

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 994 737**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/689** (2008.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2015** E 21186118 (2)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2024** EP 3957753

54 Título: **Cebadores y sondas de reacción en cadena de la polimerasa para Mycobacterium tuberculosis**

30 Prioridad:

**10.10.2014 US 201462062351 P**

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

**30.01.2025**

73 Titular/es:

**RUTGERS, THE STATE UNIVERSITY OF NEW JERSEY (100.00%)  
83 Somerset Street  
New Brunswick, NJ 08901, US**

72 Inventor/es:

**ALLAND, DAVID y  
CHAKRAVORTY, SOUMITESH**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 994 737 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**

Cebadores y sondas de reacción en cadena de la polimerasa para *Mycobacterium tuberculosis*

**Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

5 La solicitud reivindica prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. No. 62/062.351, presentada el 10 de octubre de 2014.

**Intereses gubernamentales**

La invención divulgada en la presente memoria se realizó, al menos en parte, con apoyo gubernamental bajo las Subvenciones NO. U01AI082174 y R01AI080653 de los Institutos Nacionales de Salud. Por consiguiente, el Gobierno de los EE. UU. tiene ciertos derechos en esta invención.

**10 Campo de la invención**

Esta invención se refiere a nuevos cebadores y sondas de baliza molecular descuidadas (SMB) y baliza molecular (MB) para amplificar y detectar segmentos de diferentes genes en *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*) con el fin de identificar la presencia de ADN de *M.tb* e identificar la resistencia a los fármacos antituberculosos.

**Antecedentes de la invención**

15 La tuberculosis (TB) se declaró una emergencia pública global hace casi veinte años (WHO Global Tuberculosis Report 2013). Aunque la tasa de nuevos casos de TB ha ido disminuyendo en todo el mundo, es poco probable que se consiga el objetivo de desarrollo del milenio de una reducción del 50 % de la enfermedad en 2015 (WHO Global Tuberculosis Report 2013). Un aumento en la incidencia de TB resistente a múltiples fármacos (MDR) y ampliamente resistente a fármacos (XDR) es una amenaza grave para estos objetivos de reducción (WHO Global Tuberculosis Report 2013).

20 La TB MDR se define como TB resistente al tratamiento con al menos rifampicina e isoniazida y la TB XDR se define como TB MDR que es resistente adicionalmente al tratamiento con la clase de antibióticos fluoroquinolonas y los fármacos inyectables amikacina, kanamicina y capreomicina. Es mejor identificar a los pacientes con TB resistente a fármacos lo más rápidamente posible de modo que se pueda iniciar rápidamente el control y los tratamientos de infección apropiados Boehme, C. C., et al, 2011, Lancet 377:1495-1505.

25 Los métodos fenotípicos convencionales pueden tardar de semanas a meses para definir completamente el patrón de resistencia a fármacos de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) debido al crecimiento muy lento de esta bacteria (Heifets, L., et al., J Clin Microbiol 38:1227-1230; Kim, S. J., 2005, Eur Respir J 25:564-569; y PT, K., y K, GP., 1985, Public health Mycobacteriology: A guide for level III laboratory. Centro para el control de enfermedades, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Atlanta, Georgia.). Los ensayos moleculares ofrecen la promesa de una detección más rápida de la resistencia a los fármacos. *Mtb* no contiene naturalmente plásmidos de resistencia a fármacos; por tanto, los ensayos moleculares se dirigen contra ADN cromosómico. Los ensayos genotípicos son relativamente fáciles de diseñar porque el genoma de *Mtb* tiene un grado muy alto de conservación de secuencia. Prácticamente todos los aislados clínicos de *Mtb* susceptibles a fármacos tienen secuencias de ADN idénticas en dianas de resistencia a fármacos, excepto por unos pocos "polimorfismos naturales" fácilmente identificados. Se deduce que cualquier desviación de la secuencia de tipo salvaje en un gen diana de resistencia a fármacos indica la presencia de resistencia a fármacos al fármaco correspondiente. Los ensayos genotípicos son más rápidos y sensibles que los ensayos fenotípicos porque las dianas de ADN pueden amplificarse por PCR. Los peligros biológicos pueden minimizarse mediante la muerte temprana de organismos infecciosos.

40 Las dianas genéticas que representan la mayoría de los casos de resistencia a fármacos en la TB están ahora bien establecidas. La PCR en tiempo real sigue siendo el método más sensible, rápido y robusto para detectar mutaciones en bacterias. Prácticamente todos los demás métodos de detección de mutaciones, incluyendo PCR-MS, micromatrices, minimatrices y secuenciación de próxima generación, requieren la amplificación de ácidos nucleicos como primera etapa en el proceso de detección. Por el contrario, la PCR en tiempo real permite que la amplificación, detección y análisis de la muestra se realicen en un único pocillo. Los tubos no tienen que abrirse, no se requieren fluidos complejos. Sin embargo, nadie ha sido capaz de desarrollar una metodología amplia de ensayo de resistencia a fármacos que sea lo suficientemente simple y robusta para ser realizada fuera de los laboratorios de referencia. Por tanto, existe la necesidad de nuevos cebadores y sondas para la detección de *M.tb* y la resistencia a fármacos de *M.tb* a los fármacos de primera y segunda línea usados más comúnmente.

**Sumario de la invención**

50 Esta invención se refiere a cebadores, sondas y usos relacionados en la detección de *M.tb* y la resistencia a fármacos de *M.tb*.

En un aspecto, la invención proporciona un kit como se define en la reivindicación 1.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un método como se define en la reivindicación 10.

En un tercer aspecto, la invención proporciona un método como se define en la reivindicación 11.

También se describe un conjunto de oligonucleótidos aislado o conjunto de cebadores para amplificar una porción de una región de *M. tuberculosis* seleccionada del grupo que consiste en gen *rpoB*, gen *gyrA*, gen *gyrB*, promotor de *inhA*, gen *rrs*, promotor de *eis*, gen *embB*, gen *katG*, gen *dosR*, gen IS6110, gen IS 1081. El conjunto incluye un par de cebadores directos e inversos específicos para la porción, donde cada cebador tiene una secuencia que es sustancialmente idéntica a una secuencia de oligonucleótidos seleccionada de las enumeradas en las Tablas 1A y 1B a continuación. Por consiguiente, cada cebador tiene una secuencia que es sustancialmente complementaria al complemento de la secuencia de oligonucleótidos seleccionada de las enumeradas en las tablas. En algunas realizaciones, la secuencia del cebador es idéntica a la secuencia de oligonucleótidos seleccionada de las enumeradas en las Tablas 1A y 1B.

También se describe un ácido nucleico aislado que tiene una secuencia que es sustancialmente idéntica a la seleccionada de las enumeradas en la Tabla 2. En algunas realizaciones, el ácido nucleico incluye la secuencia de una seleccionada de las enumeradas en la Tabla 2. El ácido nucleico puede marcarse con, por ejemplo, un fluoróforo y un apantallador en sus dos extremos respectivamente, o un fluoróforo unido a un nucleótido interno en la sonda. Los ejemplos de los fluoróforos incluyen fluoresceína, cianina 5, o TexasRed, y TAMRA. Los ejemplos de los apantalladores incluyen BHQ1, BHQ2 y DABCYL.

También se describe un kit que contiene uno o más del conjunto de oligonucleótidos y ácido nucleico descritos anteriormente. El kit puede incluir además una ADN polimerasa, nucleótidos de extensión y un tampón.

También se describe un método para detectar resistencia a fármacos en *M. tuberculosis*. El método incluye etapas de amplificar una primera secuencia diana de ácido nucleico con un primer par de cebadores para generar un primer amplicón, donde (i) el primer par de cebadores es específico para una porción de una región seleccionada del grupo que consiste en gen *rpoB*, gen *gyrA*, gen *gyrB*, promotor de *inhA*, gen *rrs*, promotor de *eis*, gen *embB*, y gen *katG* y (ii) cada cebador tiene una secuencia que es sustancialmente idéntica a una secuencia de oligonucleótidos seleccionada de las enumeradas en las Tablas 1A y 1B, y detectar una mutación en el primer amplicón. La presencia de la mutación es indicativa de la resistencia a fármacos. En el método, la etapa de detección puede llevarse a cabo mediante diversas técnicas de detección de ácidos nucleicos conocidas en la técnica, incluyendo, por ejemplo, técnicas basadas en secuenciación y técnicas basadas en hibridación de sondas de ácido nucleico o ácido nucleico peptídico.

En una descripción, la etapa de detección se realiza mediante un proceso que comprende (i) poner en contacto el primer amplicón con una primera sonda específica para la mutación en condiciones que conducen a una hibridación para formar un híbrido sonda-diana; (ii) realizar un análisis de la temperatura de fusión ( $T_m$ ) para determinar un valor de  $T_m$  de ensayo para el híbrido sonda-diana; y (iii) comparar el valor de  $T_m$  de ensayo con un valor de  $T_m$  de referencia predeterminado. El valor de  $T_m$  de ensayo, si es diferente del valor de  $T_m$  predeterminado, indica la presencia de la mutación. Por ejemplo, un desplazamiento en el valor de  $T_m$  de ensayo de al menos 3 (por ejemplo, 3, 4, o 5) desviaciones estándar del valor de  $T_m$  de referencia indican la presencia de la mutación. Por el contrario, un desplazamiento en el valor de  $T_m$  de ensayo de menos de 3 desviaciones estándar del valor de  $T_m$  de referencia indica la ausencia de la mutación. Como se divulga en la presente memoria, el valor de  $T_m$  de referencia predeterminado puede ser el valor medio de  $T_m$  de tipo salvaje. En un ejemplo, el valor de  $T_m$  de ensayo, si es menor que el valor de  $T_m$  de referencia predeterminado, por ejemplo, en al menos 3 desviaciones estándar, indica la presencia de la mutación. De lo contrario, el valor de  $T_m$  de ensayo, si no es inferior al valor de  $T_m$  de referencia predeterminado, por ejemplo, en 3 desviaciones estándar, indica la ausencia de la mutación.

