGATGCTATCTTCCGAAGGATTGGCCCAAGAATTGAAC CAACGCATGACCCAAGGGCAAAGCGACTTTGTATTCGTCATTGGCGGATCAAAT GGCCTGCACAAGGACGTCTTACAACGCAGTAACTACGCACTATCATTCAGCAAA ATGACATTTCCACATCAAATGATGCGGGTTGTGTTAATTGAGCAAGTGTATAGA GCGTTTAAGATTATGCGCGGAGAAGCGTATCACAAATGATGCGGTTTTTTTAAC CTCTTTACGTATGAGGTTTATGAGAATTGCCGTTATGTTTTGCGAGAGTTATCA ATCTTTTTGATAGTAAGA-3'
12		5'-GAAATACAAGGAAAGATGCTATCTTCCGAAGGATTGGCCCAAGAATTGAAC CAACGCATGACCCAAGGGCAAAGCGACTTTGTATTCGTCATTGGCGGATCAAAT GGCCTGCACAAGGACGTCTTACAACGCAGTAACTACGCACTATCATTCAGCAAA ATGACATTTCCACATCAAATGATGCGGGTTGTGTTAATTGAGCAAGTGTATAGA GCGTTTAAGATTATGCGCGGAGAAGCGTATCACAAATGATGCGGTTTTTTTAAC CTCTTTACGTATGAGGTTTATGAGAATTGCCGTTATGTTTTGCGAGAGTTATCAA TCTTTTTGATAGTAAGAAAGTACATAGAAACTAAAAGAG-3'

ES 2 729 304 T3

13	<p>5'-GAAATACAAGGAAAGATGCTATCTTCCGAAGGATTGGCCCAAGAATTGAAC CAACGCATGACCCAAGGGCAAAGCGACTTTGTATTCGTCATTGGCGGATCAAAT GGCCTGCACAAGGACGTCTTACAACGCAGTAACTACGCACTATCATTCAGCAAA ATGACATTTCCACATCAAATGATGCGGGTTGTGTTAATTGAGCAAGTGTATAGA GCGTTTAAGATTATGCGCGGAGAAGCGTATCACAAATGATGCGGTTTTTTTAAAC CTCTTTACGTATGAGGTTTATGAGAATTGCCGTTATGTTTTGCGAGAGTTATCAA TCTTTTTGATAGTAAGAAAGTACATAGAACTAAAAGAGTATTTTTATCTACAA TAGCATTATAATTTATTCTATTATTGTATACTTTATTTTAATTATTAGTATCATT GCTGAGATGTTACTTGATATTC-3'</p>
14	<p>5'-GAAATACAAGGAAAGATGCTATCTTCCGAAGGATTGGCCCAAGAATTGAAC CAACGCATGACCCAAGGGCAAAGCGACTTTGTATTCGTCATTGGCGGATCAAAT GGCCTGCACAAGGACGTCTTACAACGCAGTAACTACGCACTATCATTCAGCAAA ATGACATTTCCACATCAAATGATGCGGGTTGTGTTAATTGAGCAAGTGTATAGA GCGTTTAAGATTATGCGCGGAGAAGCGTATCACAAATGATGCGGTTTTTTTAAAC CTCTTTACGTATGAGGTTTATGAGAATTGCCGTTATGTTTTGCGAGAGTTATCAA TCTTTTTGATAGTAAGAAAGTACATAGAACTAAAAGAGTATTTTTATCTACAA TAGCATTATAATTTATTCTATTATTGTATACTTTATTTTAATTATTAGTATCATT GCTGAGATGTTACTTGATATTCTATGTCTATTTTTTAGGAAATTCTATACTATTA AAATTATGGTATTTTATACGCAATAAAGGACTAATCTATTTTATACAGAT-3'</p>
15	<p>5'-GAAATACAAGGAAAGATGCTATCTTCCGAAGGATTGGCCCAAGAATTGAAC CAACGCATGACCCAAGGGCAAAGCGACTTTGTATTCGTCATTGGCGGATCAAAT GGCCTGCACAAGGACGTCTTACAACGCAGTAACTACGCACTATCATTCAGCAAA ATGACATTTCCACATCAAATGATGCGGGTTGTGTTAATTGAGCAAGTGTATAGA GCGTTTAAGATTATGCGCGGAGAAGCGTATCACAAATGATGCGGTTTTTTTAAAC CTCTTTACGTATGAGGTTTATGAGAATTGCCGTTATGTTTTGCGAGAGTTATCAA TCTTTTTGATAGTAAGAAAGTACATAGAACTAAAAGAGTATTTTTATCTACAA TAGCATTATAATTTATTCTATTATTGTATACTTTATTTTAATTATTAGTATCATT GCTGAGATGTTACTTGATATTCTATGTCTATTTTTTAGGAAATTCTATACTATTA AAATTATGGTATTTTATACGCAATAAAGGACTAATCTATTTTATACAGATTAGTC CTTTATTGTAGTCTTTAAAACTAGTFACTCATTAAATTTTTTAGTACAATTC AGCAACCTCACTTACTA-3'</p>

16	<p>5'-GAAATACAAGGAAAGATGCTATCTTCCGAAGGATTGGCCCAAGAATTGAAC CAACGCATGACCCAAGGGCAAAGCGACTTTGTATTCGTCATTGGCGGATCAAAT GGCTGCACAAGGACGTCTTACAACGCAGTAACTACGCACTATCATTCAGCAAAA ATGACATTTCCACATCAAATGATGCGGGTTGTGTTAATTGAGCAAGTGTATAGA GCGTTTAAGATTATGCGCGGAGAAGCGTATCACAAATGATGCGGTTTTTTTAAAC CTCTTTACGTATGAGGTTTATGAGAATTG-3'</p>
17	<p>5'-GAAATACAAGGAAAGATGCTATCTTCCGAAGGATTGGCCCAAGAATTGAAC CAACGCATGACCCAAGGGCAAAGCGACTTTGTATTCGTCATTGGCGGATCAAAT GGCTGCACAAGGACGTCTTACAACGCAGTAACTACGCACTATCATTCAGCAAAA ATGACATTTCCACATCAAATGATGCGGGTTGTGTTAATTGAGCAAGTGTATAGA GCGTTTAAGATTATGCGCGGAGAAGCGTATCACAAATGATGCGGTTTTTTTAAAC CTCTTTACGTATGAGGTTTATGAGAATTGCCGT-3'</p>
18	<p>5'-GAAATACAAGGAAAGATGCTATCTTCCGAAGGATTGGCCCAAGAATTGAAC CAACGCATGACCCAAGGGCAAAGCGACTTTGTATTCGTCATTGGCGGATCAAAT GGCTGCACAAGGACGTCTTACAACGCAGTAACTACGCACTATCATTCAGCAAAA ATGACATTTCCACATCAAATGATGCGGGTTGTGTTAATTGAGCAAGTGTATAGA GCGTTTAAGATTATGCGCGGAGAAGCGTATCACAAATGATGCGGTTTTTTTAAAC CTCTTTACGTATGAGGTTTATGAGAATTGCCGTTATGTTTTGCGAGAGT-3'</p>

En un ejemplo, los conjuntos de cebadores y sondas para *mecC*-SARM descritos anteriormente se usan para proporcionar la detección de *mecC*-SARM en una muestra biológica, de la que se sospecha que contiene *mecC*-SARM. Los conjuntos de cebadores y sondas pueden comprender o consistir en los cebadores y las sondas específicos para las secuencias de ácido nucleico del punto de unión de RE de *mecC*-SARM, que comprenden o consisten en las secuencias de ácido nucleico de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. En otro ejemplo, los cebadores y las sondas para las dianas de *mecC*-SARM comprenden o consisten en una variante funcionalmente activa de cualquiera de los cebadores y sondas de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

- 5
- 10 Una variante funcionalmente activa de cualquiera de los cebadores y/o sondas de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 se puede identificar usando los cebadores y/o sondas en los procedimientos divulgados. Una variante funcionalmente activa de un cebador y/o sonda de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 se refiere a un cebador y/o sonda que proporciona una especificidad y sensibilidad similar o superior en el procedimiento o kit descrito en comparación con la secuencia de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 respectiva.
- 15

La variante puede variar, por ejemplo, de la secuencia de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 en una o más adiciones, deleciones o sustituciones de nucleótidos, tal como una o más adiciones, deleciones o sustituciones de nucleótidos en el extremo 5' y/o en el extremo 3' de la secuencia de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 respectiva. Como se detalla anteriormente, un cebador (y/o sonda) se puede modificar químicamente, es decir, un cebador y/o una sonda pueden comprender un compuesto nucleotídico o no nucleotídico modificado. Una sonda (o un cebador) es entonces un oligonucleótido modificado. Los "nucleótidos modificados" (o "análogos nucleotídicos") difieren de un "nucleótido" natural en alguna modificación, pero consisten todavía en una base o un compuesto de tipo base, un azúcar pentofuranosilo o un compuesto de tipo azúcar pentofuranosilo, una parte de fosfato o una parte de tipo fosfato, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, un "marcador" se puede unir a la parte de base de un "nucleótido", por lo que se obtiene un "nucleótido modificado". Una base natural en un "nucleótido" también se puede reemplazar por, por ejemplo, una 7-desazapurina, por lo que también se obtiene un "nucleótido modificado". Los términos "nucleótido modificado" o "análogo nucleotídico" se usan de manera intercambiable en la presente solicitud. Un "nucleósido modificado" (o "análogo nucleosídico") difiere de un nucleósido natural en alguna modificación de la manera señalada anteriormente para un "nucleótido modificado" (o un "análogo nucleotídico").

