



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 281 520**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02737885 .0**
86 Fecha de presentación : **14.03.2002**
87 Número de publicación de la solicitud: **1370694**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **17.12.2003**

54 Título: **Detección de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM).**

30 Prioridad: **15.03.2001 US 275642 P**
15.03.2001 EP 01106544

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.10.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.10.2007

73 Titular/es: **Jacques Schrenzel**
1, chemin des Tulpiers
1208 Geneva, CH

72 Inventor/es: **Schrenzel, Jacques y**
Francois, Patrice

74 Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

ES 2 281 520 T3

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

DESCRIPCIÓN

Detección de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM).

5 La presente invención se refiere a un método novedoso para la detección y cuantificación de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) a partir de una muestra. Además, la presente invención se refiere a nuevos cebadores y sondas y kits de diagnóstico para la detección y cuantificación de SARM.

10 SARM es una bacteria patógena y pertenece a la clase de las bacterias multirresistentes. La prevalencia creciente de SARM se ha convertido en un problema clínico importante. Por tanto, la detección e identificación rápida y precisa de SARM en muestras clínicas se consideran críticas para la prevención y el tratamiento de enfermedades infecciosas.

15 Los métodos para la detección e identificación de SARM se han descrito ya. Por ejemplo, los métodos basados en ADN que emplean PCR y cebadores de amplificación para la detección específica de especie, identificación y cuantificación de estafilococos y del gen de resistencia a antibióticos que codifica para la resistencia a meticilina (gen *mecA*) se han descrito en el documento WO 98/20157.

20 El documento WO 99/16780 describe el uso de cebadores específicos para el gen *mecA* y cebadores específicos de especie de estafilococo para el gen *femA*, un gen regulador implicado en el metabolismo de la pared celular, para la amplificación usando PCR múltiplex. Tomando aspirados endotraqueales como muestra, se detectaron mediante electroforesis *Staphylococcus aureus* vulnerable y estafilococos coagulasa negativos resistentes a meticilina. El documento US 5702895 describe un método de PCR múltiplex para la detección de SARM usando cebadores marcados con biotina y marcados con dinitrofenilo para el gen *mecA* y el gen *spa*, un marcador que distingue *Staphylococcus aureus* de otros estafilococos. Se tomaron muestras de cultivos de bacterias aisladas y se detectó el ADN amplificado mediante absorbancia. Los métodos descritos se han usado sólo para el análisis de muestras tomadas de cultivos de bacterias aisladas y sitios estériles. Cuando se usa una muestra no estéril, sin embargo, el número de SARM contenidos en la misma puede ser pequeño y además pueden estar presentes estafilococos tales como *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina (SASM) y *Staphylococcus epidermidis* resistente a meticilina (SERM). En tales situaciones, los métodos descritos no son ventajosos porque la existencia del gen *mecA* no puede vincularse explícita e inequívocamente a la presencia de SARM. Además, en tales condiciones, no puede excluirse completamente el riesgo de amplificación no específica y la sensibilidad del procedimiento disminuye.

35 El documento EP-A-0532430 describe un reactivo para la identificación de SARM que comprende un compuesto reactivo del tipo inmunoglobulina tal como un anticuerpo monoclonal que puede unirse a la proteína A de SARM y específicamente inmunorreactivo hacia el antígeno 18 de SARM y otro compuesto basado en fibrinógeno o un derivado que puede reaccionar con el factor de afinidad de fibrinógeno de SARM. El reactivo se usa en un procedimiento para la identificación de SARM, mientras que se forma un complejo entre el compuesto reactivo y un antígeno de SARM.

40 El documento EP-A-0625575 describe secuencias de ADN que codifican para la proteína FemA de *Staphylococcus epidermidis*, incluyendo la secuencia natural del gen designado *femA*. Se describen dos cebadores para el aislamiento del gen *femA* de *Staphylococcus epidermidis* mediante PCR. Ambos cebadores tienen una secuencia diferente de los cebadores específicos para una secuencia de ADN diana del gen *femA* de *Staphylococcus epidermidis* resistente a meticilina (SERM) de la presente invención.

45 El objeto de la presente invención es proporcionar un método mejorado para la detección y cuantificación de SARM a partir de una muestra que permite la cuantificación altamente sensible de SARM incluso si la muestra es de un sitio no estéril.

50 Este objeto se ha logrado con un método novedoso según la reivindicación 1. Según la invención, se detecta y cuantifica *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina a partir de una muestra que comprende

- a) poner en contacto la muestra con anticuerpos anti-proteína A de manera que se adsorben *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y/o *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina,
- 55 b) separar dichos anticuerpos a los que se han adsorbido *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y/o *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina de la muestra,
- c) lisar los *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y/o *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina adsorbidos a dichos anticuerpos de manera que se libera su ADN,
- 60 d) combinar el ADN liberado con (i) sondas y/o cebadores que son específicos para una secuencia de ADN diana del gen *mecA* de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y/o *Staphylococcus epidermidis* resistente a meticilina, (ii) sondas y/o cebadores que son específicos para una secuencia de ADN diana de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina diferente de una secuencia de ADN diana del gen *mecA* y (iii) sondas y/o cebadores que son específicos para una secuencia de ADN diana de *Staphylococcus epidermidis* resistente a meticilina diferente de una secuencia de ADN diana del gen *mecA*, por lo cual las secuencias de ADN diana de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y de *Staphylococcus epidermidis* resistente a
65 metilina no son homólogas,

ES 2 281 520 T3

- e) someter el ADN liberado combinado y las sondas y/o los cebadores específicos a condiciones que permiten la amplificación de dichas secuencias de ADN diana,
- f) detectar la presencia y cantidad de las secuencias de ADN diana amplificadas como una indicación de la presencia y cantidad de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

Muestra

Las muestras a partir de las cuales puede detectarse y cuantificarse SARM con la presente invención son de sitios estériles y/o no estériles. Los sitios estériles de los cuales pueden tomarse muestras son fluidos orgánicos tales como sangre, orina, fluido cerebroespinal, fluido sinovial, fluido pleural, fluido pericárdico, fluido intraocular, biopsias de tejido o aspirados endotraqueales. Los cultivos de bacterias aisladas se definen en el presente documento como sitios estériles. Los sitios no estériles de los cuales pueden tomarse muestras son por ejemplo esputos, deposiciones, muestras tomadas con hisopo de por ejemplo la piel, zona inguinal, nasal y/o garganta. Preferiblemente, se usan en la presente invención muestras de sitios no estériles, más preferiblemente tomadas con hisopos de la zona inguinal y/o nasal.

Puesta en contacto la muestra con anticuerpos anti-proteína A

Normalmente, la muestra se volverá a suspender en por ejemplo solución salina, solución de caldo o medio de cultivo bacteriano tal como medio CS (infusión de Cerebro-Corazón con colistina y NaCl al 2,5%) antes de ponerse en contacto con los anticuerpos anti-proteína A. Normalmente, se añadirán agentes pasivantes, por ejemplo seroalbúmina, a la muestra resuspendida. Los anticuerpos anti-proteína A usados en la presente invención son anticuerpos dirigidos frente a la proteína A de SARM y SASM y normalmente son anticuerpos monoclonales. Con el fin de permitir la adsorción de SARM y/o SASM, la muestra se pondrá en contacto normalmente durante de 5 a 120 minutos, preferiblemente durante de 10 a 60 minutos con los anticuerpos. Después de que haya tenido lugar la adsorción de SARM y/o SASM, los anticuerpos se separarán de la muestra. Dependiendo del método de separación empleado, pueden usarse en la presente invención anticuerpos anti-proteína A o anticuerpos anti-proteína A modificados, por ejemplo biotinizados, ambos disponibles comercialmente. La muestra y los anticuerpos pueden separarse por ejemplo mediante centrifugación, cromatografía, por ejemplo cromatografía de afinidad o inmovilización de los anticuerpos o una combinación de estos métodos. Si se usa inmovilización o cromatografía de afinidad, los anticuerpos pueden interactuar con la columna de afinidad en primer lugar o inmovilizarse alternativamente y pueden ponerse en contacto después con la muestra. Preferiblemente, se usa la inmovilización de anticuerpos anti-proteína A en la presente invención para separar los anticuerpos que han adsorbido SARM y/o SASM de la muestra. En particular, se añade una etapa de centrifugación antes de inmovilizar los anticuerpos. Los anticuerpos pueden inmovilizarse sobre por ejemplo perlas paramagnéticas. Pueden usarse estreptavidina y biotina como componentes de unión, por ejemplo, uniendo anticuerpos anti-proteína A biotinizados a perlas paramagnéticas recubiertas de estreptavidina. Preferiblemente, los anticuerpos anti-proteína A biotinizados y las perlas paramagnéticas recubiertas de estreptavidina se usan para inmovilizar los anticuerpos. Las perlas paramagnéticas recubiertas de estreptavidina están disponibles comercialmente. Normalmente, los anticuerpos y las perlas paramagnéticas se incubarán para permitir la unión de los anticuerpos a las perlas paramagnéticas y después se sujetarán magnéticamente para separarlos de la muestra lavando las perlas paramagnéticas. El periodo de incubación es normalmente de 5 a 120 minutos, preferiblemente de 10 a 60 minutos. El periodo para sujetar las perlas paramagnéticas magnéticamente es normalmente de 1 a 60 minutos, preferiblemente de 2 a 20 minutos. Los anticuerpos pueden volver a suspenderse durante la separación si es necesario. Para la resuspensión y el lavado, puede usarse por ejemplo solución salina tamponada con fosfato que contiene seroalbúmina humana.