El método puede incluir además amplificar una segunda secuencia diana de ácido nucleico con un segundo par de cebadores para generar un segundo amplicón, siendo el segundo par de cebadores específico para una porción de una segunda región seleccionada del grupo que consiste en gen *rpoB*, gen *gyrA*, gen *gyrB*, promotor de *enhA*, gen *rrs*, promotor de *eis*, gen *embB*, y gen *katG*. En algunas realizaciones, la primera región es el gen *rrs* o el promotor de *eis*. Por ejemplo, la primera región puede ser el gen *rrs* y la segunda región pueden ser el promotor de *eis*. Las dos regiones pueden amplificarse independientemente o amplificarse en el mismo sistema de reacción usando técnicas tales como PCR anidada. En ese caso, la mutación puede ser una mutación A1401G o C1402T en el gen *rrs*. La mutación puede estar dentro de la región promotora de *eis* consultada por las secuencias del cebador *eis*.

El método descrito anteriormente permite detectar la resistencia a un fármaco seleccionado del grupo que consiste en isoniazida, rifampicina, amikacina, kanamicina, capreomicina, etambutol y la clase de fármacos de fluoroquinolona. El par de cebadores puede ser uno seleccionado de los enumerados en las Tablas 1A y 1B. La sonda puede tener una secuencia que es sustancialmente idéntica o completamente idéntica a una seleccionada de las enumeradas en la Tabla 2.

También se describe un método para detectar la presencia de *M. tuberculosis* en una muestra de ensayo, por ejemplo, de un sujeto. El método incluye poner en contacto la muestra de ensayo con un primer par de cebadores en condiciones que conducen a una reacción de amplificación para producir un primer amplicón, y detectar la presencia del amplicón detectando de ese modo la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* en la muestra de ensayo. El primer par de cebadores puede ser un conjunto de oligonucleótidos para amplificar una porción de una región de *M. tuberculosis* seleccionada del grupo que consiste en gen *gyrB*, promotor de *inhA*, promotor de *eis*, gen *embB*, gen

5 *katG*, gen *dosR*, gen IS6110, gen IS 1081. Cada cebador del primer par de cebadores tiene una secuencia que puede ser sustancialmente idéntica a una secuencia de oligonucleótidos seleccionada de las enumeradas en la Tabla 1B. El método puede incluir además poner en contacto la muestra de ensayo o el amplicón generado por el primer par de cebadores con un segundo par de cebadores en condiciones que conducen a una reacción de amplificación para producir un segundo amplicón, y detectar la presencia del segundo amplicón. En ese caso, la presencia tanto del primer amplicón como del segundo amplicón indica la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* en la muestra de ensayo.

10 También se describe un método para detectar la presencia de *M. tuberculosis* en una muestra de ensayo. El método incluye poner en contacto la muestra de ensayo con una primera sonda de baliza molecular en condiciones que conducen a una reacción de hibridación para producir un híbrido sonda-diana, y detectar la presencia del híbrido sonda-diana detectando de ese modo la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* en la muestra de ensayo. En este método, la primera sonda de baliza molecular tiene una secuencia que es sustancialmente idéntica a una seleccionada de las enumeradas en la Tabla 2. En un ejemplo, la primera sonda de baliza molecular se selecciona del grupo que consiste en la sonda IS 1081, dosR2 e IS6110 (SEQ ID No. 67-69).

15 Los detalles de una o más realizaciones se exponen en la descripción a continuación. Otras características, objetivos y ventajas serán evidentes a partir de la descripción y de las reivindicaciones.

### Breve descripción de los dibujos

20 La Figura 1 es un diagrama que muestra la detección de la resistencia a AMK y/o KAN en 603 muestras clínicas de ADN usando el perfil de Tm de tres puntos generado por la sonda SMB. Cada una de las tres SMB de ensayo se probó frente a todas las muestras de ADN de *M.tb* en una reacción de PCR múltiplex. Los resultados para cada muestra se muestran como un gráfico de Tm de tres puntos en el eje X, con el valor de Tm de cada SMB indicado en el eje Y. Los aislados se clasifican de izquierda a derecha como fenotípicamente susceptibles y después como resistentes. Se pueden observar distintos desplazamientos de la Tm de al menos una de las tres sondas en cada aislado resistente.

25 Las Figuras 2A, 2B y 2C son diagramas que muestran primeras derivadas de perfiles de picos de fusión de tres sondas SMB. Los perfiles de picos de fusión de muestras de ADN de tipo salvaje, mutante y mixto se muestran para la sonda SMB *rrs*-1400 SMB (2A), sonda SMB *eis1* (2B), y sonda SMB *eis2* (2C). Cada curva de fusión representa una cepa individual. La Figura 3 es un diagrama que muestra los valores de MIC de las cepas de *rrs* y *eis* mutante y de tipo salvaje. Se muestran los valores promedio de MIC para AMK y KAN de las cepas de *rrs* y *eis* mutante y de tipo salvaje. Las barras de error representan el  $\pm$  una desviación estándar de los valores de MIC. *eis*-P indica promotor del gen *eis*.

### Descripción detallada de la invención

30 Esta invención se basa, al menos en parte, en un descubrimiento inesperado de nuevos cebadores, sondas SMB y sondas MB para amplificar segmentos de once genes diferentes en *M.tb* para identificar la presencia de ADN de *M. tb* y la resistencia a fármacos antituberculosos tales como isoniazida, rifampicina, amikacina, kanamicina, capreomicina, etambutol, y la clase de fármacos fluoroquinolona.

#### Cebadores y sondas

35 Los cebadores descritos aquí que amplifican los genes el *rpoB*, *gyrA*, *gyrB*, región promotora de *inhA*, *rrs*, región promotora de *eis*, *embB* y *katG* permiten una amplificación sensible de puntos calientes de mutación que inducen resistencia a fármacos en *M. tb*. Las sondas SMB correspondientes se dirigen e identifican estas mutaciones que dan como resultado resistencia a fármacos a los fármacos de primera y segunda línea usados más comúnmente. Estos cebadores pueden usarse con una eficiencia muy alta en ensayos de PCR tanto simétricos como asimétricos. Las secuencias de cebadores y sondas descritas aquí han sido usadas por los inventores para desarrollar ensayos moleculares rápidos y precisos de prueba de susceptibilidad a fármacos para *M.tb*. Aparte de su utilidad obvia en el ensayo de diagnóstico molecular para *M.tb*, estos cebadores también encontrarán uso para secuenciar los genes diana para identificar las mutaciones inductoras de resistencia en ensayos de vigilancia y cualquier otro ensayo basado en sondas que tenga como objetivo la identificación específica y sensible de las mutaciones inductoras de resistencia a fármacos comunes en *M.tb*. Las secuencias de cebadores que amplifican los genes *dosR*, IS6110 e IS1081 permiten la identificación altamente sensible y específica de *M. tb* y se pueden utilizar en cualquier formato de ensayo de PCR destinado a un diagnóstico molecular altamente específico y sensible de la tuberculosis. En las tablas, a continuación, se enumeran cebadores y sondas ejemplares de esta descripción.

Tabla 1A

#Cebador	SEQ ID No.	Nombre del cebador	Secuencia del cebador	Porción del gen diana
#1	1	gyrA-F	CCGGTCCGGTTGCCGAGACC	gyrA
#2	2	gyrA-asym-F	CCGGTCCGGTTGCCGAGACCATGG	
#3	3	P2-gyrA-anidado-F	GTCGGTTGCCGAGACCATGGGC	
#4	4	gyrA-P1-R	AGCGGGTAGCGCAGCGACCAG	
#5	5	P2-gyrA-anidado-R	CGGGTAGCGCAGCGACCAGGGC	
#6	6	gyrA-R	CCAGCGGGTAGCGCAGCGACCAG	
#12	12	rpo-R0	CGTCGCGGACCTCCAGCCGGGCA.	rpo B
#13	13	rpo-R2a	TCACGTGACAGACCGCCGGGC	
#14	14	rpo-R2b	GCTCACGTGACAGACCGCCGGGC	
#49	49	rpoB-iF	ATCAACATCCGGCCGGTGGTCCCC	
#50	50	rpoB-R	AGCTCCAGCCCGGCACGCTCACGT	
#15	15	rrs-F	GCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGC	rrs
#16	16	rrs-R	CCTCCCGAGGGTTAGGCCACTGG	
#17	17	P3-AMG-R	GGTTAGGCCACTGGCTTCGG	
#51	51	AMG-F	GCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGC	
#52	52	AMG-R	CCTCCCGAGGGTTAGGCCACT	

Tabla 1B

# Cebador	SEQ ID No.	Nombre del cebador	Secuencia del cebador	Porción del gen diana
#7	7	katG-F	GCTGGAGCAGATGGGCTTGG	katG
#8	8	P1-katG-F	CCGCTGGAGCAGATGGGCTTGG	
#9	9	P2-katG-F	GGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCG	
#10	10	katG-asym-R	GTCCCATTTTCGTCGGGGTGTTCGTCC	
#11	11	P2-katG-R2	CCATTTTCGTCGGGGTGTTCGTCCATAC	
#18	18	eis-F	CACAGGGTCACAGTCACAGAATC	eis
#19	19	P1-eis-F	CGTCCTCGSTCGGGCTACACAGG	
#20	20	P2-eis-anidado-F	CGGTCCGGCTACACAGGGTCACAGT	
#21	21	P3-eis-interno-F	CACAGGGTCACAGTCACAGAATC	
#22	22	eis-R	GCATCGCGTGATCCTTTGCCAGACA	
#53	53	eis-R1	GCATCGCGTGATCCTTTGCCAGAC	
#23	23	dosR-F	CTCGCCGGTGCCAGCGGATATGTC	dosR
#24	24	dosR-R	CGACCGTCCAGCGCCACATCTTT	
#25	25	IS6110-F	CCGCGAGGGGCCCGATGGTTT	IS6110
#26	26	IS6110-R	GGCTGGGCTCCCGGTTGATGTGG	
#27	27	IS-SPADE R	GGCTCCCGGTTGATGTGGTCGTAG	