20

25

30

Los oligonucleótidos, incluyendo los oligonucleótidos modificados y los análogos de oligonucleótidos que amplifican una molécula de ácido nucleico que codifica las secuencias de ácido nucleico del punto de unión de

RE de *mecC*-SARM, por ejemplo, los ácidos nucleicos que codifican partes alternativas de puntos de unión de RE de *mecC*-SARM pueden diseñarse usando, por ejemplo, un programa de ordenador como OLIGO (Molecular Biology Insights Inc., Cascade, Colo.). Las características importantes cuando se diseñan oligonucleótidos que se van a usar como cebadores de amplificación incluyen, pero no se limitan a, un producto de amplificación de tamaño apropiado para facilitar la detección (por ejemplo, mediante electroforesis), temperaturas de fusión similares para los miembros de un par de cebadores, y la longitud de cada cebador (es decir, los cebadores deben ser lo suficientemente largos para aparearse con especificidad de secuencia y para iniciar la síntesis, pero no tan largos que se reduzca la fidelidad durante la síntesis de oligonucleótidos). Típicamente, los cebadores oligonucleotídicos tienen una longitud de 8 a 50, en particular de 10 a 40 o de 12 a 40 nucleótidos (por ejemplo, una longitud de 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 o 50 nucleótidos).

Además de un conjunto de cebadores, los procedimientos pueden usar una o más sondas para detectar la presencia o ausencia de *mecC*-SARM. El término "sonda" se refiere a ácidos nucleicos (ADN o ARN) producidos sintéticamente o biológicamente, que por diseño o selección contienen secuencias de nucleótidos específicas que les permiten hibridar en rigurosidades predeterminadas definidas específicamente (es decir, preferentemente) con "ácidos nucleicos diana", en el presente caso con un ácido nucleico (diana) de *mecC*-SARM. Una "sonda" se puede denominar "sonda de detección", que significa que detecta el ácido nucleico diana.

En algunos modos de realización, las sondas para *mecC*-SARM descritas pueden marcarse con al menos un marcador fluorescente. En una realización, las sondas para *mecC*-SARM pueden marcarse con un resto fluorescente donador, por ejemplo, un tinte fluorescente, y un resto fluorescente aceptador correspondiente, por ejemplo, un extintor. En una realización, la sonda comprende o consiste en un resto fluorescente y las secuencias de ácido nucleico comprenden o consisten en la SEQ ID NO: 10 (mostrada sin el marcador).

El diseño de oligonucleótidos a usar como sondas se puede realizar de manera similar al diseño de cebadores. Los modos de realización pueden usar una única sonda o un par de sondas para la detección del producto de amplificación. Dependiendo del modo de realización, el uso de la(s) sonda(s) puede comprender al menos un marcador y/o al menos un resto extintor. Al igual que con los cebadores, las sondas normalmente tienen temperaturas de fusión similares, y la longitud de cada sonda debe ser suficiente para que se dé la hibridación específica de secuencia, pero no tan larga como para que se reduzca la fidelidad durante la síntesis. Las sondas oligonucleotídicas en general tienen 40 nucleótidos o menos y en particular tienen una longitud de 12 a 40, 15 a 40 y 15 a 30 (por ejemplo, 16, 18, 20, 21, 22, 23, 24 o 25) nucleótidos.

Las construcciones pueden incluir vectores, cada uno de los cuales contiene uno de los cebadores para el punto de unión de RE de *mecC*-SARM y sondas de moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10). Las construcciones se pueden usar, por ejemplo, como moléculas de ácido nucleico de molde de control. Los vectores adecuados para su uso están disponibles comercialmente y/o se producen mediante procedimientos de tecnología de ácido nucleico recombinante de rutina en la técnica. Las moléculas de ácido nucleico de *mecC*-SARM pueden obtenerse, por ejemplo, mediante síntesis química, clonación directa a partir de *mecC*-SARM o mediante amplificación por PCR.

Las construcciones adecuadas para su uso en los procedimientos típicamente incluyen, además de las moléculas de ácido nucleico de *mecC*-SARM (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que contiene una o más secuencias de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10), secuencias que codifican un marcador seleccionable (por ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos) para seleccionar constructos y/o transformantes deseados, y un origen de replicación. La elección de los sistemas de vectores habitualmente depende de varios factores, que incluyen, pero sin limitación, la elección de las células huésped, la eficacia de la replicación, la capacidad de selección, la capacidad de inducción y la facilidad de recuperación.

Las construcciones que contienen moléculas de ácido nucleico de *mecC*-SARM pueden propagarse en una célula huésped. Como se usa en el presente documento, el término célula huésped pretende incluir procariontes y eucariotas tales como células de levaduras, de plantas y de animales. Los huéspedes procariontes pueden incluir *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* y *Bacillus subtilis*. Los huéspedes eucariotas incluyen levaduras tales como *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Pichia pastoris*, células de mamífero tales como células COS o células de ovario de hámster chino (CHO), células de insecto y células de plantas tales como *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum*. Se puede introducir una construcción en una célula huésped usando cualquiera de las técnicas comúnmente conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la precipitación con fosfato de calcio, la electroporación, el choque térmico, la lipofección, la microinyección y la transferencia de ácidos nucleicos mediada por virus son procedimientos comunes para introducir ácidos nucleicos en células huésped. Además, se puede administrar ADN desnudo directamente a las células (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.580.859 y 5.589.466).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las patentes de los EE. UU. n.º 4.683.202, 4.683.195, 4.800.159 y 4.965.188 divulgan técnicas de PCR convencionales. La PCR emplea típicamente dos cebadores oligonucleotídicos que se unen a un molde de ácido

nucleico seleccionado (por ejemplo, ADN o ARN). Los cebadores útiles en algunos modos de realización incluyen oligonucleótidos que pueden actuar como puntos de iniciación de la síntesis de ácido nucleico dentro de las secuencias de ácido nucleico de *mecC*-SARM descritas (por ejemplo, las SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7, 8 y 9). Un cebador se puede purificar a partir de un hidrolizado de restricción mediante procedimientos convencionales, o se puede producir sintéticamente. El cebador es preferentemente monocatenario para una máxima eficacia en la amplificación, pero el cebador puede ser bicatenario.

Los cebadores bicatenarios se desnaturalizan primero, es decir, se tratan para separar las hebras. Un procedimiento para desnaturalizar ácidos nucleicos bicatenarios es mediante calentamiento.

Si el ácido nucleico molde es bicatenario, es necesario separar las dos hebras antes de que se pueda usar como molde en la PCR. La separación de hebras se puede conseguir mediante cualquier procedimiento de desnaturalización adecuado incluyendo medios físicos, químicos o enzimáticos. Un procedimiento para separar las hebras de ácido nucleico implica calentar el ácido nucleico hasta que se desnaturaliza predominantemente (por ejemplo, se desnaturaliza más de un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 %). Las condiciones de calentamiento necesarias para desnaturalizar el ácido nucleico molde dependerán, por ejemplo, de la concentración de sal de tampón y de la longitud y composición de nucleótidos de los ácidos nucleicos que se van a desnaturalizar, pero típicamente varían de aproximadamente 90 °C a aproximadamente 105 °C durante un tiempo que depende de características de la reacción tales como la temperatura y la longitud del ácido nucleico. La desnaturalización se realiza típicamente durante aproximadamente 30 s a 4 min (por ejemplo, de 1 min a 2 min 30 s, o 1,5 min).

Si el ácido nucleico molde bicatenario se desnaturaliza con calor, la mezcla de reacción se deja enfriar hasta una temperatura que promueve el apareamiento de cada cebador con su secuencia diana en las moléculas de ácido nucleico de *mecC*-SARM descritas. La temperatura para el apareamiento es normalmente de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 65 °C (por ejemplo, de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 60 °C; de aproximadamente 45 °C a aproximadamente 50 °C). Los tiempos de apareamiento pueden ser de aproximadamente 10 s a aproximadamente 1 min (por ejemplo, de aproximadamente 20 s a aproximadamente 50 s; de aproximadamente 30 s a aproximadamente 40 s). La mezcla de reacción se ajusta entonces a una temperatura a la que se promueve u optimiza la actividad de la polimerasa, es decir, una temperatura suficiente para que se dé la extensión del cebador apareado para generar productos complementarios del ácido nucleico molde. La temperatura debe ser suficiente para sintetizar un producto de extensión a partir de cada cebador que se aparea con un molde de ácido nucleico, pero no debe ser tan alta como para desnaturalizar un producto de extensión de su molde complementario (por ejemplo, la temperatura para extensión varía en general de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 80 °C (por ejemplo, de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C; aproximadamente 60 °C). Los tiempos de extensión pueden ser de aproximadamente 10 s a aproximadamente 5 min (por ejemplo, de aproximadamente 30 s a aproximadamente 4 min; de aproximadamente 1 min a aproximadamente 3 min; de aproximadamente 1 min 30 s a aproximadamente 2 min).