Lisado de los microorganismos adsorbidos para liberar su ADN

Pueden lisarse los SARM y/o SASM adsorbidos a los anticuerpos para liberar su ADN aplicando por ejemplo un detergente tal como Tween, Triton X-100, un álcali tal como NaOH, una proteasa tal como proteinasa K o fuerzas caotrópicas y/o de cizalladura. La lisis se lleva a cabo normalmente en un tampón como TE (Tris-HCl 10 mM, pH=8 y EDTA 1 mM) o en agua (pureza de grado molecular) o en un tampón como solución salina tamponada con fosfato (PBS) o en solución salina. Como caótrofo, se usa por ejemplo isotiocianato de guanidina, urea o clorhidrato de guanidina, preferiblemente isotiocianato de guanidina. En el caso de que se use un caótrofo, se usa preferiblemente el tampón ATL comercializado por Qiagen que contiene isotiocianato de guanidina. En el caso de que se use un caótrofo, se elimina del ADN liberado después de la lisis por ejemplo poniendo en contacto el ADN liberado con una columna de unión a ADN tal como Qlamp (Qiagen). El ADN eluido de la columna puede combinarse entonces con las sondas y/o los cebadores o puede concentrarse antes. Pueden aplicarse fuerzas de cizalladura por ejemplo añadiendo perlas y mezclando la solución. Como perlas, pueden añadirse preferiblemente perlas de vidrio, más preferiblemente perlas de vidrio con un diámetro de 100-200 μm tal como se comercializan por Schieritz and Hauenstein AG (Suiza). El uso de perlas de vidrio es particularmente útil, ya que se ha descubierto que si la lisis se lleva a cabo en PBS o solución salina las perlas de vidrio, particularmente perlas de vidrio con un diámetro de 100-200 μm tal como se comercializan por Schieritz and Hauenstein AG (Suiza), se unen cuantitativamente al ADN liberado, lo que extrae eficazmente el ADN de los otros componentes. Tras la elución del ADN unido a las perlas de vidrio usando agua o TE, el ADN eluido puede combinarse directamente con las sondas y/o los cebadores o puede concentrarse antes. Alternativamente, las perlas de vidrio con ADN unido pueden suspenderse en PBS o en solución salina y pueden combinarse directamente con las sondas y/o los cebadores. Además, puede llevarse a cabo la lisis aplicando fuerzas de cizalladura también en TE (Tris-HCl 10 mM, pH=8 y EDTA 1 mM) o en agua (pureza de grado molecular) usando perlas, preferiblemente perlas de vidrio, más preferiblemente perlas de vidrio con un diámetro de 100-200 μm tal como se comercializan por

ES 2 281 520 T3

Schieritz and Hauenstein AG (Suiza). Este procedimiento permite la recuperación directa del ADN en la fase líquida. El ADN en la fase líquida puede combinarse directamente con las sondas y/o cebadores o puede concentrarse antes. La forma preferida de llevar a cabo la lisis es usar fuerzas de cizalladura. Más preferiblemente, se lleva a cabo la lisis en un tampón como (PBS) o en solución salina, usando perlas de vidrio, particularmente perlas de vidrio con un diámetro de 100-200 μm tal como se comercializan por Schieritz and Hauenstein AG (Suiza).

Sondas y/o cebadores

Las sondas y/o los cebadores que pueden usarse en los métodos de la presente invención que son específicos para una secuencia de ADN diana del gen *mecA* de SARM y/o SERM, una secuencia de ADN diana de SARM diferente de una secuencia de ADN diana del gen *mecA* y una secuencia de ADN diana de SERM diferente de una secuencia de ADN diana del gen *mecA* abarcan la secuencia particular de la sonda y/o el cebador particular, una secuencia complementaria de la misma, una parte de la misma que tiene al menos 10, preferiblemente 15, más preferiblemente 20 nucleótidos de longitud y una variante de las mismas. Las variantes abarcan secuencias degeneradas, deleciones, inserciones y sustituciones en una o más posiciones de nucleótidos, siempre que cada sonda o cebador particular sea todavía específico para la secuencia de ADN diana particular. Normalmente, las sondas y los cebadores se aplican para cada secuencia de ADN diana. Preferiblemente, se aplican un par de cebadores tales como un cebador directo y un cebador inverso, y una sonda.

Los términos “sondas y/o cebadores específicos” o “sondas y/o cebadores que son específicos para una secuencia de ADN diana” tal como se usan en el presente documento se refieren a sondas, que tienen una homología superior al 60%, preferiblemente superior al 70%, más preferiblemente superior al 80%, en particular superior al 90% con la secuencia de ADN diana particular que ha de amplificarse y a cebadores que tienen una homología superior al 60%, preferiblemente superior al 70%, más preferiblemente superior al 80%, en particular superior al 90% con el ADN que flanquea la secuencia de ADN diana particular que ha de amplificarse. Las sondas y los cebadores, respectivamente, hibridan en condiciones rigurosas, por ejemplo a una temperatura de entre 55 y 65°C, preferiblemente entre 58 y 62°C y a una concentración de sal dada de entre 3 y 10 mM, preferiblemente entre 4 y 6 mM, con el complemento de la secuencia de ADN diana particular que ha de amplificarse y con el ADN que flanquea el complemento de la secuencia de ADN diana particular que ha de amplificarse, respectivamente.

Como una base para seleccionar (i) sondas y/o cebadores que son específicos para una secuencia de ADN diana del gen *mecA* de SARM y/o SERM, (ii) sondas y/o cebadores que son específicos para una secuencia de ADN diana de SARM diferente de una secuencia de ADN diana del gen *mecA* y (iii) sondas y/o cebadores que son específicos para una secuencia de ADN diana de SERM diferente de una secuencia de ADN diana del gen *mecA*, pueden usarse secuencias de bases de datos tales como GenBank o EMBL, fragmentos descritos en la bibliografía o fragmentos aislados de los microorganismos respectivos. Preferiblemente, se usan secuencias de bases de datos tales como GenBank o EMBL, más preferiblemente GenBank. En particular, se seleccionan sondas y/o cebadores que son específicos para una secuencia de ADN diana del gen *mecA* de SARM y/o SERM a partir de la secuencia del gen *mecA* comprendida por el número de secuencia Y14051 (GenBank), (ii) se seleccionan sondas y/o cebadores que son específicos para una secuencia de ADN diana de SARM diferente de una secuencia de ADN diana del gen *mecA* a partir de la secuencia del gen *femA* de SARM comprendida por el número de secuencia X17688 (Genbank) y (iii) se seleccionan sondas y/o cebadores que son específicos para una secuencia de ADN diana de SERM diferente de una secuencia de ADN diana del gen *mecA* a partir de la secuencia del gen *femA* de SERM comprendida por el número de secuencia U23713 (Genbank).