# Cebador	SEQ ID No.	Nombre del cebador	Secuencia del cebador	Porción del gen diana
#28	28	ISBcnSA-IR	TGGGGCGATCGGCACACCCAGC	
#29	29	gyrB1-F	ATCGGTGGATTGCCCGGCAAGCTG	gyrE
#30	30	P2-gyrB1-anidada-F	CGTTCCACGGATCCGCGCAAGTC	
#31	31	P1-gyrB1-F	GCTGGCCGATTGCCGTTCCACG	
#32	32	P3-gyrB-interna-F	GATCATCAATGTGGAGAAAGCGC	
#33	33	P2-gyrB1-R2	CTGGAACATCGAATCGCGACCCGCTT	
#34	34	gyrB1-R	ATCGCGACCCGCTTTTTGCAGAA	
#35	35	embB306-F	CTGACCGACGCCGTGGTGATA.	embB
#36	36	embB306-R	GGAAATAGTTGGACATGTAGCCGGCGT	
#37	37	gyrB2-F	CGATTCGATGTTCCAGGCGATACTT	gyrB
#38	38	P2-gyrB2-F	GCGCGGCAAGATCATCAATGTGGAG	
#39	39	P3-gyrB-interno-F	GATCATCAATGTGGAGAAAGCGC	
#40	40	P1-gyrB2-externo-R	GTGGATCCCGGTGCCCAGCGCC	
#41	41	P2-gyrB2-R2	GGTGCCCGAGCCCGTGATGATC	
#42	42	inhA-F	CGTTACGCTCGTGGACATACCGATTTCCG	
#43	43	P2-inhA-F	TTACGCTCGTGGACATACCGATTTCCGC	
#44	44	P1-inhA-R	GGACTGAACGGGATACGAATGGGG	
#45	45	P2-inhA-R	GTTTGGCCCCCTTCAGTGGCTGTGG	
#46	46	IS1081-externo-F	CAGCCCGACGCCGAATCAGTTGTT	IS1081
#47	47	IS1081-externo-R	GGTGCGGGCGGTGTCCGAGGTG	
#48	48	IS1081-interno-R	GCCACCGCGGGGAGTTTGTCCG	

Tabla 2

# Sonda	SEQ ID No.	Nombre de la sonda	Secuencia de la sonda	Porción del gen diana
#1	54	gyrA-1	CCTGCgcccaccaggggtgcccctagatcgaagcgt cSCAGG	gyrA
#2	55	gyrA-2	CCAAGGgltgGcgtagatcgaagcgtcgcgcgCgC CCTGG	
#3	56	katG	CCGGGAGATCAATGGTGCCTGCTGATCGCCTCCG CCGG	katG
#4	57	rpo3	CGCGCCgagcaagtTggcgtctgttgggtTascccc gacGCCGCG	rpoB
#5	58	rpo4	CCCGCCccagggcccagcaccacacagtccggagct tCCCGCC	
#6	59	rrs1400	cacgACCGCCCGTCCAGTCCATGAAAGTCCGTcgt g	rrs

# Sonda	SEQ ID No.	Nombre de la sonda	Secuencia de la sonda	Porción del gen diana
#7	60	eis1d	aggggTGGTAAATATTACCGTGCACcTGGCCCGGG Cgggt	Promotor de eis
#8	61	eis2b	ctcgcGGCAATATGCCACcAGTCCGATTCCTcTGCAGg cgag	
#16	62	eis 1d	caggcgggtcgtaatatcacaagtgcacctggcgcg cgctg	
#9	63	gyrB500	cgagcGTATGTACTAGAAAGGTCACTCGGCCGGCS ctcg	gyrB
#10	64	inhA RC	acctgtcCGCGGCACACGATAGGCTTcTaGGGGTG ACygcaggt	Promotor de inhA
#11	65	gyrB2	ccgagcctGATCGGCTGAACCTTCGGCCCTCTTAG CACCCGGTUGATagctcgg	gyrB
#12	66	embB306	cacccggcgactcggGccacgctccaggatgtagcc ggcg	embB
#13	67	IS1081	<b>CgcgcacCAATATGATCGGGTACTCGACtgcgcg</b>	IS1081
#14	68	dosR2	tggccctcaagggaatggagttggcgccggcc ga	dosR
#15	69	IS6110	ccggcgGGGTCTCGAGTCCATCTGCCACAGCTa CGCGg	IS6110

Una o más de las secuencias de sondas en la Tabla 2 pueden prepararse en diversos formatos de detección, tales como sondas doblemente marcadas que incluyen sondas lineales, sondas Taqman, sondas de baliza molecular y sondas de baliza molecular descuidada. Una sonda "descuidada" se refiere a una sonda que es tolerante a errores de emparejamiento. Las sondas tolerantes a errores de emparejamiento hibridan con y generan una señal detectable para más de una secuencia diana a una temperatura de detección en un ensayo, y diversos híbridos así formados tendrán diferentes puntos de fusión. Las sondas monocatenarias lineales o de enrollado aleatorio son generalmente tolerantes a errores de emparejamiento. Los ejemplos de tales sondas son sondas en horquilla o lineales con un resto fluorescente interno cuyo nivel de fluorescencia aumenta tras la hibridación con una u otra hebra diana. Véanse, por ejemplo, los documentos de Pat. de EE. UU. No. 7662550 y 5925517, US 20130095479.

Preferiblemente, las sondas descuidadas son sondas en horquilla doblemente marcadas o sondas de baliza molecular, descritas en los documentos de Pat. de EE. UU. No. 7662550 y 5925517. Estas sondas en horquilla contienen una secuencia de unión a la diana flanqueada por un par de brazos complementarios entre sí. Pueden ser ADN, ARN o PNA, o una combinación de los tres ácidos nucleicos. Además, pueden contener nucleótidos modificados y enlaces internucleotídicos modificados. Pueden tener un primer fluoróforo en un brazo y un segundo fluoróforo en el otro brazo, en donde el espectro de absorción del segundo fluoróforo se superpone sustancialmente al espectro de emisión del primer fluoróforo. Lo más preferiblemente, tales sondas en horquilla son "sondas de baliza molecular" que tienen un fluoróforo en un brazo y un apantallador en el otro brazo de manera que las sondas son oscuras cuando están libres en solución. También pueden ser sondas de baliza molecular de desplazamiento de longitud de onda con, por ejemplo, múltiples fluoróforos en un brazo que interactúan mediante transferencia de energía resonante de fluorescencia (FRET) y un apantallador en el otro brazo. Las secuencias de unión a la diana pueden tener, por ejemplo, de 12 a 50 o de 25 a 50 nucleótidos de longitud, y los brazos de hibridación pueden tener de 4 a 10 o de 4 a 6 (por ejemplo, 5 o 6) nucleótidos de longitud. Las sondas de baliza molecular pueden unirse a cebadores, como se describe en los documentos de Pat. de EE. UU. No. 7662550 y 5925517 y WO 01/31062.

Las sondas de baliza molecular descuidada se refieren por tanto a dicha clase de sondas de hibridación de oligonucleótidos en horquilla marcadas fluorescentemente. Tales sondas producen una señal detectable en un ensayo homogéneo, es decir, sin tener que separar sondas hibridadas con sondas diana de no unidas. En virtud de su capacidad para unirse a más de una variante de una secuencia diana dada, las sondas pueden usarse en ensayos para detectar la presencia de una variante de un segmento de secuencia de ácido nucleico de interés de entre varias variantes posibles o incluso para detectar la presencia de dos o más variantes. Las sondas pueden usarse por lo tanto en combinaciones de dos o más en el mismo ensayo. Debido a que difieren en la secuencia de unión a la diana, sus avidedades relativas para diferentes variantes son diferentes. Por ejemplo, una primera sonda puede unirse fuertemente a una secuencia de tipo salvaje, moderadamente a un primer alelo, débilmente a un segundo alelo y no unirse en absoluto a un tercer alelo; mientras que una segunda sonda puede unirse débilmente a la secuencia de tipo salvaje y la primera variante, y moderadamente a la segunda variante y la tercera variante. Las sondas descuidadas adicionales exhibirán patrones de unión aún diferentes debido a sus diferentes secuencias de unión a la diana. Por tanto, los

espectros de emisión de fluorescencia de combinaciones de sondas descuidadas definen diferentes cepas o especies microbianas, así como variantes alélicas/mutación de genes.

5 Como las sondas descuidadas emiten fluorescencia de manera reproducible con intensidades variables después de la unión a diferentes secuencias de ADN, pueden usarse combinaciones en, por ejemplo, ensayos de reacción de  
 10 amplificación de ácidos nucleicos simples, rápidos y sensibles (por ejemplo, ensayos basados en PCR) que identifican múltiples patógenos o variantes en un único recipiente de reacción. Se entiende, sin embargo, que los ensayos pueden realizarse también en muestras sospechosas de contener cantidades directamente detectables de ácidos nucleicos diana no amplificados. Este ensayo de identificación se basa en analizar los espectros de un conjunto de sondas de  
 15 señalización descuidadas que hibridan parcialmente, tales como sondas de baliza molecular descuidada, cada una marcada con un fluoróforo que emite luz con un óptimo de longitud de onda diferente, para generar "espectros de firma" de secuencias de ADN específicas de especie o específicas de variante.

Usando las sondas, puede conseguirse multiplexación, por ejemplo, diseñando una sonda de baliza molecular  
 15 diferente que discrimina alelos para cada diana y marcando cada sonda diferencialmente. (Véanse, por ejemplo, los documentos de Pat. de EE. UU. No. 7662550 y 5925517, WO 01/31062 y Tyagi et al. (2000) Nature Biotechnology 18: 1191-1196). Las mezclas de sondas de discriminación de alelos, comprendiendo cada una alícuotas de múltiples colores, amplían el número de firmas de sonda. Para ese fin, cada híbrido de baliza molecular-diana con una temperatura de fusión única tendrá la intensidad de señal única correspondiente a una temperatura y concentración  
 20 definidas de sonda y amplificación. Por lo tanto, se podría usar un número limitado de sondas descuidadas como sondas para identificar muchas secuencias diana posibles diferentes en una reacción de PCR en tiempo real. Las sondas pueden añadirse a la mezcla de reacción de amplificación antes, durante o después de la amplificación. Véase el documento Patente de EE. UU. No. 7662550.