Los ensayos de PCR pueden emplear el ácido nucleico de *mecC*-SARM, tal como el ARN o ADN (ADNc). El ácido nucleico molde no necesita ser purificado; puede ser una fracción menor de una mezcla compleja, tal como el ácido nucleico de *mecC*-SARM contenido en células humanas. Las moléculas de ácido nucleico de *mecC*-SARM se pueden extraer de una muestra biológica mediante técnicas de rutina como las que se describen en *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications* (Persing et al. (eds), 1993, American Society for Microbiology, Washington D.C.). Los ácidos nucleicos se pueden obtener a partir de muchísimas fuentes, tales como plásmidos, o fuentes naturales que incluyen bacterias, levaduras, virus, orgánulos u organismos superiores tales como plantas o animales.

Los cebadores oligonucleotídicos (por ejemplo, las SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7, 8 y 9) se combinan con reactivos de PCR en condiciones de reacción que inducen la extensión del cebador. Por ejemplo, las reacciones de extensión de cadena generalmente incluyen KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), MgCl₂ 15 mM, gelatina al 0,001 % (p/v), 0,5-1,0 µg de ADN molde desnaturalizado, 50 pmoles de cada cebador oligonucleotídico, 2,5 U de polimerasa Taq y DMSO al 10 %. Las reacciones contienen normalmente de 150 a 320 µM de cada uno de dATP, dCTP, dTTP, dGTP, o uno o más análogos de los mismos.

Las hebras recién sintetizadas forman una molécula bicatenaria que se puede usar en las sucesivas etapas de la reacción. Las etapas de separación, hibridación y alargamiento de la hebra se pueden repetir con tanta frecuencia como sea necesario para producir la cantidad deseada de productos de amplificación correspondientes a las moléculas de ácido nucleico de *mecC*-SARM diana. Los factores limitantes en la reacción son las cantidades de cebadores, de enzima termoestable y de nucleósidos trifosfato presentes en la reacción. Las etapas de ciclado (es decir, desnaturalización, apareamiento y extensión) se repiten preferentemente al menos una vez. Para el uso en la detección, el número de etapas de ciclado dependerá, por ejemplo, de la naturaleza de la muestra. Si la muestra es una mezcla compleja de ácidos nucleicos, se requerirán más etapas de ciclado para amplificar la secuencia diana suficientemente para la detección. En general, las etapas de ciclado se repiten al menos aproximadamente 20 veces, pero se pueden repetir hasta 40, 60 o incluso 100 veces.

Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET)

La tecnología FRET (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 4.996.143, 5.565.322, 5.849.489 y 6.162.603) está basada en el concepto de que cuando un resto fluorescente donador y un resto fluorescente aceptador correspondiente están situados a una determinada distancia entre sí, tiene lugar la transferencia de energía entre los dos restos fluorescentes, que se puede visualizar o detectar y/o cuantificar de otro modo. El donador transfiere típicamente la energía al aceptador cuando se excita el donador por radiación lumínica con una longitud de onda adecuada. El aceptador reemite típicamente la energía transferida en forma de radiación lumínica con una longitud de onda diferente. En ciertos sistemas, la energía no fluorescente se puede transferir entre los restos donador y aceptador, por medio de biomoléculas que incluyen restos donantes sustancialmente no fluorescentes (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 7.741.467).

En un ejemplo, una sonda oligonucleotídica puede contener un resto fluorescente donador y un extintor correspondiente, que puede ser fluorescente o no, y que disipa la energía transferida en una forma diferente a la luz. Cuando la sonda está intacta, la transferencia de energía se da típicamente entre los dos restos fluorescentes, de manera que la emisión fluorescente desde el resto fluorescente donador se extingue. Durante una etapa de extensión de una reacción en cadena de la polimerasa, se escinde una sonda unida a un producto de amplificación mediante la actividad nucleasa en dirección 5' a 3' de, por ejemplo, una polimerasa Taq de manera que la emisión fluorescente del resto fluorescente donador ya no se extingue. Las sondas a modo de ejemplo para este fin se describen, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 5.210.015, 5.994.056 y 6.171.785. Los pares donador-aceptador usados comúnmente incluyen el par FAM-TAMRA. Los extintores usados comúnmente son DABCYL y TAMRA. Los extintores oscuros usados comúnmente incluyen BlackHole Quencher™ (BHQ), (Biosearch Technologies, Inc., Novato, Cal.), Iowa Black™ (Integrated DNA Tech., Inc., Coralville, Iowa), BlackBerry™ Quencher 650 (BBQ-650) (Berry & Assoc., Dexter, Mich.).

En otro ejemplo, dos sondas oligonucleotídicas, cada una de las cuales contiene un resto fluorescente, se pueden hibridar con un producto de amplificación en posiciones particulares determinadas por la complementariedad de las sondas oligonucleotídicas con la secuencia de ácido nucleico diana de *mecC*-SARM. Tras la hibridación de las sondas oligonucleotídicas con el ácido nucleico del producto de amplificación en las posiciones apropiadas, se genera una señal de FRET. Las temperaturas de hibridación pueden variar de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 65 °C durante de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 1 minuto.

El análisis fluorescente se puede llevar a cabo usando, por ejemplo, un sistema de microscopio epifluorescente de recuento de fotones (que contiene el espejo dicróico apropiado y filtros para controlar la emisión fluorescente en el intervalo particular), un sistema fotomultiplicador de recuento de fotones o un fluorímetro. La excitación para iniciar la transferencia de energía, o para permitir la detección directa de un fluoróforo, se puede llevar a cabo con un láser de iones de argón, una lámpara de arco de mercurio (Hg) de alta intensidad, una fuente de luz de fibra óptica u otra fuente de luz de alta intensidad filtrada apropiadamente para la excitación en el intervalo deseado.

Como se usa en el presente documento con respecto a los restos fluorescentes donantes y aceptadores correspondientes, "correspondiente" se refiere a un resto fluorescente aceptador que tiene un espectro de absorbanza que se superpone al espectro de emisión del resto fluorescente donador. El máximo de longitud de onda del espectro de emisión del resto fluorescente aceptador debe ser al menos 100 nm mayor que el máximo de longitud de onda del espectro de excitación del resto fluorescente donador. En consecuencia, se puede producir transferencia de energía no radiativa eficaz entre ellos.

Los restos fluorescentes donantes y aceptadores correspondientes se eligen en general para (a) transferencia de energía de Forster de alta eficacia; (b) un gran desplazamiento de Stokes final (>100 nm); (c) desplazamiento de la emisión lo más lejos posible hacia la parte roja del espectro visible (>600 nm); y (d) desplazamiento de la emisión a una longitud de onda más alta que la emisión fluorescente de agua Raman producida por excitación en la longitud de onda de excitación del donador. Por ejemplo, se puede elegir un resto fluorescente donador que tenga su máximo de excitación cerca de una línea de láser (por ejemplo, Helio-Cadmio 442 nm o Argón 488 nm), un alto coeficiente de extinción, un alto rendimiento cuántico y una buena superposición de su emisión fluorescente con el espectro de excitación del resto fluorescente aceptador correspondiente. Se puede elegir un resto fluorescente aceptador correspondiente que tenga un alto coeficiente de extinción, un alto rendimiento cuántico, una buena superposición de su excitación con la emisión del resto fluorescente donador, y emisión en la parte roja del espectro visible (>600 nm).

Los restos fluorescentes donantes representativos que se pueden usar con diversos restos fluorescentes aceptadores en la tecnología FRET incluyen fluoresceína, amarillo Lucifer, B-ficoeritrina, isotiocianato de 9-acridina, amarillo Lucifer VS, ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatostilbena-2,2'-disulfónico, 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina, 1-pirenobutirato de succinimidilo y derivados del ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatostilbena-2,2'-disulfónico. Los restos fluorescentes aceptadores representativos, dependiendo del resto fluorescente donador usado, incluyen rojo LC 640, rojo LC 705, Cy5, Cy5,5, cloruro de sulfonilo de lisamina

rodamina B, isotiocianato de tetrametilrodamina, isotiocianato de rodamina x, isotiocianato de eritrosina, fluoresceína, pentaacetato de dietilentiaramina u otros quelatos de iones de lantánido (por ejemplo, europio o terbio). Se pueden obtener restos fluorescentes donantes y aceptadores, por ejemplo, de Molecular Probes (Junction City, Oreg.) o Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.).

Los restos fluorescentes donantes y aceptadores se pueden unir al oligonucleótido sonda apropiado a través de una sección conectora. La longitud de cada sección conectora es importante, ya que las secciones conectoras afectarán a la distancia entre los restos fluorescentes donantes y aceptadores. La longitud de una sección conectora puede ser la distancia en Angstroms (Å) desde la base de nucleótido hasta el resto fluorescente. En general, una sección conectora tiene de aproximadamente 10 Å a aproximadamente 25 Å. La sección conectora puede ser del tipo descrito en el documento WO 84/03285. El documento WO 84/03285 también divulga procedimientos para unir secciones conectoras a una base nucleotídica particular, y también para unir restos fluorescentes a una sección conectora.