Pueden seleccionarse también sondas y cebadores que son específicos para una secuencia de ADN diana de SARM diferente de una secuencia de ADN diana del gen *mecA* a partir de secuencias de bases de datos tales como GenBank o EMBL, fragmentos descritos en la bibliografía o fragmentos aislados de los microorganismos respectivos que comprenden las secuencias de ADN diana de SASM siempre que estas secuencias de ADN diana estén también albergadas por SARM.

Pueden seleccionarse también sondas y/o cebadores que son específicos para una secuencia de ADN diana de SERM diferente de una secuencia de ADN diana del gen *mecA* a partir de secuencias de bases de datos tales como GenBank o EMBL, fragmentos descritos en la bibliografía o fragmentos aislados de los microorganismos respectivos que comprenden secuencias de ADN diana de SESM siempre que estas secuencias de ADN diana estén también albergadas por SERM.

Normalmente, será suficiente seleccionar una secuencia de ADN diana del gen *mecA* de SARM o SERM para diseñar las sondas y el cebador que son específicos para una secuencia de ADN diana del gen *mecA* de SARM y/o SERM ya que el gen *mecA* es entre el 95% y el 100%, normalmente superior al 97% homólogo entre SARM y SERM. Preferiblemente, la secuencia de ADN diana seleccionada del gen *mecA* es de SARM.

Como secuencias de ADN diana, pueden usarse genes de SARM y SERM que no son homólogos en toda la secuencia de ADN diferente de una secuencia de ADN diana del gen *mecA* que está albergado por el 100% de SARM y el 100% de SERM, respectivamente, siempre que la homología entre ambas secuencias de ADN diana sea inferior al 90%, preferiblemente inferior al 85%, lo más preferiblemente inferior al 80% y que ambas secuencias no hibriden de manera cruzada en las condiciones rigurosas descritas anteriormente. Normalmente, las secuencias de ADN de un gen tal como el gen *femA* de SARM (*femA-SA*) y el gen *femA* de SERM (*femA-SE*) u otras secuencias de ADN diana de

ES 2 281 520 T3

genes de SARM y SERM que no están relacionados entre sí, se usan como secuencias de ADN diana. Preferiblemente, se usan las secuencias de ADN diana del gen *femA* de SARM (*femA-SA*) y del gen *femA* de SERM (*femA-SE*).

5 Las sondas y/o los cebadores que son específicos para una secuencia de ADN diana del gen *mecA* de SARM y/o SERM, una secuencia de ADN diana de SARM diferente de una secuencia de ADN diana del gen *mecA* y una secuencia de ADN diana de SERM diferente de una secuencia de ADN diana del gen *mecA*, se diseñan normalmente para generar un producto de amplificación de aproximadamente 100 +/- 50 nucleótidos. La secuencia de los cebadores y las sondas puede obtenerse usando programas convencionales y software de análisis del cebador tal como "Primer Express" (Perkin Elmer) y puede sintetizarse usando métodos convencionales tales como un sintetizador de ADN
10 automatizado.

Los cebadores que son específicos para una secuencia de ADN diana del gen *mecA* de SARM y/o SERM consisten normalmente en 13-30, preferiblemente 20-26 nucleótidos de longitud. Las sondas que son específicas para una secuencia de ADN diana del gen *mecA* de SARM y/o SERM consisten normalmente en 15-40, preferiblemente 25-
15 35 nucleótidos de longitud. Los cebadores que son específicos para una secuencia de ADN diana de SARM diferente de una secuencia de ADN diana del gen *mecA* y para una secuencia de ADN diana de SERM diferente de una secuencia de ADN diana del gen *mecA* consisten normalmente en 13-30, preferiblemente 20-26 nucleótidos de longitud y normalmente se seleccionan con el fin de contener > 3 apareamientos erróneos para discriminar la secuencia de ADN diana de SARM diferente de una secuencia de ADN diana del gen *mecA* de la secuencia de ADN diana de SERM diferente de una secuencia de ADN diana del gen *mecA*. Las sondas que son específicas para una secuencia de
20 ADN diana de SARM diferente de una secuencia de ADN diana del gen *mecA* y para una secuencia de ADN diana de SERM diferente de una secuencia de ADN diana del gen *mecA* consisten normalmente en 15-40, preferiblemente 25-35 nucleótidos de longitud y normalmente se seleccionan con el fin de contener > 3 apareamientos erróneos para discriminar la secuencia de ADN diana de SARM diferente de una secuencia de ADN diana del gen *mecA* de la
25 secuencia de ADN diana de SERM diferente de una secuencia de ADN diana del gen *mecA*. Todos los cebadores y las sondas pueden seleccionarse para que sean compatibles entre sí así como con los otros conjuntos de cebadores y sondas con el fin de evitar autohibridación o hibridación entre diferentes cebadores y/o sondas, formación de bucles y sitio de cebado falso. Tras la selección, los cebadores y las sondas pueden someterse a prueba en parejas para valorar su sensibilidad y especificidad y pueden combinarse en diferentes concentraciones de normalmente 50-900 nM, para
30 definir las condiciones de reacción óptimas durante la amplificación.

Las sondas y/o cebadores preferidos específicos para una secuencia de ADN diana del gen *mecA* de SARM y/o SERM se seleccionan de los cebadores que comprenden las secuencias SEQ ID No. 1 y 2 y la sonda que comprende la SEQ ID No. 3, una secuencia complementaria de la misma, una parte de la misma que tiene al menos 10, preferible-
35 mente 15, más preferiblemente 20 nucleótidos de longitud y una variante de la misma. Las sondas y/o los cebadores preferidos particulares específicos para una secuencia de ADN diana del gen *mecA* de SARM y/o SERM son los cebadores que comprenden las secuencias SEQ ID No. 1 y 2 y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID No. 3.

Las sondas y/o los cebadores preferidos específicos para una secuencia de ADN diana de SARM diferente de una secuencia de ADN diana del gen *mecA* son sondas y/o cebadores, una secuencia complementaria de los mismos, una parte de los mismos que tiene al menos 10, preferiblemente 15, más preferiblemente 20 nucleótidos de longitud y una variante de los mismos que son específicos para una secuencia de ADN diana del gen *femA* de SARM. Las sondas y/o los cebadores preferidos particulares específicos para una secuencia de ADN diana del gen *femA* de SARM se
40 seleccionan de los cebadores que comprenden las secuencias SEQ ID No. 4 y 5 y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID No. 6, y los cebadores que comprenden las secuencias SEQ ID No. 10 y 11 y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID No. 12, una secuencia complementaria de las mismas, una parte de las mismas que tiene al menos 10, preferiblemente 15, más preferiblemente 20 nucleótidos de longitud y una variante de las mismas. Los más preferidos son los cebadores que comprenden las secuencias SEQ ID No. 4 y 5 y la sonda que comprende la secuencia
45 SEQ ID No. 6 y los cebadores que comprenden las secuencias SEQ ID No. 10 y 11 y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID No. 12 y una secuencia complementaria de las mismas, en particular los cebadores que comprenden las secuencias SEQ ID No. 10 y 11 y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID No. 12.

Las sondas y/o los cebadores preferidos específicos para una secuencia de ADN diana de SERM diferente de una secuencia de ADN diana del gen *mecA* son sondas y/o cebadores, una secuencia complementaria de los mismos, una parte que tiene al menos 10, preferiblemente 15, más preferiblemente 20 nucleótidos de longitud y una variante de los
55 mismos que son específicos para una secuencia de ADN diana del gen *femA* de SERM. Las sondas y/o los cebadores preferidos particulares específicos para una secuencia de ADN diana del gen *femA* de SERM se seleccionan de los cebadores que comprenden las secuencias SEQ ID No. 7 y 8 y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID No. 9 y los cebadores que comprenden las secuencias SEQ ID No. 13 y 14 y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID No.
60 15, una secuencia complementaria de las mismas, una parte de las mismas que tiene al menos 10, preferiblemente 15, más preferiblemente 20 nucleótidos de longitud y una variante de las mismas. Los más preferidos son los cebadores que comprenden las secuencias SEQ ID No. 7 y 8 y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID No. 9 y los cebadores que comprenden las secuencias SEQ ID No. 13 y 14 y la sonda que comprende las secuencias SEQ ID No. 15 y una secuencia complementaria de las mismas, en particular los cebadores que comprenden las secuencias SEQ ID No. 13
65 y 14 y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID No. 15.