También se describen kits que contienen reactivos para realizar los métodos descritos anteriormente, incluyendo PCR  
 25 y/o reacciones de hibridación sonda-diana. Para ello, uno o más de los componentes de reacción, por ejemplo, los cebadores, polimerasa y sondas de PCR para los métodos divulgados en la presente memoria pueden suministrarse en forma de un kit para su uso. En dicho kit, se proporciona una cantidad apropiada de uno o más componentes de reacción en uno o más recipientes o se mantiene sobre un sustrato.

El kit también contiene materiales adicionales para poner en práctica los métodos descritos anteriormente. En algunas  
 30 realizaciones, el kit contiene algunos o todos los reactivos, materiales para realizar un método que usa cebadores y/o sondas según la descripción. Algunos o todos los componentes de los kits se pueden proporcionar en recipientes separados de o de los recipientes que contienen los cebadores y/o sondas de la descripción. Los ejemplos de componentes adicionales de los kits incluyen, pero no se limitan a, una o más polimerasas diferentes, uno o más reactivos de control (por ejemplo, sondas o cebadores de PCR o moldes de control), y tampones para las reacciones (en 1X o formas concentradas). El kit también puede incluir uno o más de los siguientes componentes: soportes, reactivos de terminación, modificación o digestión, osmolitos y un aparato para la detección.

Los componentes de reacción usados pueden proporcionarse en una variedad de formas. Por ejemplo, los  
 35 componentes (por ejemplo, las enzimas, sondas y/o cebadores) pueden suspenderse en una solución acuosa o como un polvo secado por congelación o liofilizado, sedimento o perla. En el último caso, los componentes, cuando se reconstituyen, forman una mezcla completa de componentes para su uso en un ensayo. Los kits de la descripción pueden proporcionarse a cualquier temperatura adecuada. Por ejemplo, para el almacenamiento de kits que contienen  
 40 componentes proteicos (por ejemplo, una enzima) en un líquido, se prefiere que se proporcionen y mantengan por debajo de 0 °C, preferentemente a o por debajo de -20 °C, o de otro modo en un estado congelado.

Un kit o sistema de esta descripción puede contener, en una cantidad suficiente para al menos un ensayo, cualquier  
 45 combinación de los componentes descritos en la presente memoria. En algunas aplicaciones, uno o más componentes de reacción pueden proporcionarse en cantidades de un solo uso medidas previamente en tubos individuales, típicamente desechables o recipientes equivalentes. Con tal disposición, se puede realizar una reacción de PCR añadiendo un ácido nucleico diana o una muestra/célula que contiene el ácido nucleico diana a los tubos individuales directamente. La cantidad de un componente suministrado en el kit puede ser cualquier cantidad apropiada, y puede depender del mercado objetivo al que se dirige el producto. El o los recipientes en donde se suministran los  
 50 componentes puede ser cualquier recipiente convencional que sea capaz de contener la forma suministrada, por ejemplo, tubos de microcentrífuga, ampollas, botellas o dispositivos de ensayo integrales, tales como dispositivos fluidicos, cartuchos, de flujo lateral u otros dispositivos similares.

Los kits también pueden incluir materiales de envasado para contener el recipiente o combinación de recipientes. Los  
 55 materiales de envasado típicos para dichos kits y sistemas incluyen matrices sólidas (por ejemplo, vidrio, plástico, papel, papel de aluminio, micropartículas y similares) que contienen los componentes de reacción o sondas de detección en cualquiera de una variedad de configuraciones (por ejemplo, en un vial, pocillo de placa de microtitulación, micromatriz y similares). Los kits pueden incluir además instrucciones registradas de una forma tangible para el uso de los componentes.

## Definiciones

Un ácido nucleico se refiere a una molécula de ADN (por ejemplo, pero sin limitarse a, un ADNc o ADN genómico), una molécula de ARN (por ejemplo, pero sin limitarse a, un ARNm), o un análogo de ADN o ARN. Un análogo de ADN o ARN puede sintetizarse a partir de análogos de nucleótidos. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria. Un ácido nucleico "aislado" es un ácido nucleico, cuya estructura no es idéntica a la de cualquier ácido nucleico de origen natural o a la de cualquier fragmento de un ácido nucleico genómico de origen natural. El término abarca, por lo tanto, por ejemplo, (a) un ADN que tiene la secuencia de parte de una molécula de ADN genómico de origen natural, pero no está flanqueado por ambas secuencias codificantes que flanquean esa parte de la molécula en el genoma del organismo en donde aparece de manera natural; (b) un ácido nucleico incorporado en un vector o en el ADN genómico de un procarionte o eucarionte de una manera tal que la molécula resultante no es idéntica a ningún vector de origen natural o ADN genómico; (c) una molécula separada tal como un ADNc, un fragmento genómico, un fragmento producido por PCR o un fragmento de restricción; y (d) una secuencia de nucleótidos recombinante que es parte de un gen híbrido, es decir, un gen que codifica una proteína de fusión.

Como se usa en la presente memoria, el término "ácido nucleico diana" o "diana" se refiere a un ácido nucleico que contiene una secuencia de ácido nucleico diana de interés. Un ácido nucleico diana puede ser monocatenario o bicatenario, y a menudo es ADN bicatenario. Una "secuencia de ácido nucleico diana", "secuencia diana" o "región diana" significa una secuencia específica que comprende toda o parte de la secuencia de un ácido nucleico monocatenario. Una secuencia diana puede estar dentro de un molde de ácido nucleico o dentro del genoma de una célula, que puede ser cualquier forma de ácido nucleico monocatenario o bicatenario. Un molde puede ser un ácido nucleico purificado o aislado, o puede no estar purificado o no estar aislado.

Las secuencias "complementarias", como se usa en la presente memoria, pueden incluir, o formarse completamente a partir de, pares de bases de Watson-Crick (por ejemplo, A-T/U y C-G), pares de bases no de Watson-Crick y/o pares de bases formados a partir de nucleótidos no naturales y modificados, y en lo que respecta a los requisitos anteriores con respecto a su capacidad para hibridarse se cumplen. Un complemento completo o totalmente complementario puede significar un emparejamiento de bases complementario al 100 % (completamente) o sustancialmente complementario entre nucleótidos o análogos de nucleótidos de moléculas de ácido nucleico.

"Sustancialmente complementario" significa que un ácido nucleico u oligonucleótido tiene una secuencia que contiene al menos 10 bases contiguas que son al menos un 80 %, (por ejemplo, un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, y 100 %) a al menos 10 bases contiguas en una secuencia de ácido nucleico diana de modo que el ácido nucleico u oligonucleótido se puede hibridar o aparear con la secuencia de ácido nucleico diana bajo, por ejemplo, la condición de hibridación de una reacción de PCR o una condición de hibridación sonda-diana. La complementariedad entre secuencias puede expresarse en un número de errores de emparejamiento de bases en cada conjunto de al menos 10 bases contiguas que se comparan. El término "sustancialmente idéntico" significa que un primer ácido nucleico es al menos un 80 % (por ejemplo, un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, y 100 %) complementario a un segundo ácido nucleico de manera que el primer ácido nucleico es sustancialmente complementario a y es capaz de hibridarse con el complemento del segundo ácido nucleico en condiciones de hibridación de PCR o de hibridación sonda-diana.

"Hibridación" o "que hibrida" o "hibridar" o "aparear" se refiere a la capacidad de las cadenas de ácido nucleico completa o parcialmente complementarias para juntarse en condiciones de hibridación especificadas en una orientación paralela o preferentemente antiparalela para formar una estructura o región bicatenaria estable (a veces denominada "híbrido" o "dúplex" o "tallo") en donde las dos cadenas constituyentes están unidas por enlaces de hidrógeno. Aunque los enlaces de hidrógeno se forman típicamente entre adenina y timina o uracilo (A y T o U) o citosina y guanina (C y G), pueden formarse otros pares de bases (por ejemplo, Adams et al., *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, 11<sup>a</sup> ed., 1992).

Un "dúplex de ácido nucleico", "dúplex", "tallo", "híbrido de ácido nucleico" o "híbrido" se refiere a una estructura de ácido nucleico estable que comprende una región bicatenaria unida por hidrógeno, por ejemplo, moléculas dúplex ARN:ARN, ARN:ADN y ADN:ADN y análogos de las mismas. Tal estructura puede detectarse por cualquier medio conocido, por ejemplo, usando una sonda marcada, un sustrato recubierto con sonda ópticamente activo sensible a cambios de masa en su superficie (Pat. de EE. UU. No. 6.060.237), o agentes de unión ( Pat. de EE. UU. No. 5.994.056).

Como se usa en la presente memoria, el término "amplificación" y sus variantes incluye cualquier proceso para producir múltiples copias o complementos de al menos alguna parte de un polinucleótido, haciéndose referencia al polinucleótido típicamente como un "molde". El polinucleótido molde puede ser monocatenario o bicatenario. Un molde puede ser un ácido nucleico purificado o aislado, o puede no estar purificado o no estar aislado. La amplificación de un molde dado puede dar como resultado la generación de una población de productos de amplificación de polinucleótidos, denominados colectivamente "amplicón". Los polinucleótidos del amplicón pueden ser monocatenarios o bicatenarios, o una mezcla de ambos. Típicamente, el molde incluirá una secuencia diana, y el amplicón resultante incluirá polinucleótidos que tienen una secuencia que es sustancialmente idéntica o sustancialmente complementaria a la secuencia diana. En algunas realizaciones, los polinucleótidos de un amplicón particular son sustancialmente idénticos, o sustancialmente complementarios, entre sí; alternativamente, en algunas realizaciones, los polinucleótidos dentro de un amplicón dado pueden tener secuencias de nucleótidos que varían entre sí. La amplificación puede proceder de manera lineal o exponencial, y puede implicar repeticiones repetidas y

consecutivas de un molde dado para formar dos o más productos de amplificación. Algunas reacciones de amplificación típicas implican ciclos sucesivos y repetidos de síntesis de ácidos nucleicos basada en molde, dando como resultado la formación de una pluralidad de polinucleótidos descendientes que contienen al menos alguna porción de la secuencia de nucleótidos del molde y que comparten al menos algún grado de identidad de secuencia de nucleótidos (o complementariedad) con el molde. En algunas realizaciones, cada caso de síntesis de ácidos nucleicos, que puede denominarse "ciclo" de amplificación, incluye crear el extremo 3' libre (por ejemplo, mediante mellado de una hebra de un ADNds) generando de ese modo un cebador y etapas de extensión del cebador; opcionalmente, también puede incluirse una etapa de desnaturalización adicional en donde el molde está parcial o completamente desnaturalizado. En algunas realizaciones, una ronda de amplificación incluye un número dado de repeticiones de un único ciclo de amplificación. Por ejemplo, una ronda de amplificación puede incluir 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 o más repeticiones de un ciclo particular. En una realización ejemplar, la amplificación incluye cualquier reacción en donde un molde de polinucleótido particular se somete a dos ciclos consecutivos de síntesis de ácido nucleico. La síntesis puede incluir síntesis de ácidos nucleicos dependiente de molde.