Un resto fluorescente aceptador, como un LC Red 640, se puede combinar con un oligonucleótido que contiene un conector amino (por ejemplo, C6-aminofosforamiditas disponibles en ABI (Foster City, California) o Glen Research (Sterling, VA)) para producir, por ejemplo, oligonucleótido marcado con LC Red 640. Los conectores usados con frecuencia para acoplar un resto fluorescente donador, tal como fluoresceína, a un oligonucleótido incluyen conectores de tiourea (derivados de FITC, por ejemplo, fluoresceína-CPG de Glen Research o ChemGene (Ashland, Mass.)), conectores de amida (derivados de éster de NHS de fluoresceína, tal como CX-fluoresceína-CPG de BioGenex (San Ramon, Calif.)) o 3'-amino-CPG que requieren el acoplamiento de un éster de NHS de fluoresceína después de la síntesis de los oligonucleótidos.

Detección de *mecC*-SARM

La presente divulgación proporciona procedimientos para detectar la presencia o ausencia de *mecC*-SARM en una muestra biológica o no biológica. Los procedimientos proporcionados evitan problemas de contaminación de la muestra, falsos negativos y falsos positivos. Los procedimientos incluyen realizar al menos una etapa de ciclado que incluye amplificar una parte de moléculas de ácido nucleico diana de *mecC*-SARM de una muestra usando una pluralidad de pares de cebadores para *mecC*-SARM, y una etapa de detección de FRET. Se realizan múltiples etapas de ciclado, preferentemente en un termociclador. Se pueden realizar procedimientos usando los cebadores y sondas para *mecC*-SARM para detectar la presencia de *mecC*-SARM, y la detección de *mecC*-SARM indica la presencia de *mecC*-SARM en la muestra.

Como se describe en el presente documento, los productos de amplificación se pueden detectar usando sondas de hibridación marcadas que aprovechan la tecnología FRET. Un formato de FRET utiliza la tecnología TaqMan[®] para detectar la presencia o ausencia de un producto de amplificación, y por tanto, la presencia o ausencia de *mecC*-SARM. La tecnología TaqMan[®] utiliza una sonda monocatenaria de hibridación marcada con, por ejemplo, un tinte fluorescente y un extintor, que puede ser o no ser fluorescente. Cuando se excita un primer resto fluorescente con luz de una longitud de onda adecuada, la energía absorbida se transfiere a un segundo resto fluorescente de acuerdo con los principios de FRET. El segundo resto fluorescente es, en general, una molécula extintora. Durante la etapa de apareamiento de la reacción de PCR, la sonda de hibridación marcada se une al ADN diana (es decir, el producto de amplificación) y se degrada mediante la actividad nucleasa en dirección 5' a 3' de, por ejemplo, la polimerasa Taq durante la fase de alargamiento posterior. Como resultado, el resto fluorescente y el resto extintor se separan espacialmente entre sí. Como consecuencia, tras la excitación del primer resto fluorescente en ausencia del extintor, se puede detectar la emisión de fluorescencia del primer resto fluorescente. A modo de ejemplo, un sistema de detección de secuencias ABI PRISM[®] 7700 (Applied Biosystems) usa la tecnología TaqMan[®], y es adecuado para realizar los procedimientos descritos en el presente documento para detectar la presencia o ausencia de *mecC*-SARM en la muestra.

Las balizas moleculares junto con FRET también se pueden usar para detectar la presencia de un producto de amplificación usando los procedimientos de PCR ultrarrápida. La tecnología de baliza molecular usa una sonda de hibridación marcada con un primer resto fluorescente y un segundo resto fluorescente. El segundo resto fluorescente es, en general, un extintor, y los marcadores fluorescentes están situados típicamente en cada extremo de la sonda. La tecnología de baliza molecular usa un oligonucleótido sonda que tiene secuencias que permiten la formación de estructura secundaria (por ejemplo, una horquilla). Como resultado de la formación de estructura secundaria dentro de la sonda, ambos restos fluorescentes están en proximidad espacial cuando la sonda está en solución. Después de la hibridación con los ácidos nucleicos diana (es decir, productos de amplificación), la estructura secundaria de la sonda se altera y los restos fluorescentes se separan unos de otros de manera que, después de la excitación con luz de una longitud de onda adecuada, se puede detectar la emisión del primer resto fluorescente.

Otro formato común de la tecnología FRET utiliza dos sondas de hibridación. Cada sonda se puede marcar con un resto fluorescente diferente y, en general, se diseñan para hibridar en estrecha proximidad entre sí en una molécula de ADN diana (por ejemplo, un producto de amplificación). Un resto fluorescente donador, por ejemplo, fluoresceína, se excita a 470 nm por la fuente de luz del instrumento LightCycler[®]. Durante FRET, la fluoresceína

transfiere su energía a un resto fluorescente aceptador tal como LightCycler®-Red 640 (LC Red 640) o LightCycler®-Red 705 (LC Red 705). El resto fluorescente aceptador a continuación emite luz de una longitud de onda más larga, que se detecta por el sistema de detección óptico del instrumento LightCycler®. La FRET eficaz puede tener lugar únicamente cuando los restos fluorescentes están en proximidad local directa y cuando el espectro de emisión del resto fluorescente donador se superpone con el espectro de absorción del resto fluorescente aceptador. La intensidad de la señal emitida se puede correlacionar con el número de moléculas de ADN diana originales (por ejemplo, el número de genomas de *mecC-SARM*). Si se produce la amplificación del ácido nucleico diana de *mecC-SARM* y se produce un producto de amplificación, la etapa de hibridación da como resultado una señal detectable basada en FRET entre los miembros del par de sondas.

En general, la presencia de FRET indica la presencia de *mecC-SARM* en la muestra, y la ausencia de FRET indica la ausencia de *mecC-SARM* en la muestra. Sin embargo, la recogida inadecuada de muestras, los retrasos en el transporte, las condiciones de transporte inapropiadas o el uso de determinados hisopos de recogida (alginato de calcio o varilla de aluminio) son todas condiciones que pueden afectar al éxito y/o la exactitud del resultado de la prueba. Usando los procedimientos divulgados en el presente documento, la detección de FRET en, por ejemplo, 45 etapas de ciclado es indicativa de una infección por *mecC-SARM*.

Las muestras biológicas representativas que se pueden usar en la práctica de los procedimientos incluyen, pero no se limitan a hisopos dérmicos, hisopos nasales, hisopos de heridas, hemocultivos, piel e infecciones de tejidos blandos. Los procedimientos de recogida y almacenamiento de muestras biológicas se conocen por los expertos en la técnica. Las muestras biológicas se pueden procesar (por ejemplo, mediante procedimientos y/o kits de extracción de ácido nucleico conocidos en la técnica) para liberar el ácido nucleico de *mecC-SARM* o, en algunos casos, la muestra biológica se puede poner en contacto directamente con los componentes de reacción de PCR y los oligonucleótidos apropiados.

El análisis de la curva de fusión es una etapa adicional que se puede incluir en un perfil de ciclado. El análisis de la curva de fusión se basa en el hecho de que el ADN se funde a una temperatura característica llamada temperatura de fusión (T_m), que se define como la temperatura a la que la mitad de las dobles hebras de ADN se han separado en hebras individuales. La temperatura de fusión de un ADN depende principalmente de su composición de nucleótidos. Por tanto, las moléculas de ADN ricas en nucleótidos G y C tienen una T_m mayor que las que tienen una abundancia de nucleótidos A y T. Al detectar la temperatura a la que se pierde la señal, se puede determinar la temperatura de fusión de las sondas. De forma similar, detectando la temperatura a la que se genera la señal, se puede determinar la temperatura de apareamiento de las sondas. La(s) temperatura(s) de fusión de las sondas para *mecC-SARM* de los productos de amplificación de *mecC-SARM* puede(n) confirmar la presencia o ausencia de *mecC-SARM* en la muestra.

Dentro de cada serie del termociclador, también se pueden ciclar las muestras de control. Las muestras de control positivo pueden amplificar el molde de control de ácido nucleico diana (distinto de los productos de amplificación descritos de genes diana) usando, por ejemplo, cebadores de control y sondas de control. Las muestras de control positivo también pueden amplificar, por ejemplo, una construcción de plásmido que contiene las moléculas de ácido nucleico diana. Dicho control plasmídico se puede amplificar internamente (por ejemplo, dentro de la muestra) o en una muestra separada que se realiza paralelamente con las muestras del paciente usando los mismos cebadores y la misma sonda que los usados para la detección de la diana deseada. Dichos controles son indicadores del éxito o fracaso de la amplificación, hibridación y/o reacción de FRET. Cada serie del termociclador también puede incluir un control negativo que, por ejemplo, carece de ADN molde diana. El control negativo puede medir la contaminación. Esto garantiza que el sistema y los reactivos no den lugar a una señal positiva falsa. Por lo tanto, las reacciones de control pueden determinar fácilmente, por ejemplo, la capacidad de los cebadores de aparearse con especificidad de secuencia e iniciar el alargamiento, así como la capacidad de las sondas de hibridar con especificidad de secuencia y para que se dé FRET.