Amplificación

Las condiciones que permiten la amplificación de dichas secuencias de ADN diana son bien conocidas por el experto en la técnica. Normalmente, puede usarse un método de amplificación tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR anidada o PCR múltiplex, reacción en cadena de la ligasa, amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA), replicación de secuencia autosostenida (3SR), amplificación por desplazamiento de la cadena (SDA), amplificación de la señal de ADN ramificado (ADNb), amplificación mediada por transcripción (TMA) o tecnología de sonda cíclica (CPT). Preferiblemente, se usa la PCR múltiplex. En una PCR múltiplex, las sondas y/o los cebadores mencionados anteriormente se usan en combinación en una reacción de PCR única junto con el ADN liberado.

En el caso de que se use un método de PCR como método de amplificación, puede usarse por ejemplo una ADN polimerasa tal como ADN polimerasa Taq (Perkin Elmer) o AmpliTaq (PE Applied Biosystems), polimerasa Hot GoldStar Taq (Eurogentec), polimerasa AmpliTaq Gold (PE Applied Biosystems), SureStart Taq (Stratagene) o Platinum Taq (Gibco). Preferiblemente, se usa ADN polimerasa Hot GoldStar Taq. El tratamiento para desnaturar en un ADN de cadena única es normalmente un tratamiento térmico. Las condiciones de PCR normales son por ejemplo condiciones cíclicas térmicas tales como incubación durante 0,5-5 min a 40°-60°, preferiblemente 1,5-2,5 min a 45°-55°, seguido de incubación durante 5-15 min a 90°-97°, preferiblemente 8-12 min a 95°, seguido de incubación durante 5-30 s a 90°-97°, preferiblemente 10-20 s a 95°, seguido de incubación durante 0,1-5 minutos a 50°-70°, preferiblemente 0,5-2 min a 55°-65°, por lo cual las dos últimas etapas de incubación se repetirán hasta 100 veces, preferiblemente 50 veces. Puede añadirse una etapa de desnaturalización adicional como primera etapa de incubación en el caso de que se use una ADN polimerasa. Normalmente, se añade un tampón de reacción disponible comercialmente al ADN liberado combinado con las sondas y/o los cebadores antes de la incubación. Las sondas y/o los cebadores normalmente se añaden en exceso al ADN liberado. Las razones normales de sonda y cebadores para cada secuencia de ADN diana es de entre 1/3 y 2/1. La razón de un cebador respecto al otro para cada secuencia de ADN diana es normalmente de entre 1/3 y 3/1.

La presencia y cantidad de las secuencias de ADN diana amplificadas puede detectarse mediante por ejemplo un método en el que el tamaño de las secuencias de ADN diana amplificadas se confirma mediante electroforesis, hibridando las secuencias de ADN diana amplificadas con una sonda marcada que tiene una secuencia complementaria a la secuencia de la diana amplificada o mediante PCR en tiempo real, en la que las secuencias de ADN diana amplificadas se detectan durante la amplificación por ejemplo midiendo la fluorescencia durante la amplificación usando una diversidad de colorantes fluorescentes que emiten a diferentes longitudes de onda. Los sistemas de PCR en tiempo real tales como TaqMan® (Perkin Elmer), sistemas de detección de secuencia ABI Prism (Applied Biosystems), SmartCycler® (Cepheid), I-Cycler (BioRad), LightCycler (Roche), R.A.P.I.D. (Idaho Technologies), DNA Engine Opticon (MJ Research), Rotor-Gene (Corbett Research), y MX400 (Stratagene) son los métodos preferidos. Son particularmente preferidos los sistemas de detección de secuencia ABI Prism, el sistema TaqMan® y el SmartCycler®. Los más preferidos son los sistemas de detección de secuencia ABI Prism. Pueden acoplarse diferentes colorantes fluorescentes o extintores no fluorescentes dependiendo del sistema de PCR en tiempo real usado, con por ejemplo cada una de dichas sondas antes de la amplificación, por ejemplo un colorante fluorescente tal como FAM (6-carboxifluoresceína), HEX (6-carboxi-2',4,4',5',7,7'-hexaclorofluoresceína), TET (6-carboxi-4,7,2',7'-tetracloro-fluoresceína), JOE (6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína) o Texas-Red® puede acoplarse al extremo 5' de la sonda y un extintor fluorescente tal como TAMRA (6-carboxi-N,N,N',N'-tetrametilrodamina) o un extintor no fluorescente tal como DABCYL (ácido 4-((4-(dimetilamino)fenil)azo)benzoico) pueden acoplarse al extremo 3' de la sonda. En el caso de que se use PCR en tiempo real, normalmente se detecta el umbral de ciclo (Ct) de las secuencias de ADN diana amplificadas, por lo cual la diferencia de los Ct obtenidos para la secuencia de ADN diana del gen mecA de SARM y/o SERM y los obtenidos para la secuencia de ADN diana de SERM diferente del gen mecA indica la presencia de una cantidad de SARM. El valor de Ct entre triplicados para cada secuencia diana de ADN se usa normalmente para determinar la presencia y cantidad de SARM. Las condiciones preferidas que indican la presencia y cantidad de SARM son cuando se cumplen todos los siguientes requerimientos:

- 1) El Ct más pequeño para la secuencia de ADN diana del gen mecA de SARM y/o SERM < 40
- 2) El Ct más pequeño para la secuencia de ADN diana de SARM diferente del gen mecA < 40
- 3) La diferencia entre el Ct para la secuencia de ADN diana del gen mecA de SARM y/o SERM y el Ct para la secuencia de ADN diana de SERM diferente del gen mecA (Ct de la secuencia de ADN diana del gen mecA de SARM y/o SERM - Ct de la secuencia de ADN diana de SERM diferente del gen mecA) ≤ 0

Preferiblemente, la diferencia entre el Ct para la secuencia de ADN diana del gen mecA de SARM y/o SERM y el Ct para la secuencia de ADN diana de SERM diferente del gen mecA es < 0, más preferiblemente entre < 0 y -1, en particular entre -0,25 y -0,75. SARM está ausente en todas las otras condiciones. Normalmente, se combina el ADN de cepas de control con las sondas y/o los cebadores específicos y se amplifican en las mismas condiciones que las secuencias diana de ADN descritas anteriormente con el fin de determinar el Ct para cada secuencia diana de ADN. Como cepas de control, pueden usarse por ejemplo las cepas SARM, SERM, SESM, SASM, particularmente ATCC33591 (SARM), ATCC25923 (SASM), aislados clínicos de hisopos nasales (SERM) y ATCC12228 (SESM).

El término umbral de ciclo (Ct) usado en el presente documento se refiere al ciclo particular de amplificación que permite la detección inequívoca del producto amplificado calculado como 6-12 veces, preferiblemente 8 veces, la desviación estándar del fondo. El Ct para las secuencias diana de ADN se fija normalmente determinando el fondo para cada colorante fluorescente como el valor de fluorescencia promedio medido durante 3-18 ciclos, preferiblemente 3-12 ciclos. Después de la resta del fondo, puede calcularse el umbral de ciclo para la secuencia de ADN diana de SARM diferente de una secuencia de ADN diana del gen *mecA* como 6-12 veces, preferiblemente 8 veces, la desviación estándar del fondo. Puede realizarse un cálculo similar para la secuencia de ADN diana de SERM diferente de una secuencia de ADN diana del gen *mecA*. El valor umbral para la secuencia de ADN diana de SERM diferente de una secuencia de ADN diana del gen *mecA* puede compararse con el Ct obtenido de una cepa de control de SERM. El valor umbral para las secuencias diana de ADN del gen *mecA* pueden ajustarse entonces de modo que el Ct para las secuencias diana de ADN del gen *mecA* es igual al Ct para la secuencia de ADN diana de SARM diferente de una secuencia de ADN diana del gen *mecA*. Este ajuste se realiza normalmente comparando con el Ct para la secuencia de ADN diana del gen *mecA* y la secuencia de ADN diana de SARM diferente de una secuencia de ADN diana del gen *mecA* obtenida de una cepa de control de SARM. Normalmente, se usan 100 pg de ADN total de la cepa de control por serie de amplificación para determinar el Ct para la secuencia de ADN diana del gen *mecA*, para la secuencia de ADN diana de SARM y para la secuencia de ADN diana de SERM. Preferiblemente, se usa un control interno añadiendo normalmente 1-100 pg, preferiblemente 1 pg, de una secuencia de ADN diana diferente de una secuencia de ADN diana del gen *mecA*, preferiblemente una secuencia de ADN diana del gen *femA* de SASM, de una cepa de SASM tal como la cepa ATCC25923 (SASM), al tampón de reacción antes de llevar a cabo el método de amplificación. En el caso de que se use un control interno, la presencia y cantidad de SARM se indica normalmente cuando:

- 1) El Ct más pequeño para la secuencia de ADN diana del gen *mecA* de SARM y/o SERM < 40
- 2) El Ct más pequeño para la secuencia de ADN diana de SARM diferente del gen *mecA* < 40
- 3) La diferencia entre el Ct para la secuencia de ADN diana del gen *mecA* de SARM y/o SERM y el Ct para la secuencia de ADN diana de SERM diferente del gen *mecA* (Ct de la secuencia de ADN diana del gen *mecA* de SARM y/o SERM - Ct de la secuencia de ADN diana de SERM diferente del gen *mecA*) < 0.