La amplificación también puede incluir amplificación isotérmica. El término "isotérmica" significa llevar a cabo una reacción a temperatura sustancialmente constante, es decir, sin variar la temperatura de reacción a la que se produce una reacción de polimerización de ácido nucleico. Las temperaturas isotérmicas para reacciones de amplificación isotérmica dependen de la polimerasa de ácido nucleico que desplaza la cadena usada en las reacciones. Generalmente, las temperaturas isotérmicas están por debajo de la temperatura de fusión ( $T_m$ ; la temperatura a la que la mitad de las moléculas potencialmente bicatenarias en una mezcla están en un estado desnaturalizado monocatenario) del producto de reacción predominante, es decir, generalmente 90 °C o menos, normalmente entre aproximadamente 20 °C y 75 °C, y preferiblemente entre aproximadamente 30 °C y 60 °C, o más preferiblemente a aproximadamente 37 °C.

El término "cebador" u "oligonucleótido cebador" se refiere a una cadena de ácido nucleico o un oligonucleótido capaz de hibridarse con un ácido nucleico molde y que actúa como punto de inicio para incorporar nucleótidos de extensión según la composición del ácido nucleico molde para la síntesis de ácido nucleico. "Nucleótidos de extensión" se refiere a cualquier nucleótido (por ejemplo, dNTP) y análogos de los mismos capaces de incorporarse en un producto de extensión durante la amplificación, es decir, ADN, ARN o un derivado de ADN o ARN, que puede incluir un marcador.

Como se usa en la presente memoria, el término "oligonucleótido" se refiere a un polinucleótido corto, típicamente con una longitud menor o igual a 300 nucleótidos (por ejemplo, en el intervalo de 5 y 150, preferiblemente en el intervalo de 10 a 100, más preferiblemente en el intervalo de 15 a 50 nucleótidos de longitud). Sin embargo, como se usa en la presente memoria, el término también pretende abarcar cadenas polinucleotídicas más largas o más cortas. Un "oligonucleótido" puede hibridarse con otros polinucleótidos, sirviendo por lo tanto como sonda para la detección de polinucleótidos, o un cebador para la extensión de la cadena de polinucleótidos.

El término "sonda", como se usa en la presente memoria, se refiere a un oligonucleótido capaz de unirse a un ácido nucleico diana de secuencia complementaria a través de uno o más tipos de enlaces químicos, normalmente a través del emparejamiento de bases complementarias, normalmente a través de la formación de enlaces de hidrógeno. Las sondas pueden unirse a secuencias diana que carecen de complementariedad completa con la secuencia de la sonda dependiendo de la astringencia de las condiciones de hibridación. Puede haber cualquier número de errores de emparejamiento de pares de bases que interferirán con la hibridación entre la secuencia diana y los ácidos nucleicos monocatenarios descritos en la presente memoria. Sin embargo, si el número de mutaciones es tan grande que no puede producirse hibridación incluso en condiciones de hibridación menos astringentes, la secuencia no es una secuencia diana complementaria. Una sonda puede ser monocatenaria o parcialmente monocatenaria y parcialmente bicatenaria. La capacidad de trenzado de la sonda viene dictada por la estructura, composición y propiedades de la secuencia diana. Las sondas pueden marcarse directamente o marcarse indirectamente con un marcador tal como con biotina a la que puede unirse posteriormente un complejo de estreptavidina.

El término "sonda de detección" se refiere a un oligonucleótido que tiene una secuencia suficientemente complementaria a su secuencia diana para formar un híbrido sonda:diana estable para la detección en condiciones de hibridación astringentes. Una sonda es típicamente un oligómero sintético que puede incluir bases complementarias a la secuencia fuera de la región diana que no evitan la hibridación en condiciones de hibridación astringentes al ácido nucleico diana. Una secuencia no complementaria a la diana puede ser un tramo de homopolímero (por ejemplo, poli-A o poli-T), secuencia promotora, secuencia de reconocimiento de endonucleasa de restricción, o secuencia para conferir la estructura secundaria o terciaria deseada (por ejemplo, un sitio catalítico o estructura en horquilla), o una región de etiqueta que puede facilitar la detección y/o amplificación. "Estable" o "estable para la detección" significa que la temperatura de una mezcla de reacción es al menos 2 °C por debajo de la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de un dúplex de ácido nucleico contenido en la mezcla, más preferentemente al menos 5 °C por debajo de la  $T_m$ , e incluso más preferentemente al menos 10 °C por debajo de la  $T_m$ .

Un "marcador" o "molécula indicadora" es un resto químico o bioquímico útil para marcar un ácido nucleico (incluyendo un único nucleótido), polinucleótido, oligonucleótido o ligando proteico, por ejemplo, aminoácido o anticuerpo. Los ejemplos incluyen agentes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, agentes cromogénicos, agentes de apantallamiento, radionucleótidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y otros restos conocidos en la técnica. Los marcadores o moléculas indicadoras son capaces de generar una señal mensurable y

pueden estar unidos covalentemente o no covalentemente a un oligonucleótido o nucleótido (por ejemplo, un nucleótido no natural) o ligando.

Como se usa en la presente memoria, el término "poner en contacto" y sus variantes, cuando se usa en referencia a cualquier conjunto de componentes, incluye cualquier proceso por el que los componentes que van a ponerse en contacto se mezclan en la misma mezcla (por ejemplo, se añaden en el mismo compartimento o solución), y no requiere necesariamente un contacto físico real entre los componentes indicados. Los componentes indicados pueden ponerse en contacto en cualquier orden o cualquier combinación (o subcombinación), y pueden incluir situaciones en donde uno o algunos de los componentes indicados se retiran posteriormente de la mezcla, opcionalmente antes de la adición de otros componentes indicados. Por ejemplo, "poner en contacto A con B y C" incluye cualquiera y todas las siguientes situaciones: (i) A se mezcla con C, después se añade B a la mezcla; (ii) A y B se mezclan en una mezcla; B se retira de la mezcla, y después se añade C a la mezcla; y (iii) A se añade a una mezcla de B y C. "Poner en contacto" un ácido nucleico diana o una célula con uno o más componentes de reacción, tales como una polimerasa, un conjunto de cebadores o una sonda, incluye cualquiera o todas las siguientes situaciones: (i) la diana o la célula se pone en contacto con un primer componente de una mezcla de reacción para crear una mezcla; después se añaden otros componentes de la mezcla de reacción en cualquier orden o combinación a la mezcla; y (ii) la mezcla de reacción se forma completamente antes de la mezcla con la diana o la célula.

El término "mezcla", como se usa en la presente memoria, se refiere a una combinación de elementos, que están intercalados y no en ningún orden particular. Una mezcla es heterogénea y no separable espacialmente en sus diferentes constituyentes. Los ejemplos de mezclas de elementos incluyen varios elementos diferentes que se disuelven en la misma solución acuosa, o varios elementos diferentes unidos a un soporte sólido al azar o en ningún orden particular en donde los diferentes elementos no son espacialmente distintos. En otras palabras, una mezcla no es direccionable.

Como se usa en la presente memoria, el término "sujeto" se refiere a cualquier organismo que tiene un genoma, preferiblemente, un animal vivo, por ejemplo, un mamífero, que ha sido objeto de diagnóstico, tratamiento, observación o experimento. Los ejemplos de un sujeto pueden ser un ser humano, un animal de ganado (ganado vacuno y vacuno lechero, ovejas, aves de corral, cerdos, etc.) o un animal de compañía (perros, gatos, caballos, etc.).

Una "muestra" como se usa en la presente memoria significa cualquier fluido o tejido biológico obtenido de un organismo (*por ejemplo*, paciente) o de componentes (por ejemplo, sangre) de un organismo. La muestra puede ser de cualquier tejido biológico, célula(s) o fluido. La muestra puede ser una "muestra clínica" que es una muestra derivada de un sujeto, tal como un paciente humano o un sujeto veterinario. Las muestras biológicas útiles incluyen, sin limitación, sangre completa, saliva, orina, líquido sinovial, médula ósea, líquido cefalorraquídeo, moco vaginal, moco cervical, secreciones nasales, esputo, semen, líquido amniótico, líquido de lavado broncoalveolar y otros exudados celulares de un paciente o sujeto. Tales muestras pueden diluirse adicionalmente con solución salina, tampón o un diluyente fisiológicamente aceptable. Alternativamente, tales muestras se concentran por medios convencionales. Las muestras biológicas también pueden incluir secciones de tejidos tales como secciones congeladas tomadas con fines histológicos. Una muestra biológica también puede denominarse "muestra de paciente". Una muestra biológica también puede incluir una proteína sustancialmente purificada o aislada, preparación de membrana o cultivo celular.

Los términos "determinar", "medir", "evaluar" y "ensayar" se usan indistintamente e incluyen una medición tanto cuantitativa como cualitativa, e incluyen determinar si una característica, rasgo o cualidad está presente o no. La evaluación puede ser relativa o absoluta. La evaluación de la presencia de una diana incluye determinar la cantidad de la diana presente, así como determinar si está presente o ausente.

Como se usa en la presente memoria, el término valor de "referencia" se refiere a un valor que se correlaciona estadísticamente con un resultado particular en comparación con un resultado del ensayo. En realizaciones preferidas, el valor de referencia puede determinarse a partir de un análisis estadístico que examina la media de los valores de tipo salvaje. El valor de referencia puede ser un valor de puntuación umbral o un valor de puntuación de corte. Típicamente, un valor de referencia será un umbral por encima (o por debajo) del cual un resultado es más probable y por debajo del cual un resultado alternativo es más probable.