En un modo de realización, los procedimientos incluyen etapas para evitar la contaminación. Por ejemplo, se describe un procedimiento enzimático que utiliza uracil-ADN glucosilasa en las patentes de EE. UU. n.º 5.035.996, 5.683.896 y 5.945.313 para reducir o eliminar la contaminación entre una serie de procesamiento del termociclador y la siguiente.

Los procedimientos de PCR convencionales junto con la tecnología FRET se pueden usar para poner en práctica los procedimientos. En un modo de realización, se usa un instrumento LightCycler®. Las siguientes solicitudes de patente describen la PCR en tiempo real como se usa en la tecnología LightCycler®: WO 97/46707, WO 97/46714 y WO 97/46712.

El LightCycler® se puede hacer funcionar usando una estación de trabajo para PC y puede utilizar un sistema operativo Windows NT. Las señales de las muestras se obtienen a medida que la máquina sitúa los capilares secuencialmente sobre la unidad óptica. El programa informático puede exhibir las señales de fluorescencia en tiempo real inmediatamente después de cada medición. El tiempo de adquisición fluorescente es de 10-100 milisegundos (ms). Después de cada etapa de ciclado, se puede actualizar continuamente una exhibición

cuantitativa de la fluorescencia frente al número de ciclo para todas las muestras. Los datos generados se pueden almacenar para un análisis posterior.

5 Como alternativa a FRET, se puede detectar un producto de amplificación usando un tinte de unión a ADN bicatenario, tal como un tinte de unión a ADN fluorescente (por ejemplo, SYBR® Green o SYBR® Gold (Molecular Probes)). Tras la interacción con el ácido nucleico bicatenario, dichos tintes fluorescentes de unión a ADN emiten una señal fluorescente después de la excitación con luz a una longitud de onda adecuada. También se puede usar un tinte de unión a ADN bicatenario, tal como un tinte de intercalación de ácido nucleico. Cuando se usan tintes de unión a ADN bicatenario, habitualmente se realiza un análisis de curva de fusión para confirmar la presencia del producto de amplificación.

Se entiende que los modos de realización de la presente divulgación no están limitados por la configuración de uno o más instrumentos disponibles comercialmente.

15 Artículos de fabricación/kits

Los modos de realización de la presente divulgación proporcionan además artículos de fabricación o kits para detectar *mecC*-SARM. Un artículo de fabricación puede incluir cebadores y sondas usados para detectar *mecC*-SARM, conjuntamente con materiales de embalaje adecuados. Los cebadores y las sondas representativos para la detección de *mecC*-SARM pueden hibridar con las moléculas de ácido nucleico diana de *mecC*-SARM. Además, los kits también pueden incluir reactivos y materiales adecuadamente envasados necesarios para la inmovilización, hibridación y detección de ADN, tales como soportes sólidos, tampones, enzimas y patrones de ADN. Los procedimientos para diseñar cebadores y sondas se divulgan en el presente documento, y se proporcionan ejemplos representativos de cebadores y sondas que amplifican y se hibridan con moléculas de ácido nucleico diana de *mecC*-SARM.

Los artículos de fabricación también pueden incluir uno o más restos fluorescentes para marcar las sondas o, alternativamente, las sondas suministradas con el kit pueden estar marcadas. Por ejemplo, un artículo de fabricación puede incluir un resto fluorescente donador y/o aceptador para marcar las sondas para *mecC*-SARM. Anteriormente se proporcionan ejemplos de restos fluorescentes donantes de FRET adecuados y restos fluorescentes aceptadores correspondientes.

Los artículos de fabricación también pueden contener un prospecto o ficha técnica que tiene instrucciones para usar los cebadores para *mecC*-SARM y sondas para detectar *mecC*-SARM en una muestra. Los artículos de fabricación pueden incluir adicionalmente reactivos para llevar a cabo los procedimientos divulgados en el presente documento (por ejemplo, tampones, enzimas polimerasas, cofactores o agentes para prevenir la contaminación). Dichos reactivos pueden ser específicos para uno de los instrumentos disponibles comercialmente descritos en el presente documento.

Los modos de realización de la presente divulgación se describirán adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

EJEMPLOS

45 Se proporcionan los siguientes ejemplos y figuras para ayudar al entendimiento de la materia objeto, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo I

50 Dianas génicas de *mecC*-SARM

Con referencia a las figuras 1 a 3, los conjuntos de oligonucleótidos n.º 1-8 se evaluaron con la secuencia de referencia LGA251 n.º de acceso FR823292.

55 Conjunto de oligonucleótidos n.º 1 de *mecC*-SARM

Cebador en dirección 5': GAAATACAAGGAAAGATGCTATCTTCI (J=t-butilbencilo dC) (SEQ ID NO: 9)

60 Cebador en dirección 3': TCTTACTATCAAAAAGATTGATAACTCTCGI (J=t-butilbencilo dC) (SEQ ID NO: 1)

Sonda: ETTGAACQCAACGCATGACCCAAGGGCP (E=thHEX, Q=BHQ2, P=3' fosfato) (SEQ ID NO: 10)

Amplicón generado a partir del conjunto de oligonucleótidos n.º 1:

GAAATACAAGGAAAGATGCTATCTTCCGAAGGATTGGCCCAAGAATTGAACC
AACGCATGACCCAAGGGCAAAGCGACTTTGTATTCGTCATTGGCGGATCAAA
 TGGCCTGCACAAGGACGTCTTACAACGCAGTAACTACGCACTATCATT CAGC
 AAAATGACATTTCCACATCAAATGATGCGGGTTGTGTTAATTGAGCAAGTGT
 ATAGAGCGTTTAAGATTATGCGCGGAGAAGCGTATCACAAATGATGCGGTTT
 TTTTAACCTCTTTACGTATGAGGTTTATGAGAATTGCCGTTATGTTTTGCGAG
 5 AGTTATCAATCTTTTTGATAGTAAGA (SEQ ID NO: 11)

MecC-SARM conjunto de oligonucleótidos n.º 2:

10 Cebador en dirección 5': GAAATACAAGGAAAGATGCTATCTTCI (J=t-butilbencilo dC) (SEQ ID NO: 9)

Cebador en dirección 3': CTCTTTTAGTTTCTATGTACTTTCTTACTATCAI (J=t-butilbencilo dA) (SEQ ID NO: 2)

15 Sonda: ETTGAACQCAACGCATGACCCAAGGGCP (E=thHEX, Q=BHQ2, P=3' fosfato) (SEQ ID NO: 10)

Amplicón generado a partir del conjunto de oligonucleótidos n.º 2:

GAAATACAAGGAAAGATGCTATCTTCCGAAGGATTGGCCCAAGAATTGAACC
AACGCATGACCCAAGGGCAAAGCGACTTTGTATTCGTCATTGGCGGATCAAA
 TGGCCTGCACAAGGACGTCTTACAACGCAGTAACTACGCACTATCATT CAGC
 AAAATGACATTTCCACATCAAATGATGCGGGTTGTGTTAATTGAGCAAGTGT
 ATAGAGCGTTTAAGATTATGCGCGGAGAAGCGTATCACAAATGATGCGGTTT
 TTTTAACCTCTTTACGTATGAGGTTTATGAGAATTGCCGTTATGTTTTGCGAG
 20 AGTTATCAATCTTTTTGATAGTAAGAAAGTACATAGAAACTAAAAGAG (SEQ ID NO: 12)

MecC-SARM conjunto de oligonucleótidos n.º 3:

25 Cebador en dirección 5': GAAATACAAGGAAAGATGCTATCTTCI (J=t-butilbencilo dA) (SEQ ID NO: 9)

30 Cebador en dirección 3': GAATATCAAGTAACATCTCAGCAATGATAI (J=t-butilbencilo dC) (SEQ ID NO: 3)

Sonda: ETTGAACQCAACGCATGACCCAAGGGCP (E=thHEX, Q=BHQ2, P=3' fosfato) (SEQ ID NO: 10)

35 Amplicón generado a partir del conjunto de oligonucleótidos n.º 3:

GAAATACAAGGAAAGATGCTATCTTCCGAAGGATTGGCCCAAGAATTGAACC
AACGCATGACCCAAGGGCAAAGCGACTTTGTATTCGTCATTGGCGGATCAAA
TGGCCTGCACAAGGACGTCTTACAACGCAGTAACTACGCACTATCATT CAGC
AAAATGACATTTCCACATCAAATGATGCGGGTTGTGTTAATTGAGCAAGTGT
ATAGAGCGTTTAAGATTATGCGCGGAGAAGCGTATCACAAATGATGCGGTTT
TTTTAACCTCTTTACGTATGAGGTTTATGAGAATTGCCGTTATGTTTTGCGAG
AGTTATCAATCTTTTTGATAGTAAGAAAGTACATAGAACTAAAAGAGTATT
TTTATCTACAATAGCATT TATAATTTATTCTATTATTGTATACTTTATTTAAT
TATTAGTATCATTGCTGAGATGTTACTTGATATTC (SEQ ID NO: 13)

MecC-SARM conjunto de oligonucleótidos n.º 4:

5

Cebador en dirección 5': GAAATACAAGGAAAGATGCTATCTTCI (J=t-butilbencilo dC) (SEQ ID NO: 9)

10

Cebador en dirección 3': ATCTGTATAAAATAGATTAGTCCTTTATTGCGTI (J=t-butilbencilo dA) (SEQ ID NO: 4)

Sonda: ETTGAACQCAACGCATGACCCAAGGGCP (E=thHEX, Q=BHQ2, P=3' fosfato) (SEQ ID NO: 10)

15

Amplicón generado a partir del conjunto de oligonucleótidos n.º 4:

GAAATACAAGGAAAGATGCTATCTTCCGAAGGATTGGCCCAAGAATTGAACC
AACGCATGACCCAAGGGCAAAGCGACTTTGTATTCGTCATTGGCGGATCAAA
TGGCCTGCACAAGGACGTCTTACAACGCAGTAACTACGCACTATCATT CAGC
AAAATGACATTTCCACATCAAATGATGCGGGTTGTGTTAATTGAGCAAGTGT
ATAGAGCGTTTAAGATTATGCGCGGAGAAGCGTATCACAAATGATGCGGTTT
TTTTAACCTCTTTACGTATGAGGTTTATGAGAATTGCCGTTATGTTTTGCGAG
AGTTATCAATCTTTTTGATAGTAAGAAAGTACATAGAACTAAAAGAGTATT
TTTATCTACAATAGCATT TATAATTTATTCTATTATTGTATACTTTATTTAAT
TATTAGTATCATTGCTGAGATGTTACTTGATATTCTATGTCTATTTTTTAGGA
AATTCTATACTATTAATAATTATGGTATTTTATACGCAATAAAGGACTAATCTA
TTTTATACAGAT (SEQ ID NO: 14)

20

MecC-SARM conjunto de oligonucleótidos n.º 5:

Cebador en dirección 5': GAAATACAAGGAAAGATGCTATCTTCI (J=t-butilbencilo dC) (SEQ ID NO: 9)

Cebador en dirección 3': TAGTAAGTGAGGTTGCTGAAATTGTACTJ (J=t-butilbencilo dA) (SEQ ID NO: 5)

5 Sonda: ETTGAACQCAACGCATGACCCAAGGGCP (E=thHEX (E=thFAM, Q=BHQ2, P=3' fosfato) (SEQ ID NO: 10)

Amplicón generado a partir del conjunto de oligonucleótidos n.º 5:

GAAATACAAGGAAAGATGCTATCTTCCGAAGGATTGGCCCAAGAATTGAACC
AACGCATGACCCAAGGGCAAAGCGACTTTGTATTCGTCATTGGCGGATCAAA
 TGGCCTGCACAAGGACGTCTTACAACGCAGTAACTACGCACTATCATT CAGC
 AAAATGACATTTCCACATCAAATGATGCGGGTTGTGTTAATTGAGCAAGTGT
 ATAGAGCGTTTAAGATTATGCGCGGAGAAGCGTATCACAAATGATGCGGTTT
 TTTTAACCTCTTTACGTATGAGGTTTATGAGAATTGCCGTTATGTTTTGCGAG
 AGTTATCAATCTTTTGTAGTAAGAAAGTACATAGAACTAAAAGAGTATT
 10 TTTATCTACAATAGCATTTATAATTTATTCTATTATTGTATACTTTATTTAAT
 TATTAGTATCATTGCTGAGATGTTACTTGATATTCTATGTCTATTTTTTAGGA
 AATTCTATACTATTAATAATTATGGTATTTTATACGCAATAAAGGACTAATCTA
 TTTTATACAGATTAGTCCTTTATTGTAGTCTTTAAAACTAGTTACTCATTA
 TATTTTTTAGTACAATTTTCAGCAACCTCACTTACTA (SEQ ID NO: 15)

MecC-SARM conjunto de oligonucleótidos n.º 6:

15 Cebador en dirección 5': GAAATACAAGGAAAGATGCTATCTTCI (J=t-butilbencilo dC) (SEQ ID NO: 9)

20 Cebador en dirección 3': CAATTCTCATAAACCTCATAACGTAAGI (J=t-butilbencilo dA) (SEQ ID NO: 6)

Sonda: ETTGAACQCAACGCATGACCCAAGGGCP (E=thHEX, Q=BHQ2, P=3' fosfato) (SEQ ID NO: 10)

25 **Amplicón generado a partir del conjunto de oligonucleótidos n.º 6:**

GAAATACAAGGAAAGATGCTATCTTCCGAAGGATTGGCCCAAGAATTGAACC
AACGCATGACCCAAGGGCAAAGCGACTTTGTATTCGTCATTGGCGGATCAAA
 TGGCCTGCACAAGGACGTCTTACAACGCAGTAACTACGCACTATCATT CAGC
 AAAATGACATTTCCACATCAAATGATGCGGGTTGTGTTAATTGAGCAAGTGT
 ATAGAGCGTTTAAGATTATGCGCGGAGAAGCGTATCACAAATGATGCGGTTT
 TTTTAACCTCTTTACGTATGAGGTTTATGAGAATTG (SEQ ID NO: 16)

MecC-SARM conjunto de oligonucleótidos n.º 7:

5 Cebador en dirección 5': GAAATACAAGGAAAGATGCTATCTTCI (J=t-butilbencilo dC) (SEQ ID NO: 9)

Cebador en dirección 3': ACGGCAATTCTCATAAACCTCI (J=t-butilbencilo dA) (SEQ ID NO: 7)

10 Sonda: ETTGAACQCAACGCATGACCCAAGGGCP (E=thHEX, Q=BHQ2, P=3' fosfato) (SEQ ID NO: 10)

Amplicón generado a partir del conjunto de oligonucleótidos n.º 7:

GAAATACAAGGAAAGATGCTATCTTCCGAAGGATTGGCCCAAGAATTGAACC
AACGCATGACCCAAGGGCAAAGCGACTTTGTATTCGTCATTGGCGGATCAAA
 TGGCCTGCACAAGGACGTCTTACAACGCAGTAACTACGCACTATCATT CAGC
 AAAATGACATTTCCACATCAAATGATGCGGGTTGTGTTAATTGAGCAAGTGT
 ATAGAGCGTTTAAGATTATGCGCGGAGAAGCGTATCACAAATGATGCGGTTT
 15 TTTTAACCTCTTTACGTATGAGGTTTATGAGAATTGCCGT (SEQ ID NO: 17)

MecC-SARM conjunto de oligonucleótidos n.º 8:

20 Cebador en dirección 5': GAAATACAAGGAAAGATGCTATCTTCI (J=t-butilbencilo dC) (SEQ ID NO: 9)

Cebador en dirección 3': ACTCTCGCAAAACATAACGGI (J=t-butilbencilo dC) (SEQ ID NO: 8)

25 Sonda: ETTGAACQCAACGCATGACCCAAGGGCP (E=thHEX, Q=BHQ2, P=3' fosfato) (SEQ ID NO: 10)

Amplicón generado a partir del conjunto de oligonucleótidos n.º 8:

GAAATACAAGGAAAGATGCTATCTTCCGAAGGATTGGCCCAAGAATTGAACC
AACGCATGACCCAAGGGCAAAGCGACTTTGTATTCGTCATTGGCGGATCAAA
 TGGCCTGCACAAGGACGTCTTACAACGCAGTAACTACGCACTATCATT CAGC
 AAAATGACATTTCCACATCAAATGATGCGGGTTGTGTTAATTGAGCAAGTGT
 ATAGAGCGTTTAAGATTATGCGCGGAGAAGCGTATCACAAATGATGCGGTTT
 TTTAACCTCTTTACGTATGAGGTTTATGAGAATTGCCGTTATGTTTTGCGAG
 30 AGT (SEQ ID NO: 18)