SARM está ausente en todas las otras condiciones. En el caso de que se use un control interno, la presencia y cantidad de SARM se indica preferiblemente cuando la diferencia entre el Ct para la secuencia de ADN diana del gen *mecA* de SARM y/o SERM y el Ct para la secuencia de ADN diana de SERM diferente del gen *mecA* (Ct de la secuencia de ADN diana del gen *mecA* de SARM y/o SERM - Ct de la secuencia de ADN diana de SERM diferente del gen *mecA*) es de entre < 0 y -1, más preferiblemente entre -0,25 y -0,75. Por consiguiente, la adición de un control interno permite determinar sólo dos Ct, el Ct para la secuencia de ADN diana del gen *mecA* de SARM y/o SERM y el Ct para la secuencia de ADN diana de SERM diferente del gen *mecA*, con el fin de indicar la presencia y cantidad de SARM. El Ct para la secuencia de ADN diana de SARM diferente del gen *mecA* puede determinarse adicionalmente y debe ser < 40 para considerar la serie como válida.

Los objetos adicionales de la presente invención son cebadores y/o sondas específicas para una secuencia de ADN diana del gen *femA* de SARM seleccionadas de los cebadores que comprenden las SEQ ID No. 4 y 5 y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID No. 6, y los cebadores que comprenden las secuencias SEQ ID No. 10 y 11 y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID No. 12 y una secuencia complementaria de las mismas, y cebadores y/o sondas específicas para una secuencia de ADN diana del gen *femA* de SERM seleccionadas de los cebadores que comprenden las secuencias SEQ ID No. 7 y 8 y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID No. 9 y los cebadores que comprenden las secuencias SEQ ID No. 13 y 14 y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID No. 15 y una secuencia complementaria de las mismas.

Un objeto adicional de la presente invención es un kit de diagnóstico para la detección de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en una muestra que comprende cualquier combinación adecuada de ácidos nucleicos que tienen las secuencias de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID No. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15, una secuencia complementaria de las mismas, una parte de las mismas que tiene al menos 10, preferiblemente 15, más preferiblemente 20 nucleótidos de longitud y una variante de las mismas que comprende además los anticuerpos anti-proteína A mencionados anteriormente. Preferiblemente, el kit comprende además de los anticuerpos anti-proteína A mencionados anteriormente, perlas de vidrio.

Ejemplos

Ejemplo 1

Selección y síntesis de cebadores y sondas

Se seleccionaron las secuencias de ADN diana del gen *mecA* de SARM, del gen *femA* de SARM y del gen *femA* de SERM de la base de datos de secuencias Genbank. Se han alineado las secuencias de Genbank del gen *femA* de SERM (*femA*-SE, a partir de la secuencia U23713 de Genbank) y del *femA* de SARM (*femA*-SA, a partir de la secuencia X17688 de Genbank) usando el método de alineamiento "Clustal" (Facultad de Medicina Baylor) y se detectaron las regiones que muestran el nivel más bajo de homología. Se ha realizado la investigación de cebadores y sondas, restringida a esas secuencias parciales usando "Primer Express" (software de Perkin Elmer desarrollado para aplicaciones Taqman®). Se diseñaron las sondas y los cebadores con el objetivo de generar fragmentos de PCR cortos (aproximada-

ES 2 281 520 T3

mente 100 +/- 50 nucleótidos). Se diseñaron las sondas y los cebadores específicos para las secuencias de ADN diana de femA-SA y de femA-SE para consistir en nucleótidos que contienen al menos > 3 apareamientos erróneos para discriminar entre la secuencia de femA-SA y femA-SE. Preparaciones puras de ADN de las cepas control ATCC25923 (SASM) y ATCC12228 (SESM) permitieron someter a prueba la especificidad de los cebadores/sondas seleccionados. No se registró reacción cruzada en el ensayo de amplificación Taqman[®], usando las sondas y/o los cebadores descritos. Las secuencias SEQ ID No. 4, 5 y 6 amplificaron la región del nucleótido 651 hasta 788 de femA-SA. Las secuencias SEQ ID No. 7, 8 y 9 amplificaron la región del nucleótido 1403 hasta 1547 de femA-SE. Las secuencias SEQ ID No. 10, 11 y 12 amplificaron la región del nucleótido 1600 hasta 1694 de femA-SA. Las secuencias SEQ ID No. 13, 14 y 15 amplificaron la región del nucleótido 1315 hasta 1414 de femA-SE. La región amplificada del gen mecA fue de 321 a 419 (mecA, a partir de la secuencia Y14051 de Genbank). Basándose en las secuencias conocidas del gen mecA, esta región está altamente conservada para *Staphylococcus aureus* (Y14051) y *Staphylococcus epidermidis* (secuencia X52592 de Genbank). Se han sintetizado y marcado con fluorescencia todos los nucleótidos por Eurogentec (Seraing, Bélgica) usando el sintetizador automático Expedite[™]. La técnica de purificación se basó en un sistema de cromatografía desarrollado internamente (Eurogentec), que conduce a un rendimiento equivalente o mejor que el obtenido usando HPLC. Se entregaron todos los nucleótidos (OliGold[™]) liofilizados, se desproteccionaron y purificaron mediante cromatografía en fase inversa. También se comprobó la ausencia de sales, amonio y residuos ácidos. Se controló la calidad de todos los reactivos usados para la síntesis de oligonucleótidos tal como se describe en el catálogo de Glen Research. Se acoplan los colorantes usados FAM, TET, HEX, JOE o Texas Red[®] (unidos al extremo 5' de la sonda) y el extintor TAMRA o DABCYL (unido al extremo 3') usando la fosforamida apropiada o derivados de succinimidil éster (FAM: 6-carboxifluoresceína, TAMRA: 6-carboxi-N,N,N',N'-tetrametilrodamina, HEX: 6-carboxi-2',4,4',5',7,7'-hexaclorofluoresceína, TET: 6-carboxi-4,7,2',7'-tetracloro-fluoresceína, JOE: 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína, DABCYL: ácido (4-((4-(dimetilamino)fenil)azo)benzoico, o Texas Red[®]). Se sometieron a prueba los cebadores y las sondas para determinar si son mutuamente compatibles entre sí así como con los otros conjuntos de cebadores y sondas (multiplexación) con el fin de evitar autohibridación o hibridación entre diferentes cebadores y/o sondas, formación de bucles y sitios de cebado falsos. Después, se sometieron a prueba los cebadores y sondas en parejas para evaluar su sensibilidad y especificidad. Después se combinaron en diferentes concentraciones (50-900 nM) para definir las condiciones de reacción óptimas.

Ejemplo 2

Precondicionamiento de las muestras

Se recogieron muestras que consistían en hisopos nasales/inguinales y posiblemente se reunieron para cada paciente suspendiéndolos en medio CS (Infusión Cerebro-Corazón con colistina y NaCl al 2,5%). Un estudio preliminar mostró que este medio bacteriano enriquecido en sal, y agentes nutritivos y bactericidas no influía en las etapas posteriores y actuaba igual de bien que la solución salina (NaCl al 0,9%). Después se complementaron estas muestras (1 ml) con 50 μ l de albúmina de suero humano al 20% (grado inyectable de la Cruz Roja Suiza). El precondicionamiento de las muestras necesitó aproximadamente 5 min.