Como se divulga en la presente memoria, la diferencia de los valores es indicativa de la presencia o ausencia de un patógeno (por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis*) o una mutación. La frase "diferencia" del nivel o valor se refiere a diferencias en una variable (por ejemplo,  $T_m$ ) de un analito (por ejemplo, un híbrido sonda-diana) en una muestra en comparación con un nivel o valor de control o referencia. En una realización, una diferencia de un valor o nivel puede ser una diferencia estadísticamente significativa entre las cantidades de un analito presente en una muestra en comparación con un control. Por ejemplo, una diferencia puede ser estadísticamente significativa si el nivel medido del analito se encuentra fuera de aproximadamente 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 o 5,0 desviaciones estándar de la media de cualquier grupo de control o de referencia.

Como se divulga en la presente memoria, se proporcionan varios intervalos de valores. Se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre los límites superior e inferior de ese intervalo también se divulga específicamente. Cada intervalo más

pequeño entre cualquier valor establecido o valor intermedio en un intervalo establecido y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo establecido está incluido dentro de la descripción. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse o excluirse independientemente en el intervalo, y cada intervalo donde uno, ninguno o ambos límites están incluidos en los intervalos más pequeños también está incluido dentro de la descripción, sujeto a cualquier límite excluido específicamente en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos de los límites, los intervalos que excluyen uno o ambos de esos límites incluidos también se incluyen en la descripción. El término "aproximadamente" se refiere generalmente a más o menos el 10 % del número indicado. Por ejemplo, "aproximadamente el 10 %" puede indicar un intervalo del 9 % al 11 %, y "aproximadamente 20" puede significar de 18-22. Otros significados de "aproximadamente" pueden ser evidentes a partir del contexto, tal como redondeo, por lo que, por ejemplo, "aproximadamente 1" también puede significar de 0,5 a 1,4.

## Usos

Recientemente, se han descrito dos ensayos de SMB separados que identifican rápida y fiablemente las mutaciones de *M. tb* que son responsables en gran medida de la resistencia a la rifampina y fluoroquinolona (FQ) (Chakravorty, S., B. et al., 2011, J Clin Microbiol 49:932-940; Chakravorty, S., H., et al., 2012, J Clin Microbiol 50:2194-2202). Los ensayos divulgados en la presente memoria tienen la ventaja de estar en formato de PCR en tiempo real, de modo que son fáciles de usar y no están sujetos a contaminación cruzada por amplicones. Además, se ha mostrado que la detección de mutaciones es robusta y susceptible de ensayo de alto rendimiento. Los ejemplos a continuación presentan un sistema de ensayo de detección de resistencia a fármacos de TB SMB, añadiendo ensayos que permiten la detección de resistencia a AMK y KAN. También se exploraron las causas de discordancia entre el ensayo divulgado en la presente memoria y los métodos de ensayo de susceptibilidad fenotípica. Los resultados muestran que algunos de los métodos fenotípicos usados más comúnmente pueden no detectar aislados de *M.tb* con mutaciones que confieren resistencia si estas mutaciones solo aumentan moderadamente las concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) para KAN. También se descubrieron nuevas mutaciones en *whiB7* que están asociados con un bajo nivel de resistencia a KAN.

Como se divulga en la presente memoria, la PCR de SMB multiplexada y el ensayo de fusión identificaron con precisión mutaciones en el gen *rrs* y promotor de *eis* asociadas con resistencia a AMK y/o KAN. El ensayo no produjo llamadas de resistencia falsas cuando se probó contra NTM, bacterias gram positivas y gram negativas. La mayoría de los casos de hetero-resistencia también se detectó por el ensayo, cuando estaban presentes. A diferencia de la plataforma MTBDRsI, el ensayo se puede realizar en un sistema de PCR en tiempo real cerrado, y se puede adaptar fácilmente a pruebas de alto rendimiento ya que todas las etapas de ensayo se realizan en placas de 384 pocillos. El ensayo SMB también evita problemas potenciales asociados con métodos alternativos para la detección de mutaciones. El análisis de curvas de fusión de alta resolución requiere la capacidad de detectar variaciones sutiles en las curvas de fusión (Yadav, R., S., et al., 2012, J Appl Microbiol 113:856-862). Otros ensayos moleculares basados en fusión post-PCR deben detectar mutaciones decodificando contornos de fluorescencia complejos (Rice, J. E., et al., 2012. Nucleic Acids Res 40: e164). Por el contrario, el ensayo SMB produce picos de Tm claros y fácilmente distinguibles y desplazamientos de Tm definitivos para identificar las mutaciones de interés. Los valores de Tm individuales también se pueden usar para agrupar muestras que tienen el mismo genotipo.

Como se divulga en la presente memoria, se probó un ensayo en un panel de 603 muestras clínicas que representaban tanto nuevos casos de TB como casos de tratamiento no resueltos, y se evaluó la relación de las mutaciones diana con el patrón de susceptibilidad de los aislados clínicos. Se observó que el 100 % de los aislados con mutaciones A1401G en *rrs* tenían una fuerte correlación con un alto nivel de resistencia tanto a AMK como a KAN. Sin embargo, las mutaciones en el promotor de *eis* dieron como resultado una resistencia a KAN de solo moderada a bajo nivel y ninguna resistencia a AMK, lo que es consistente con estudios previos (Campbell, P. J., et al, 2011, Antimicrob Agents Chemother 55:2032-2041; Zaunbrecher, M. A., et al., 2009, Proc Natl Acad Sci U S A 106:20004-20009). El estudio también mostró aquí que el método de concentración absoluta LJ para el ensayo de susceptibilidad no detecta adecuadamente un nivel de resistencia a KAN de moderado a bajo. De hecho, casi dos tercios de las muestras con mutaciones en el promotor de *eis* se detectaron como susceptibles a KAN en el medio LJ. Sin embargo, todas menos una muestra con mutaciones en el promotor de *eis* se detectaron como resistentes a KAN por el método MGIT. Dos de tales aislados contenían una mutación C(-12)T en *eis*. Estos mutantes también eran resistentes a KAN cuando se ensayaron por MYCOTB, que mostró una MIC de KAN de 5 µg/ml. Estudios previos han sugerido que los aislados clínicos con mutaciones C(-12)T no se correlacionan (Zaunbrecher (2009) o se correlacionan mal (Campbell, 2011; Hoshide, M., L. et al., 2014, J Clin Microbiol 52:1322-1329.) con resistencia a KAN. Estos estudios perdieron posiblemente la relación entre esta mutación y el bajo nivel de resistencia a KAN debido al método de ensayo usado para establecer susceptibilidad fenotípica. Estos resultados sugieren que los métodos de MGIT o MYCOTB deberían ser preferidos para ensayar la resistencia fenotípica a KAN. También resaltan la potencia de las pruebas de resistencia genotípica, tal como la divulgada en la presente memoria, para detectar mutaciones que causan un bajo nivel de resistencia y pueden perderse por pruebas fenotípicas solas (Rigouts, L., M. et al., 2013, J Clin Microbiol 51:2641-2645; Sirgel, F. A., et al., 2012, Microb Drug Resist 18:193-197; y Van Deun, A., et al., 2013, J Clin Microbiol 51:2633-2640).

El conjunto de estudio incluía aquí una muestra que era una mezcla de *rrs* tipo salvaje y mutantes C1402T de *rrs*. Esta muestra fue susceptible tanto a AMK como a KAN en medio LJ. Se ha informado que los aislados con mutaciones C1402T son susceptibles a AMK, pero resistentes a KAN (Maus, C. E., et al., 2005, Antimicrob Agents Chemother 49:3192-3197). En este caso particular, los ensayos de susceptibilidad repetidos usando medio LJ mostraron

susceptibilidad a KAN presumiblemente debido a la naturaleza hetero-resistente de la muestra. Aquí, el ensayo molecular sirvió como un mejor predictor de resistencia potencialmente emergente que el ensayo fenotípico, ya que el ensayo SMB detectó claramente la presencia de los tipos de ADN tanto de tipo salvaje como mutante.

5 La incidencia de mutaciones en 1484 de *rrs* en cepas clínicas con resistencia a AMK o KAN ha sido muy baja (Georghiou, S. B., et al., 2012, PLoS One 7: e33275) lo que hace que su importancia clínica sea debatible. Una versión separada del ensayo que se dirigió al codón 1484 de *rrs* no detectó ninguna mutación en ninguno de los 603 aislados en el estudio, así como en 259 aislados adicionales del área de Nueva Jersey-Nueva York, que incluían 33 aislados resistentes a AMK y KAN. La ausencia de cualesquiera mutaciones en 1484 de *rrs* en este conjunto de estudio ampliado se confirmó mediante secuenciación de Sanger (datos no mostrados). A la luz de la muy baja prevalencia de las mutaciones en 1484 de *rrs*, es poco probable que este codón proporcione mucho valor en la predicción de la resistencia a aminoglucósidos. Por tanto, se recomienda que los ensayos moleculares para resistencia a aminoglucósidos se dirijan solo a los codones 1401-1402 en el gen *rrs*.

15 Se encontró que 22 muestras resistentes a AMK o KAN tenían secuencias de tipo salvaje en el gen *rrs* y región promotora de *eis*. Un estudio reciente ha mostrado una posible asociación entre mutaciones en la 5'UTR del *whiB7* y la resistencia a KAN, identificando una mutación en 5'UTR de *whiB7* en una sola cepa clínica con resistencia a KAN no explicada (Reeves, A. Z., et al., 2013, Antimicrob Agents Chemother 57:1857-1865). También se describieron varias mutaciones en 5'UTR de *whiB7* novedosas, así como una delección, que parecen estar asociadas con la resistencia a KAN. No se han identificado biomarcadores universales adecuados que puedan explicar la resistencia a KAN y AMK en el 15-20 % restante de cepas clínicas con *rrs*, región promotora de *eis* de tipo salvaje. Las muestras que contienen el ADN del gen *rrs* y la región promotora de *eis* tipo salvaje mezclado con una cantidad traza de dianas mutantes de una subpoblación resistente a KAN o AMK también podría explicar las discordancias restantes entre las pruebas de resistencia fenotípica y el ensayo de SMB divulgado en la presente memoria. Sin embargo, la costosa investigación de la hetero-resistencia estaba más allá del alcance de este estudio. Algunos estudios recientes han sugerido que los genes de PPE60 y Rv3168 podrían estar implicados en la resistencia a KAN no explicada (Fahrat, M. R., et al., 2013, Nat Genet 45:1183-1189; Zhang, H., et al., 2013, Nat Genet 45:1255-1260) aunque esto sigue sin ser verificado en entornos clínicos.