Aunque la invención precedente se ha descrito con algún detalle con fines de claridad y comprensión, será evidente para un experto en la técnica, a partir de una lectura de la presente divulgación, que se pueden realizar diversos cambios en forma y detalle. Por ejemplo, todas las técnicas y aparatos descritos anteriormente se pueden usar en diversas combinaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de detección de *Staphylococcus aureus* que contiene *mecC* (*mecC*-SARM) en una muestra, comprendiendo el procedimiento:
- 5
- realizar una etapa de amplificación que comprende poner en contacto la muestra con un cebador oligonucleotídico para *orfX* y un cebador oligonucleotídico para *mecC*-SARM para producir un producto de amplificación si *mecC*-SARM está presente en la muestra;
- 10
- realizar una etapa de hibridación que comprende poner en contacto el producto de amplificación con una o más sondas oligonucleotídicas para *mecC*-SARM detectables; y
 - detectar la presencia o ausencia del producto amplificado, en el que la presencia del producto amplificado es indicativa de la presencia de *mecC*-SARM en la muestra y en el que la ausencia del producto amplificado es indicativa de la ausencia de *mecC*-SARM en la muestra;
- 15
- en el que el cebador oligonucleotídico para *mecC*-SARM comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6 y 8;
- 20
- en el que el cebador oligonucleotídico para *orfX* comprende la secuencia de SEQ ID NO: 9; y
- en el que una de las una o más sondas oligonucleotídicas para *mecC*-SARM detectables comprende la secuencia de SEQ ID NO: 10, o un complemento de la misma.
- 25
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que:
- la etapa de hibridación comprende poner en contacto el producto de amplificación con una sonda que está marcada con un resto fluorescente donador y un resto aceptador fluorescente correspondiente; y
 - la etapa de detección comprende detectar la presencia o ausencia de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) entre el resto fluorescente donador y el resto fluorescente aceptador de la sonda, en la que la presencia o ausencia de fluorescencia es indicativa de la presencia o ausencia de *mecC*-SARM en la muestra.
- 30
3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicha amplificación emplea una enzima polimerasa que tiene actividad nucleasa de 5' a 3'.
- 35
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, en el que el resto fluorescente donador y el resto fluorescente aceptador correspondiente están separados por no más de 8 nucleótidos entre sí en la sonda.
- 40
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que el resto fluorescente aceptador es un extintor.
- 45
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el cebador oligonucleotídico para *orfX* y el cebador oligonucleotídico para *mecC*-SARM tienen 40 nucleótidos o menos.
- 50
7. Un kit para detectar un ácido nucleico de *Staphylococcus aureus* que contiene *mecC* (*mecC*-SARM) que comprende:
- un primer cebador oligonucleotídico que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6 y 8;
 - un segundo cebador oligonucleotídico configurado para hibridarse con una parte de un gen *orfX* y que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 9; y
 - una sonda oligonucleotídica marcada de manera detectable configurada para hibridarse con un amplicón generado por el primer y el segundo cebador oligonucleotídico y que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 10, o un complemento de la misma.
- 55
- 60
8. El kit de la reivindicación 7, en el que la sonda oligonucleotídica marcada de manera detectable comprende un resto fluorescente donador y un resto fluorescente aceptador correspondiente.
- 65
9. El kit de la reivindicación 8, en el que el resto fluorescente aceptador es un extintor.

ES 2 729 304 T3

10. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, que comprende además nucleósidos trifosfato, una ácido nucleico polimerasa y tampones necesarios para la función de la ácido nucleico polimerasa.
- 5 11. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que los primer y segundo cebadores oligonucleotídicos y/o la sonda oligonucleotídica tienen 40 nucleótidos o menos.
- 10 12. Un par de cebadores oligonucleotídicos para la amplificación de la diana génica de *mecC-SARM* que comprende un primer cebador oligonucleotídico que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6 y 8; y un segundo cebador oligonucleotídico configurado para hibridarse con una parte de un gen *orfX* y que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 9.
- 15 13. El par de cebadores oligonucleotídicos de la reivindicación 12, en el que el primer y/o el segundo cebador oligonucleotídico comprende al menos un nucleótido modificado.
14. El par de cebadores oligonucleotídicos de una cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13, en el que los oligonucleotídicos tienen 40 nucleótidos o menos.