Enriquecimiento de la muestra

Después se añadieron a todas las muestras 1,5 μ l de un anticuerpo monoclonal biotinilado de ratón creado contra la proteína A estafilocócica, seguido de 45 minutos de incubación en un agitador orbital en condiciones de temperatura ambiente. Después se centrifugaron las muestras durante 10 min a 5000 g. Se eliminó el sobrenadante antes de añadir 200 μ l de solución salina tamponada con fosfato que contenía albúmina de suero humano al 1% (PBS-HSA). Se mezclaron las muestras con 10 μ l de perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina ($\phi = 1 \mu$ m, Merck) y se incubaron en el agitador orbital durante 45 minutos en condiciones ambientales. Después se transfirieron las muestras a una placa de 96 pocillos y se mantuvieron en un soporte magnético durante 5 minutos (Milian). Se eliminó el sobrenadante y se enjuagaron las perlas paramagnéticas dos veces en PBS-HSA. El enriquecimiento de la muestra necesitó aproximadamente 95 min.

Lisis bacteriana y liberación de ADN

Después se suspendieron las perlas paramagnéticas en la placa de 96 pocillos en 400 μ l de tampón caotrópico (tampón ATL del kit QIamp, Qiagen) y se transfirieron a tubos eppendorf limpios. Se añadieron cien miligramos de perlas de vidrio ($\phi = 100-200 \mu$ m, Schieritz and Hauenstein AG, CH-4144 Arlesheim) y se lisaron las bacterias usando un aparato de mezcla (Mixer Mill, Qiagen) con 2 ciclos de homogenización de 45 segundos cada uno. Tras 10 minutos de centrifugación a 5000 g, la fase líquida se colocó en tubos limpios y se mezcló con 200 μ l de etanol puro a temperatura ambiente. Se inmovilizó el ADN en columnas QIamp (Qiagen), se enjuagaron según lo descrito por el fabricante y se eluyeron en un volumen de 100 μ l de agua pura. Se secaron entonces los extractos en un evaporador (UniVapo 100H, UniEquip) durante 1 hora y se resuspendieron en 20 μ l de agua pura. La lisis bacteriana y liberación de ADN necesitó aproximadamente 30 min.

Análisis y detección mediante PCR en tiempo real de ácidos nucleicos

Se analizó por triplicado cada muestra que contenía el ADN liberado, para determinar la robustez del análisis. La detección y el análisis necesitaron aproximadamente 150 min. Se usó el sistema TaqMan[™] (Perkin Elmer) junto con la ADN polimerasa Hot GoldStar Taq (Eurogentec) para la amplificación de las muestras.

A. Dianas amplificadas

Tabla 1

	A	B	C
	Cebador directo	Cebador inverso	Sonda
1	mecA CATTGATCGCAACGGTTCAATTT	TGGTCTTTCTGCATTCCTGGA	TGTGGAAGTTAGATTGGGATCAT AGCGTCAT
2	femA-SA TGCCTTTACAGATAGCATGCCA	AGTAAGTAAGCAAGCTGCAA TGACC	TCATTTACGCCAANAACCTGTTGGCC ACTATG
3	femA-SE CMACTGGATGCMAATCAGCAA	GAACCGCATAGCTCCCTGC	TACTACGGCTGGTGGAACTTCAA TCGTTATCG

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

ES 2 281 520 T3

El cebador directo A1 se corresponde con la SEQ ID No. 1. El cebador inverso B1 se corresponde con la SEQ ID No. 2. La sonda C1 se corresponde con la SEQ ID No. 3. El cebador directo A2 se corresponde con la SEQ ID No. 4. El cebador inverso B2 se corresponde con la SEQ ID No. 5. La sonda C2 se corresponde con la SEQ ID No. 6. El cebador directo A3 se corresponde con la SEQ ID No. 7. El cebador inverso B3 se corresponde con la SEQ ID No. 8. La sonda C3 se corresponde con la SEQ ID No. 9.

El volumen final de la mezcla de PCR fue de 25 μ l y contenía los siguientes compuestos:

- Tampón de reacción 2 X: 12,5 μ l (comercializado por Eurogentec)
- A1: 75 nM, B1: 75 nM y C1: 100 nM
- A2: 100 nM, B2: 100 nM y C2: 100 nM
- A3: 100 nM, B3: 100 nM y C3: 100 nM
- 6 μ l de la muestra y se llevó a cabo inmediatamente la serie de amplificación.

Los colorantes fluorescentes unidos a las sondas fueron los siguientes:

C1 (mecA)	5'-HEX y 3'-TAMRA
C2 (femA-SA)	5'-FAM y 3'-TAMRA
C3 (femA-SE)	5'-TET y 3'-TAMRA

B. Condiciones de amplificación

Se ha desarrollado el ensayo según las especificaciones de Applied Biosystems, excepto que se usaron 50 ciclos para aumentar la sensibilidad (sin pérdida de especificidad)

incubación 1 →	2 min a 50°C
incubación 2 →	10 min a 95°C
incubación 3 →	15 s a 95°C
incubación 4 →	1 min a 60°C

(3 y 4 se repitieron 50 veces)

C. Análisis

Tras la inspección visual de los datos obtenidos, se determinó el fondo para cada indicador fluorescente como el valor de fluorescencia promedio medido durante los ciclos 3-12. Tras la resta del fondo, se calculó el valor umbral para femA-SA como de 6-12 veces (preferiblemente 8 veces) la desviación estándar del fondo. Se llevó a cabo un cálculo similar para femA-SE. Se determinó el Ct para femA-SE usando 100 pg de ADN/pocillo de la cepa control SERM (aislado de un hisopo nasal) en las mismas condiciones que se describieron en A y B. Después se ajustó el valor umbral para mecA de forma que el Ct para mecA = Ct para femA-SA. Se llevó a cabo esta determinación usando 100 pg de ADN/pocillo de la cepa control SARM (ATCC33591) en las mismas condiciones que se describieron en A y B. Se determinó el Ct más pequeño entre los triplicados de cada secuencia diana de ADN a partir de las capturas de pantalla obtenidas para femA-SA, mecA y femA-SE. SARM estaba presente cuando se cumplieron todas las condiciones siguientes:

- 1) El Ct más pequeño para mecA < 40
- 2) El Ct más pequeño para femA-SA < 40
- 3) El Ct para mecA - el Ct para femA-SE \leq 0

SARM estaba ausente en todas las otras condiciones.

Ejemplo 3

Método alternativo para la lisis bacteriana y liberación de ADN

De forma alternativa, se llevó a cabo la lisis bacteriana y liberación de ADN del ejemplo 1 de la manera siguiente:

a) Se llevó a cabo la lisis bacteriana usando perlas de vidrio en una disolución de cloruro sódico (NaCl) al 0,9%. Tras la lisis, se descarta el sobrenadante y se resuspenden las perlas en de 200 a 400 μ l de agua pura. Tras agitación vigorosa, se concentró el ADN eluido (ahora en la fase líquida) mediante evaporación, se solubilizó en 20 μ l de agua pura y se usó directamente en el ensayo de amplificación Taqman®.

ES 2 281 520 T3

b) Tras la lisis bacteriana en presencia de NaCl al 0,9%, se enjuagaron las perlas dos veces con la misma disolución, después se suspendieron con 100 μ l de solución salina. Se introdujeron directamente alícuotas de 6 ml de la suspensión de perlas en el ensayo de amplificación Taqman®.

5 c) Se llevó a cabo la lisis bacteriana suspendiendo perlas de vidrio en de 200 a 400 μ l de agua pura. Tras agitación vigorosa, se concentró el ADN eluido (ahora en la fase líquida) mediante evaporación, se solubilizó en 20 μ l de agua y se usó directamente en el ensayo de amplificación Taqman®.

Ejemplo 4

10 *Evaluación de la sensibilidad*

Los experimentos que usan muestras a las que se había añadido cantidades conocidas de SARM y SERM revelaron una especificidad del cien por cien y una sensibilidad de 1 copia del genoma. Se ha sometido a prueba un amplio intervalo de cantidades añadidas conocidas de desde 10 ng hasta 0,1-0,2 fg/reacción (1 copia del genoma equivale a 1,65 x 10⁻¹⁵ g).