20 En resumen, se desarrolla un ensayo sensible y específico para la detección de la resistencia a AMK y KAN en *M.tb* y se validó en aislados clínicos con una alta prevalencia de TB MDR y XDR. Los resultados muestran que las mutaciones A1401G en *rrs* codifican un alto nivel de resistencia cruzada tanto a AMK como a KAN, y que las mutaciones en el promotor de *eis* codifican resistencia a KAN de nivel moderado a bajo, lo que es consistente con estudios genómicos funcionales previos (Zaubrecher 2009). La comparación del rendimiento del ensayo divulgado en la presente memoria con tres métodos de ensayo de susceptibilidad fenotípica diferentes en medios sólidos y líquidos reveló que la resistencia a KAN de nivel bajo a moderado causada por las mutaciones en el promotor de *eis* se pierden en gran medida por las pruebas de susceptibilidad basadas en LJ. Estos resultados argumentan fuertemente el valor de las pruebas genotípicas para detectar la resistencia a aminoglucósidos, y los resultados demuestran la utilidad específica del ensayo basado en SMB divulgado en la presente memoria.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

Este ejemplo describe materiales y métodos usados en los EJEMPLOS 2-7 más adelante.

#### 40 Muestras de ADN

Las muestras de ensayo de *M.tb* consistían en ADN aislado de 603 aislados secuenciales de *M.tb* cultivados de 503 pacientes inscritos en un estudio de historia natural de tuberculosis MDR (NCT00341601 en clinicaltrials.gov) en el Hospital Nacional de Masan en Changwon, República de Corea. Se probaron dos cohortes. La cohorte A consistió en casos de TB recién sospechosos sin tratamiento previo (158 muestras) y la cohorte B consistió en casos de TB de retratamiento (445 muestras). Se recogieron muestras de esputo frescas de cada paciente al inicio del tratamiento y se cultivaron para determinar *M.tb*. En un subconjunto de pacientes, se recogieron muestras de esputo repetidas en el 1<sup>er</sup>, 4<sup>o</sup> y 6<sup>o</sup> meses de tratamiento y también se cultivaron para determinar *M.tb*. Se tomaron muestras de prueba de micobacterias no tuberculosis (NTM) y bacterias gram positivas y gram negativas del repositorio de ADN de la New Jersey Medical School (NJMS) como se ha descrito previamente (Chakravorty, S., 2012, J Clin Microbiol 50:2194-2202).

#### 50 Ensayo fenotípico de susceptibilidad a fármacos

Se realizó un ensayo fenotípico de susceptibilidad a fármacos en los 603 aislados mediante el método de concentración absoluta en medio LJ para determinar la susceptibilidad a AMK y KAN usando concentraciones críticas de 40 µg/ml (la concentración estándar usada durante 2012 cuando se ensayaron los aislados) para ambos antibióticos (Jnawali, H. N., 2013, Diagn Microbiol Infect Dis 76:187-196) en el Centro Internacional de Investigación de la Tuberculosis (ITRC), Corea del Sur. Las MIC para AMK y KAN para 173/603 muestras también se evaluaron usando Placas MIC TREK Sensititre® MYCOTB ("MYCOTB"; TREK Diagnostic Systems, Cleveland, Ohio, EE. UU.) como se ha descrito previamente (Lee, J., 2014, Antimicrob Agents Chemother 58:11-18). Para 560/603 muestras, también se evaluó la resistencia a KAN usando el sistema de Tubo Indicador de Crecimiento Micobacteriano (MGIT) (Becton

Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) a una concentración crítica de 2,5 µg/ml. Para las muestras con resultados de prueba de susceptibilidad fenotípica que eran discordantes con los resultados de secuenciación de Sanger de los genes diana, se repitieron las pruebas de susceptibilidad fenotípica para confirmar los hallazgos iniciales. En los casos en los que los resultados de las pruebas de susceptibilidad a MGIT y LJ mostraron discordancia, se repitieron ambos ensayos para confirmar o rectificar los hallazgos iniciales.

#### Preparación y secuenciación del ADN

Se preparó ADN tanto para la prueba de ensayo SMB como para la secuenciación de Sanger a partir de aislados cultivados hirviendo un asa de cultivo en 200 µl de resina Instagene Matrix (Bio-Rad Laboratories, Hercules California, EE. UU.) en presencia de Triton X100 al 0,1 % durante 10-15 minutos. El sobrenadante se recuperó después de la centrifugación y se cuantificó usando un espectrofotómetro de microvolumen Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU.). Para la secuenciación de Sanger, dos fragmentos diferentes del gen *rrs* (nucleótidos 420-980 y 1293-1537) y una parte de la secuencia codificante de *eis* en 5' más la totalidad del promotor de *eis* se amplificaron utilizando 0,5 µM de cebadores directos e inversos, tampón de PCR 1X, dNTP 250 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM y 0,03 U/µl de enzima ADN polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, California, EE. UU.) según los siguientes parámetros: desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 10 s, 58-60 °C durante 30 s y 72 °C durante 10-30 s dependiendo del tamaño del amplicón. La región promotora de *eis* y los fragmentos del gen *rrs* se amplificaron como se ha descrito previamente (10, 33). Para un subconjunto de muestras, un fragmento de 538 pb del gen *whiB7* que incluye 412 pb de la región 5' no traducida y 126 pb del ORF se amplificó y secuenció usando los cebadores *whiB7F* 5'aaacgcgcaggtcagaaaaa 3' y *whiB7R* 5'cagtgctctggctactocga 3' (SEQ ID No: 70 y 71). Adicionalmente, un fragmento de 275 pb del gen *whiB7*, que incluía casi el ORF de *whiB7* completo, también se amplificó usando los cebadores *whiB7-ingen-F* 5'GTCGGTACTGACAGTCCCC 3' y *whiB7-ingen-R* 5'ATGCAACAGCATCCTTGCG 3' (SEQ ID No: 72 y 73). Los productos de PCR se sometieron a secuenciación bidireccional usando los cebadores directos e inversos específicos de gen en un analizador genético 3130XL (Applied Bio-systems, Foster City, California, EE. UU.) usando un BigDye Terminator, versión 3.1, kit de secuenciación de ciclo (Applied Biosystems) según las instrucciones del fabricante.

#### Balizas moleculares y cebadores de ensayo

Los ensayos de SMB se dirigen a mutaciones en *M.tb* en los codones 1401 y 1402 del gen *rrs* y mutaciones a lo largo de la región promotora del gen *eis*. Se amplificó un fragmento de 113 pb (nucleótidos 1335-1451) del gen *rrs* usando los cebadores AMG-F (5'-GCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGC-3', SEQ ID No: 51) y AMG-R (5'-CCTCCCGAGGGTTAGGCCACT-3', SEQ ID No: 52) y un fragmento de 98 pb que abarca la región promotora y los cinco codones iniciales del gen *eis* (nucleótidos -81 a 17) se amplificó usando los cebadores *eis-F* (5'-CACAGGGTCACAGTACAGAATC-3', SEQ ID No: 18) y *eis-R* (5'-GCATCGCGTGATCCTTTGCCAGAC-3', SEQ ID No: 53). Los cebadores de *rrs* se diseñaron para ser específicos para el género *Mycobacterium* y los cebadores de *eis* se diseñaron para ser específicos para el complejo *M.tb*. Una sonda SMB *rrs*-1400 (5'-6carboxifluoresceína-cacgaccgccccgtcacgtcatgaaagtcggtcgtg-BHQ1-3', SEQ ID No: 59) y dos sondas SMB *eis*-1 (5'-Cianina5-cagcggcgtcgaatattcacgtgcacctggcggcggcctg-BHQ2-3', SEQ ID No: 16) y *eis*-2 (5'-TexasRed-ctcggcgcgatatgccacagctggattctctgacgag-BHQ2-3', SEQ ID No: 61) (donde las secuencias subrayadas representan la porción de tallo de la SMB y BHQ representa el apantallador de huecos negros) se dirigen contra el gen *rrs* y la región promotora de *eis* respectivamente. La sonda de *rrs* se diseñó para ser complementaria a la cadena antisentido y las sondas de *eis* se diseñaron para ser complementarias a la cadena con sentido. Los SMB se diseñaron usando el programa de plegamiento de ADN *in silico* en [http://mfold.rna.albany.edu/?q\\_mfold/dna-folding-form](http://mfold.rna.albany.edu/?q_mfold/dna-folding-form), y el programa de plegamiento híbrido sonda-diana en [http://mfold.rna.albany.edu/?q\\_DINAMelt/Two-state-melting](http://mfold.rna.albany.edu/?q_DINAMelt/Two-state-melting) se usó para predecir las posibles estructuras híbridas sonda-diana y temperaturas de fusión (T<sub>m</sub>). Las sondas se diseñaron para generar una diferencia máxima de T<sub>m</sub> entre secuencias de tipo salvaje y mutantes en sus respectivas regiones diana para permitir la identificación inequívoca de mutaciones. Los cebadores se obtuvieron de Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, EE. UU.) y las sondas SMB de Biosearch Technologies (Novato, California, EE. UU.).