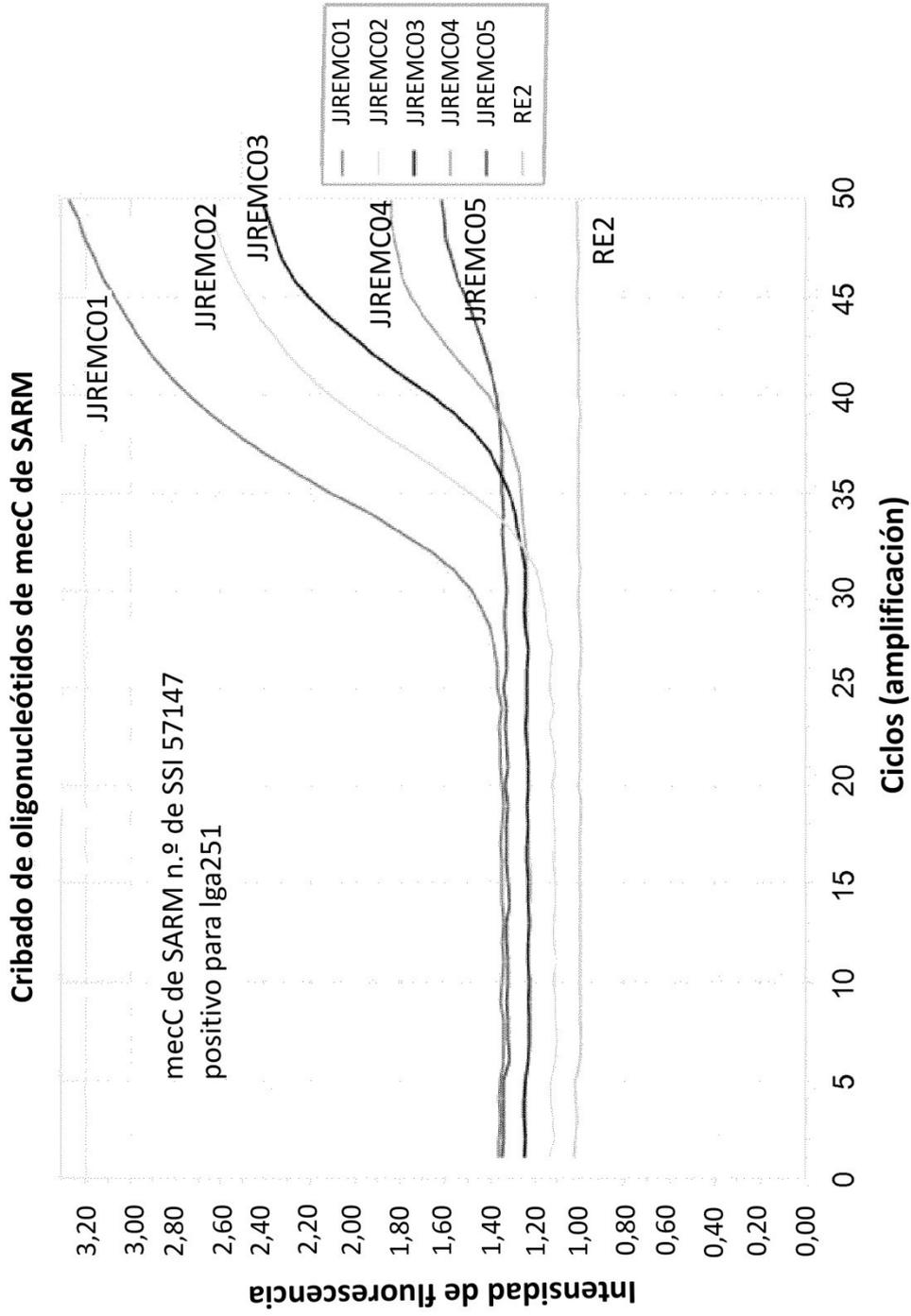


FIGURA 1

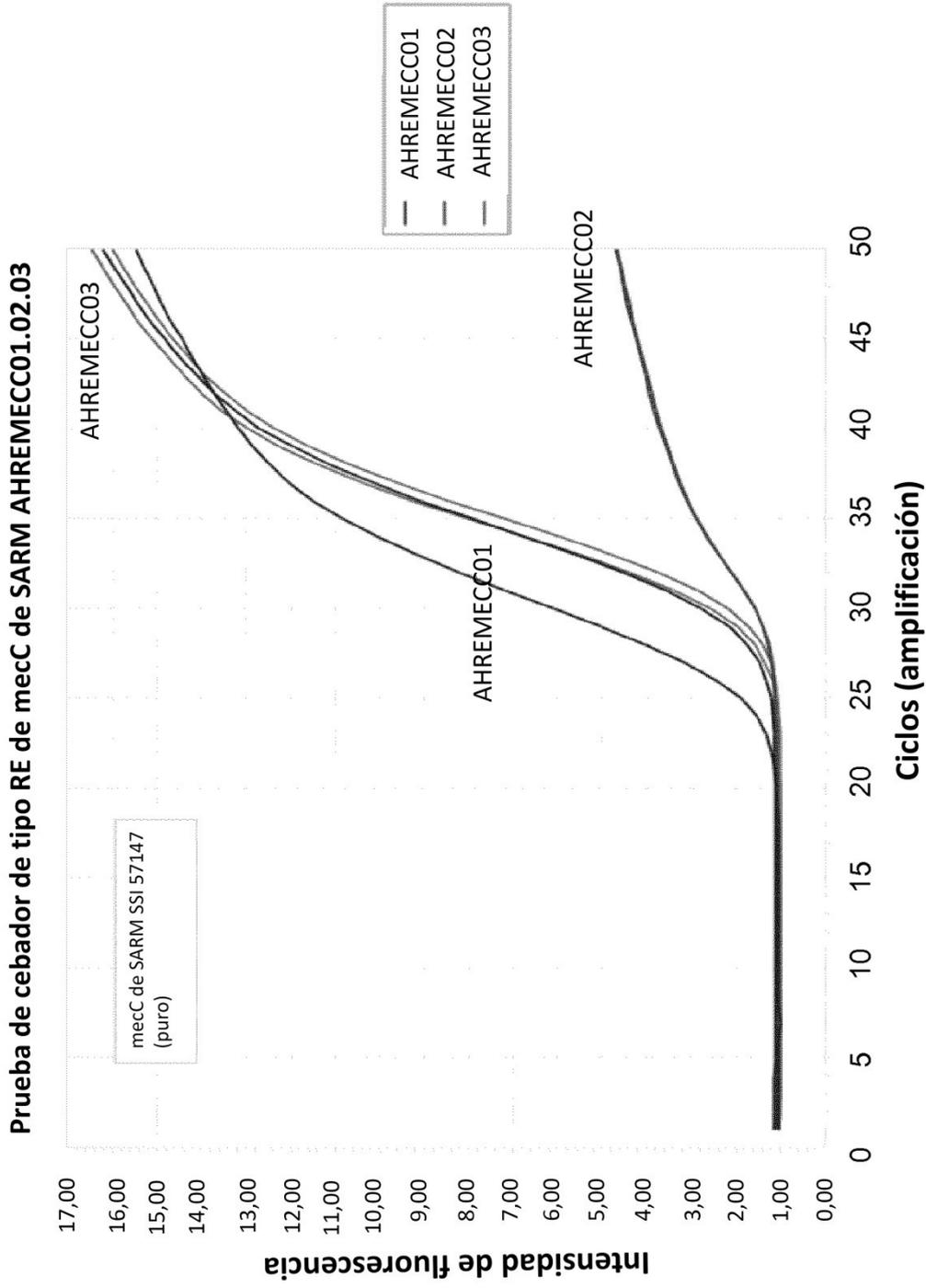


FIGURA 2

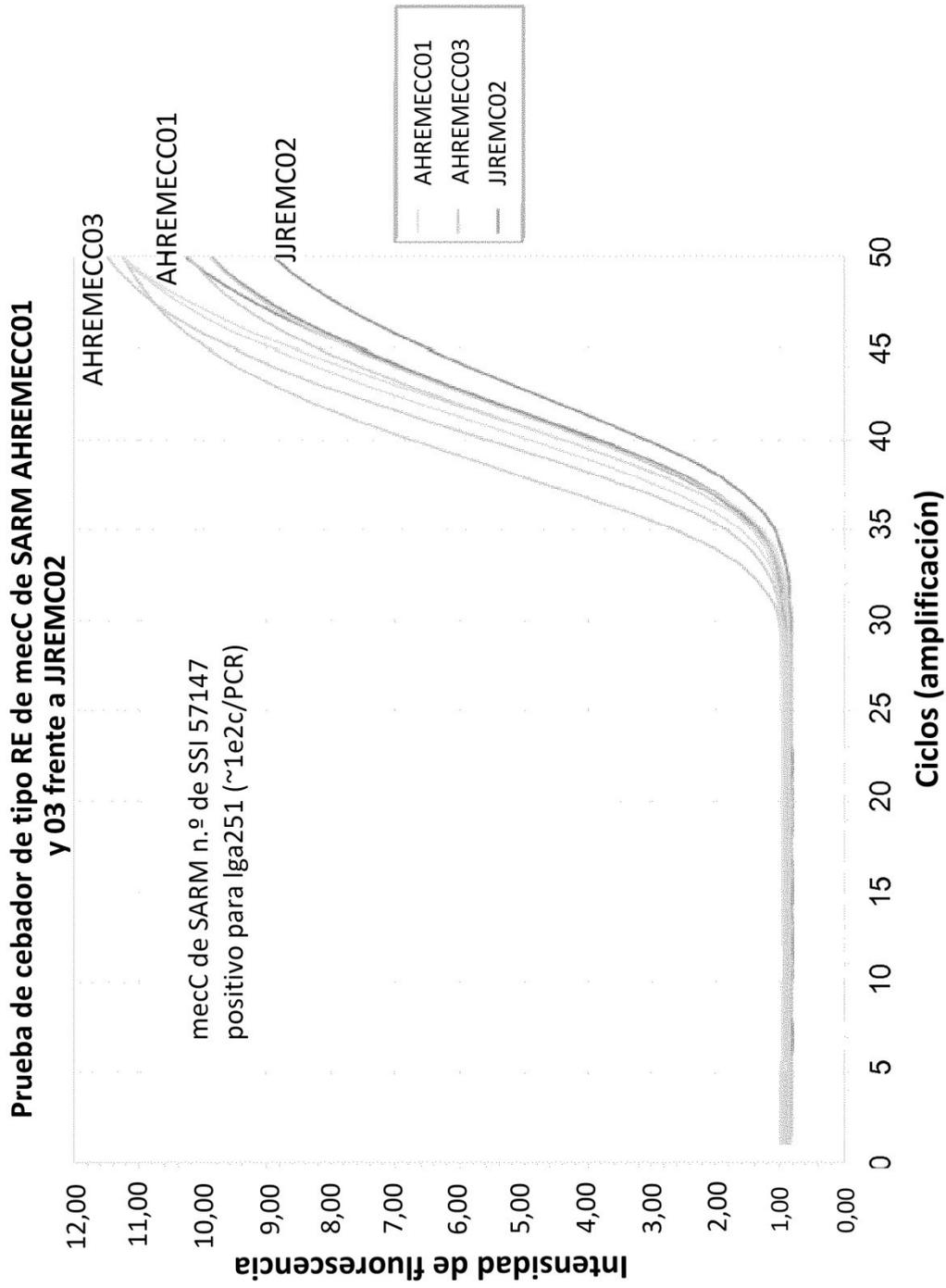


FIGURA 3

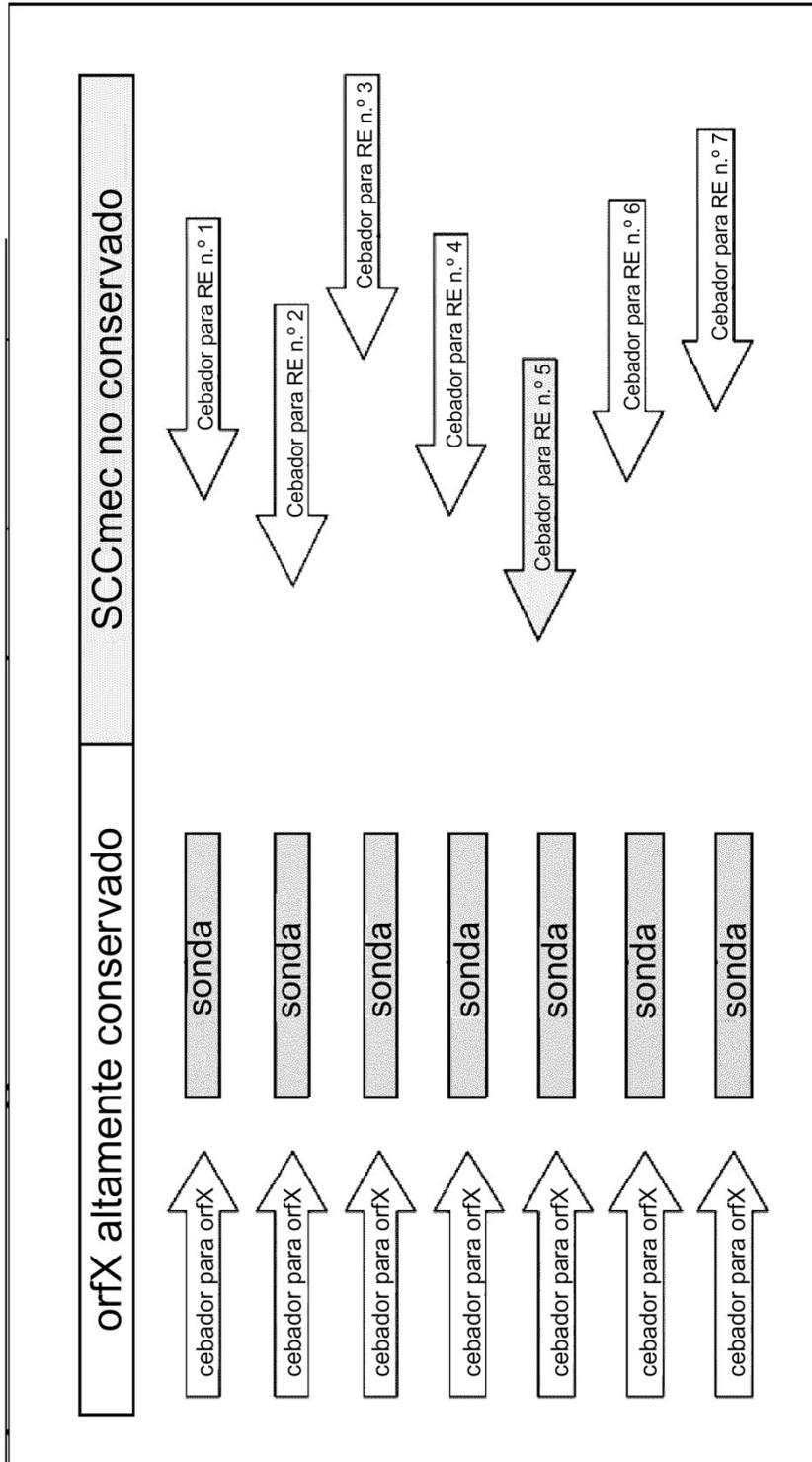


FIGURA 4