Ejemplo 5

20 *Comparación de la detección molecular con los procedimientos basados en cultivo convencionales*

Un estudio a media escala (38 muestras tratadas simultáneamente) que compara la detección molecular con los procedimientos basados en cultivos convencionales (llevado a cabo por el Laboratorio Central de Microbiología, LCB, Hospital Universitario de Ginebra) permitió la detección de todos los casos de cultivos positivos (11/11). Se encontró que dos muestras negativas mediante cultivo eran positivas usando la técnica molecular del ejemplo 1. Para estos dos pacientes el LCB encontró la presencia de SARM en otro sitio de muestreo.

Ejemplo 6

30 *A. Enriquecimiento paramagnético de muestras mixtas que contienen SARM y SERM*

Se añadieron adiciones conocidas a las muestras con diferentes razones de SARM y SERM (desde 1/1 hasta 1/1000). Después, o bien se lisaron directamente las muestras (protocolo A) o bien se enriquecieron mediante el método descrito en el ejemplo 1 usando anticuerpos anti-proteína A y perlas paramagnéticas (protocolo b) y se sometieron a amplificación tal como se describió en el ejemplo 2. Los resultados obtenidos mostraron que para la razón 1/1 y en lugar de las etapas adicionales del protocolo b, se aumentaron los Ct en 1-2 ciclos sin enriquecimiento (protocolo a). Esto implica un aumento de la sensibilidad del protocolo b con respecto al protocolo a. Para la razón 1/5 el Ct para femA-SA se aumentó desde 2-2,5 ciclos sin enriquecimiento (protocolo a). El aumento de la sensibilidad fue más sorprendente cuando la razón SARM/SERM disminuyó. Para razones inferiores a 1/5 no se registró señal usando el protocolo a en el intervalo sometido a prueba de las bacterias a las que se habían añadido cantidades conocidas. Usando el protocolo b no se registró señal significativa para femA-SE incluso con razones inferiores a 1/5, indicando un enriquecimiento excelente incluso en presencia de un gran exceso de SERM.

45 *B. Detección de SARM y SERM en presencia de Pseudomonas aeruginosa*

Se basó este experimento en una situación encontrada con frecuencia en el diagnóstico clínico en la que los pacientes son colonizados por *Pseudomonas aeruginosa*. Siempre que se añadieron cantidades conocidas de *Pseudomonas aeruginosa* a las razones tal como se indicó en A, no pudo registrarse ninguna señal de femA SA a menos que se usara el protocolo b. Para todas las condiciones que usan el protocolo b, el Ct de femA SA y el Ct de mecA fueron casi idénticos y la interpretación era sencilla, subyacente a la necesidad absoluta de esta etapa para la detección sensible y exacta.

Ejemplo 7

Se llevó a cabo el acondicionamiento y enriquecimiento de la muestra tal como se describió en el ejemplo 2, excepto que la muestra se suspendió en PBS y entonces se complementó con 50 μ l de albúmina de suero humano al 20% (grado inyectable de la Cruz Roja Suiza). Se llevó a cabo la lisis bacteriana y liberación de ADN tal como se describió en el ejemplo 3a) excepto que la muestra enriquecida se resuspendió en 50 μ l de agua pura antes de añadir las perlas de vidrio. Tras la ruptura de la fuerza de cizalladura, se añadió directamente el ADN contenido en la fase líquida (10 μ l) a la mezcla de amplificación y se sometió al ensayo de amplificación Taqman®.

60 *Análisis y detección mediante PCR en tiempo real de ácidos nucleicos*

Se analizó por triplicado cada muestra que contenía el ADN liberado, para determinar la solidez del análisis. La detección y el análisis necesitaron aproximadamente 150 min. Se usó el ciclador del sistema de detección de secuencias ABI Prism (Applied Biosystems) junto con la ADN polimerasa Hot GoldStar Taq (Eurogentec) para la amplificación de las muestras.

A. Dianas amplificadas

Tabla 2

	A	B	C
	Cebador directo	Cebador inverso	Sonda
1	mecA CAITGATCGCAACGTTCAATTT	TGGTCTTCTGCAATTCCTGGA	TGTGGAAGTTAGATTGGGATCA TAGCGTCAT
4	femA-SA GCTGGTGGTACATCAAATGCA	CGGTCAATGCCATGATTTAATG	TCATTTTGGCCGGAAGTTATGCA GTGCA
5	femA_SE CCCATCTCTGCTGGCTTCTTT	CCGCATAGCTCCCTGCAA	CGCTGGTGGAACTTCAAATCGT TATCG

ES 2 281 520 T3

El cebador directo A1 se corresponde con la SEQ ID No. 1. El cebador inverso B 1 se corresponde con la SEQ ID No. 2. La sonda C1 se corresponde con la SEQ ID No. 3. El cebador directo A4 se corresponde con la SEQ ID No. 10. El cebador inverso B4 se corresponde con la SEQ ID No. 11. La sonda C4 se corresponde con la SEQ ID No. 12. El cebador directo A5 se corresponde con la SEQ ID No. 13. El cebador inverso B5 se corresponde con la SEQ ID No. 14. La sonda C5 se corresponde con la SEQ ID No. 15.

El volumen final de la mezcla de PCR fue de 25 μ l y contenía los siguientes compuestos:

- Tampón de reacción 2 X: 12,5 μ l (comercializado por Eurogentec)
- A1: 100 nM, B1: 100 nM y C1: 75 nM
- A4: 50 nM, B4: 50 nM y C4: 50 nM
- A5: 400 nM, B5: 400 nM y C5: 100 nM
- 10 μ l de la muestra y se llevó acabo inmediatamente la serie de amplificación.

Los colorantes fluorescentes unidos a las sondas fueron los siguientes:

C1 (mecA)	5'-JOE y 3'-DABCYL
C4 (femA-SA)	5'-FAM y 3'-DABCYL
C5 (femA-SE)	5'-Texas Red® y 3'-DABCYL

B. Condiciones de amplificación:

Se ha desarrollado el ensayo según las especificaciones de Applied Biosystems, excepto que se usaron 50 ciclos para aumentar la sensibilidad (sin pérdida de especificidad).

incubación 1 →	2 min a 50°C
incubación 2 →	10 min a 95°C
incubación 3 →	15 s a 95°C
incubación 4 →	1 min a 60°C
(3 y 4 se repitieron 50 veces)	

C. Análisis

Tras la inspección visual de los datos, se determinó el fondo para cada indicador fluorescente como el valor de fluorescencia promedio medido durante los ciclos 3-12. Tras la resta del fondo, se calculó el valor umbral para cada indicador fluorescente como 6-12 veces (preferiblemente 8 veces) la desviación estándar del fondo. Se llevó a cabo un cálculo similar para femA-SE. Se determinó el Ct para femA-SE usando 100 pg de ADN/pocillo procedente de la cepa control SERM (aislado de un hisopo nasal) en las mismas condiciones que se describieron en A y B. Después se ajustó el valor umbral para mecA de forma Ct para mecA = Ct para femA-SA. Se llevó a cabo esta determinación usando 100 pg de ADN/pocillo procedente de la cepa control SARM (ATCC33591) en las mismas condiciones que se describieron en A y B. Se determinó el Ct más pequeño entre los triplicados de cada secuencia diana de ADN a partir de las capturas de pantalla obtenidas para femA-SA, mecA y femA-SE. SARM estaba presente cuando se cumplieron todas las condiciones siguientes:

- 1) El Ct más pequeño para mecA < 40
- 2) El Ct más pequeño para femA-SA < 40
- 3) El Ct para mecA - Ct para femA-SE < 0

SARM estaba ausente en todas las otras condiciones.

Ejemplo 8

Con fines comparativos, se analizaron las mismas muestras que se usaron en el ejemplo 7 en paralelo usando los cebadores y las sondas del ejemplo 2 sección A (tabla 1) así como los cebadores y las sondas del ejemplo 7 sección A (tabla 2).

ES 2 281 520 T3

Resultados usando los cebadores y las sondas de Ejemplo 2:

	Ct femA-SA	Ct mecA	Ct femA-SE
SARM	31,5	31,5	50
SASM	32	50	50
SERM	50	30	30
SESM	50	50	28,6

Resultados usando los cebadores y las sondas del ejemplo 7:

	Ct femA-SA	Ct mecA	Ct femA-SE
SARM	27	27	50
SASM	27,5	50	50
SERM	50	26	26
SESM	50	50	26

Los cebadores y las sondas usados en el ejemplo 7 proporcionaron una interpretación similar pero ofrecieron un aumento de la sensibilidad, es decir, valores de Ct más pequeños para los tres genes diana analizados.

Ejemplo 9

Se llevó a cabo el ejemplo 9 tal como el ejemplo 7 excepto que se añadió 1 pg de ADN genómico extraído de la cepa SASM ATCC25923 como control interno al tampón de reacción. Tras la amplificación, se llevó a cabo el análisis basándose en el Ct obtenido para mecA y el Ct para femA-SE. Se sometieron a prueba distintas cantidades de adiciones conocidas que oscilaban desde 100 pg hasta 1 pg y se confirmó la linealidad de la determinación dentro de este intervalo de concentraciones, los Ct para femA-SA fueron 24 y 30-31, respectivamente. Se llevó a cabo la detección y el análisis o bien en el sistema de detección de secuencias ABI Prism (Applied Biosystems) o bien en el Smart Cycler (Cepheid). Ambos proporcionaron resultados lineales similares. Se indicó la presencia y cantidad de SARM cuando la diferencia entre el Ct para mecA - el Ct para femA-SE < 0. SARM estuvo ausente en todas las otras condiciones. Aprovechando 1 pg de ADN genómico de adición conocida de SASM, se midió el Ct para femA-SA para confirmar que la amplificación había funcionado correctamente.

REIVINDICACIONES

5 1. Método para la detección y cuantificación de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina a partir de una muestra que comprende:

- 10 a) poner en contacto la muestra con anticuerpos anti-proteína A de manera que adsorba *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y/o *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina,
- 15 b) separar dichos anticuerpos a los que se han adsorbido *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y/o *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina a partir de la muestra,
- 20 c) lisar *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y/o *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina adsorbidos a dichos anticuerpos de manera que liberen su ADN,
- 25 d) combinar el ADN liberado con (i) sondas y/o cebadores que son específicos para una secuencia de ADN diana del gen *mecA* de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y/o de *Staphylococcus epidermis* resistente a meticilina, (ii) sondas y/o cebadores que son específicos para una secuencia de ADN diana de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina diferente de una secuencia de ADN diana del gen *mecA* y (iii) sondas y/o cebadores que son específicos para una secuencia de ADN diana de *Staphylococcus epidermis* resistente a meticilina diferente de una secuencia de ADN diana del gen *mecA*, por lo cual las secuencias de ADN diana de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y de *Staphylococcus epidermis* resistente a meticilina no son homólogas,
- 30 e) someter el ADN liberado combinado y las sondas y/o los cebadores específicos a condiciones que permiten la amplificación de dichas secuencias de ADN diana,
- f) detectar la presencia y cantidad de las secuencias de ADN diana amplificadas como indicación de la presencia y cantidad de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

35 2. Método según la reivindicación 1, en el que *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y/o *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina se lisan mediante aplicación de fuerzas de cizalladura.

40 3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el ADN liberado se combina con (i) sondas y cebadores que son específicos para una secuencia de ADN diana del gen *mecA* de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y/o de *Staphylococcus epidermis* resistente a meticilina, (ii) sondas y cebadores que son específicos para una secuencia de ADN diana de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina diferente de una secuencia de ADN diana del gen *mecA* y (iii) sondas y cebadores que son específicos para una secuencia de ADN diana de *Staphylococcus epidermis* resistente a meticilina diferente de una secuencia de ADN diana del gen *mecA*.

45 4. Método según las reivindicaciones 1 a 3, en el que las sondas y/o los cebadores específicos para una secuencia de ADN diana del gen *mecA* de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y/o de *Staphylococcus epidermis* resistente a meticilina se seleccionan a partir de los cebadores que comprenden las secuencias SEQ ID No. 1 y 2 y la sonda que comprende la SEQ ID No. 3, una secuencia complementaria de la misma, una parte de la misma que tiene al menos 10 nucleótidos de longitud y una variante de la misma.

50 5. Método según las reivindicaciones 1 a 4, en el que las sondas y/o los cebadores que son específicos para una secuencia de ADN diana de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina diferente de una secuencia de ADN diana del gen *mecA* son sondas y/o cebadores, una secuencia complementaria de los mismos, una parte de los mismos que tiene al menos 10, preferiblemente 15, más preferiblemente 20 nucleótidos de longitud y una variante de los mismos que son específicos para una secuencia de ADN diana del gen *femA* de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

55 6. Método según las reivindicaciones 1 a 5, en el que las sondas y/o los cebadores que son específicos para una secuencia de ADN diana de *Staphylococcus epidermis* resistente a meticilina diferente de una secuencia de ADN diana del gen *mecA* son sondas y/o cebadores, una secuencia complementaria de los mismos, una parte de los mismos que tiene al menos 10, preferiblemente 15, más preferiblemente 20 nucleótidos de longitud y una variante de los mismos que son específicos para una secuencia de ADN diana del gen *femA* de *Staphylococcus epidermis* resistente a meticilina.

60 7. Método según las reivindicaciones 1 a 6, en el que la presencia y la cantidad de las secuencias de ADN diana amplificadas se detectan mediante PCR en tiempo real.

65 8. Método según la reivindicación 7, en el que se detecta el umbral del ciclo de las secuencias de ADN diana amplificadas por el cual la diferencia de los umbrales del ciclo obtenidos para la secuencia de ADN diana del gen *mecA* de SARM y/o SERM y obtenidos para la secuencia de ADN diana de *Staphylococcus epidermis* resistente a meticilina diferente del gen *mecA* indica la presencia y cantidad de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

ES 2 281 520 T3

9. Cebadores y/o sondas específicos para una secuencia de ADN diana del gen femA de SARM seleccionados de los cebadores que comprenden las secuencias SEQ ID No. 4 y 5 y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID No. 6, y los cebadores que comprenden las secuencias SEQ ID No. 10 y 11 y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID No. 12, y una secuencia complementaria de los mismos.

5

10. Cebadores y/o sondas específicos para una secuencia de ADN diana del gen femA de SERM seleccionados de los cebadores que comprenden las secuencias SEQ ID No. 7 y 8 y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID No. 9, y los cebadores que comprenden las secuencias SEQ ID No. 13 y 14 y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID No. 15, y una secuencia complementaria de los mismos.

10

11. Kit de diagnóstico para la detección de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en una muestra que comprende cualquier combinación adecuada de los ácidos nucleicos que tienen la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID No 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15, una secuencia complementaria de las mismas, una parte de las mismas que tiene al menos 10 nucleótidos de longitud y una variante de las mismas en la que el kit comprende además anticuerpos anti-proteína A.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 281 520 T3

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> Schrenzel, Jacques Francois, Patrice	
	<120> Método para la detección directa de SARM	
10	<130> 13278	
	<140>	
	<141>	
15	<160> 15	
	<170> PatentIn Ver. 2.1	
20	<210> 1	
	<211> 22	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador específico para una secuencia de ADN diana del gen mecA de SARM y/o SERM	
	<400> 1	
35	cattgatcgc aacgttcaat tt	22
	<210> 2	
	<211> 21	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador específico para una secuencia de ADN diana del gen mecA de SARM y/o SERM	
	<400> 2	
50	tggtcttct gcattctgg a	21
	<210> 3	
	<211> 31	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de secuencia artificial: Sonda específica para una secuencia de ADN diana del gen mecA de SARM y/o SERM	
	<400> 3	
65	tgtggaagtt agattgggat catagcgtca t	31

ES 2 281 520 T3

	<223> Descripción de secuencia artificial: Sonda específica para una secuencia de ADN diana del gen femA de SARM	
	<400> 12	
5	tcattttgcc ggaagttatg cagtgca	27
	<210> 13	
10	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador específico para una secuencia diana del gen femA de SERM	
	<400> 13	
20	cccatctctg ctggettctt t	21
	<210> 14	
25	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador específico para una secuencia de ADN diana del gen femA de SERM	
35	<400> 14	
	ccgcatagct ccctgcaa	18
40	<210> 15	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: Sonda específica para una secuencia de ADN diana del gen femA de SERM	
50	<400> 15	
	cgctggtgga acttcaaac gttatcg	27
55		
60		
65		