#### Procedimiento de ensayo

Todas las muestras se codificaron independientemente y se distribuyeron aleatoriamente para asegurar que la validación del ensayo se realizaba de una manera ciega. El ensayo se probó tanto en ITRC en Masan, Corea del Sur como en la Escuela Médica de Nueva Jersey (NJMS), Rutgers, Newark, Nueva Jersey. Una vez completada la prueba de todo el conjunto de 603 muestras, las muestras se decodificaron y los resultados de la PCR se compararon con la secuenciación correspondiente y los resultados de las pruebas de susceptibilidad fenotípica a los fármacos. Los resultados obtenidos en cada sitio también se compararon. Los resultados del ensayo no se notificaron a los médicos responsables del tratamiento y no se usaron para guiar ninguna decisión de tratamiento. La PCR se realizó en placas de 384 pocillos usando un sistema de PCR en tiempo real Roche Light Cycler 480 II (Roche Diagnostics Co. Indianápolis, Indiana, EE. UU.) en volúmenes de reacción de 20 µl que contenían cebador directo 100 nM y cebador inverso 1 µM para el gen *rrs* y cebador directo 1 µM y cebador inverso 50 nM para la región promotora de *eis*, 1 ng/µl de sondas de *rrs*-1400 y *eis*-1 y 0,8 ng/µl de sonda *eis*-2, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, trifosfatos de desoxinucleósido 250 mM (dNTP), tampón 1XPCR, glicerol al 8 %, 0,06 U/µl de ADN polimerasa Platino® *TfiExo(-)* (Life Technologies, Grand Island, Nueva York, EE. UU.) y de 2 a 5 ng de ADN de muestra o un volumen equivalente de agua. La PCR se llevó a cabo con las siguientes etapas: activación de la enzima durante 2 min a 95 °C, seguido de 50 ciclos de desnaturalización a

95 °C durante 10 s e hibridación y extensión combinadas a 67 °C durante 30 s. Después del ciclado de PCR, se realizó un análisis post-PCR-Tm por desnaturalización a 95 °C durante 2 min, seguido de enfriamiento hasta 45 °C y luego calentamiento gradual hasta 85 °C, con monitorización continua de la fluorescencia durante el proceso a una tasa de 1 adquisición de datos por grado centígrado. Los valores de Tm se identificaron al final de la reacción usando el software de llamada de Tm (software Light Cyclers 480). Sin embargo, cada Tm también fue verificada por un observador entrenado antes de realizar la identificación final del valor de Tm. Las muestras que mostraron picos dobles distintos para cualquier sonda correspondiente a las Tm de tipo salvaje y mutante se consideraron indicativas de heteror-resistencia. Se utilizó un control sin molde usando agua estéril en lugar de ADN como molde como control negativo de ADN, y también se incluyó un control positivo de ADN usando 1 ng de ADN genómico de *M. tb* H37Rv como molde en cada placa de ensayo.

#### Aprobación de sujetos humanos

Este estudio fue aprobado por los comités de revisión institucionales del Hospital Nacional de Masan, NIAID y Rutgers (anteriormente UMDNJ), y todos los sujetos dieron su consentimiento informado por escrito (protocolo IRB de Rutgers número 0120090104).

#### Ejemplo 2. Identificación de valores de Tm asociados con secuencias de tipo salvaje y mutantes

El ensayo basado en SMB divulgado en la presente memoria detectó resistencia a AMK y KAN buscando mutaciones en el gen *rrs* y el promotor de *eis* de *M.tb* que tienen asociaciones conocidas con resistencia. El ensayo consistió en una etapa de PCR seguida de un análisis de Tm en presencia de sondas SMB complementarias a porciones de los amplicones diana de *rrs* y *eis*. Los inventores evaluaron primero la capacidad del ensayo para identificar las mutaciones diana en oligonucleótidos artificiales y moldes de ADN secuenciados de cepas de *M.tb* de tipo salvaje y mutantes seleccionadas (datos no mostrados). Las secuencias de tipo salvaje se identificaron por la presencia de valores de Tm dentro de 1 °C de los valores medios conocidos para las dianas de tipo salvaje. Las secuencias mutantes se identificaron mediante un desplazamiento en los valores de Tm de al menos cinco desviaciones estándar de los valores medios de Tm de tipo salvaje. La capacidad del ensayo para detectar las mutaciones más prevalentes asociadas con la resistencia a AMK y KAN se evaluó después en las muestras clínicas de ADN. Se realizaron ensayos en un panel de 603 muestras clínicas, que consistían en 487 muestras con secuencias de tipo salvaje y 116 muestras con mutaciones en las dianas de ensayo. Cinco de estas muestras tenían mezclas de ADN tanto de tipo salvaje como mutante detectadas en la secuenciación de Sanger. El ensayo SMB identificó correctamente 115/116 (99 %) muestras mutantes o mixtas (muestras heterogéneas que contenían ADN mutante y de tipo salvaje) como mutantes o mixtas y 487/487 (100 %) muestras de tipo salvaje puras como de tipo salvaje. Se identificó una sola muestra mixta (como se indica por secuenciación de Sanger) como una muestra de tipo salvaje mediante el ensayo divulgado en la presente memoria. Los valores de Tm producidos por cada sonda SMB en el entorno de dianas de tipo salvaje o mutantes eran altamente reproducibles. Para dianas de tipo salvaje, las sondas *rrs*-1400, *eis*-1 y *eis*-2 mostraron valores medios de Tm de 70,1 °C ± 0,15, 63,9 °C ± 0,19 y 69 °C ± 0,23, respectivamente (Tabla 3). Para dianas de Tm mutantes, A1401G y C1402T, las mutaciones dieron como resultado una disminución de 3,9 °C (± 0,17) y 5,6 °C (± 0,21) en los valores de Tm en la sonda *rrs*-1400, respectivamente (Tabla 3). De manera similar, las sondas *eis*-1 y *eis*-2 detectaron robustamente una serie de mutaciones en la región promotora de *eis* como mutante desarrollando una disminución de 4,3 °C a 6,5 °C en los valores de Tm, en comparación con los valores de Tm de tipo salvaje esperados (Tabla 3). Los ensayos de PCR realizados en los dos laboratorios diferentes en Rutgers e ITRC estaban en completo acuerdo para todas las muestras detectadas como de tipo salvaje y mutante, así como mezclas.

Los resultados del ensayo nos permitieron segregar claramente las 603 muestras en tipos de agrupaciones de Tm de tipo salvaje y mutante basándose en sus patrones de Tm de tres puntos individuales (Fig. 1). El ensayo identificó correctamente mutaciones en las 75 muestras que sólo contenían la mutación A1401G (Tabla 3, Fig. 2, panel A). Tres de las cuatro muestras que contenían mezclas de A1401G y secuencia de tipo salvaje también se detectaron como mixtas de tipo salvaje/mutante basándose en la presencia de un pico de Tm doble. Una única muestra que contenía una mezcla de la mutación C1402T y ADN de tipo salvaje también se identificó por la presencia de picos de Tm dobles de la muestra con una Tm específica para el mutante para la mutación C1402T (Tabla 3, Fig. 2, panel A). Las 32 muestras con mutaciones en la región promotora de *eis* incluyeron cinco polimorfismos diferentes (en las posiciones -8, -10, -12, -14 y -37). Todas estas mutaciones se detectaron con éxito por una cualquiera de las SMB de *eis* (Tabla 3, Fig. 2, paneles B y C). Cuatro muestras que tenían mutaciones tanto en el gen *rrs* como en la región promotora de *eis* también se detectaron correctamente como mutantes dobles (Tabla 3). La secuenciación del gen *rrs* no identificó ninguna muestra con una mutación del codón 1484, independientemente de su patrón de susceptibilidad a fármacos.

#### Ejemplo 3. Identificación de la resistencia a amikacina

En este ejemplo, se realizaron ensayos para evaluar el rendimiento del ensayo molecular en relación con los resultados de las pruebas fenotípicas de susceptibilidad a fármacos. El rendimiento aparente de una prueba genotípica de susceptibilidad a fármacos puede variar dependiendo de las mutaciones seleccionadas para su inclusión en la prueba y el ensayo fenotípico que se usa como patrón de oro (Kim, S. J. 2005 Eur Respir J 25:564-569; Rigouts, L., et al., 2013, J Clin Microbiol 51:2641-2645; y Van Deun, A., et al., 2013, J Clin Microbiol 51:2633-2640). Considerando el método de ensayo de susceptibilidad a fármacos basado en LJ como el patrón de oro (realizado para todas las 603 muestras de estudio), la Tm de SMB de *rrs* característica de la mutación A1401G, clasificaba 82/90 de las muestras

resistentes a AMK como resistentes, (sensibilidad del 91,1 %; CI del 95 %, del 82,8 % al 96,8 %). La Tm de tipo salvaje clasificó 512/513 de las muestras susceptibles a AMK como susceptibles. Un aislado individual entre los 513 aislados susceptibles a AMK se identificó como una mezcla de ADN de tipo salvaje y mutante C1402T mediante el ensayo de SMB divulgado en la presente memoria debido a la presencia de un doble pico claro generado por la sonda SMB de *rrs*, correspondiente a la Tm de tipo salvaje y a una Tm específica del mutante C1402T (Figura 2, panel A). Esto también se confirmó mediante secuenciación de Sanger. Dado que estudios previos han mostrado que la mutación C1402T no codifica resistencia a AMK (24), la Tm específica correspondiente a la mutación C1402T puede considerarse como un indicador de susceptibilidad a AMK. Esta consideración dio como resultado que el ensayo divulgado en la presente memoria detecte correctamente todas las muestras 513/513 susceptibles a AMK, dando como resultado una especificidad del 100 % (95 % de CI, 99 al 100 %). La inclusión de los valores de Tm característicos para mutaciones en la región promotora de *eis* en el análisis no aumentó la sensibilidad para detectar la resistencia a AMK, pero disminuyó la especificidad del 100 % al 93,8 % (95 % de CI, 91,2 al 95,6 %). Estos resultados son consistentes con informes previos que sugieren que las mutaciones en el promotor de *eis* no están asociadas con la resistencia a AMK como se define en el ensayo de susceptibilidad a fármacos LJ (Campbell 2011 y Zaunbrecher 2009).

#### Ejemplo 4. Identificación de la resistencia a la kanamicina

El rendimiento de un ensayo para detectar la resistencia a KAN también se evaluó usando pruebas de susceptibilidad a fármacos basadas en LJ como patrón de oro para todas las 603 muestras. Utilizando los valores de Tm generados por la SMB de *rrs* divulgada en la presente memoria típica para la mutación A1401G o C1402T para definir la resistencia, el ensayo detectó 82/106 muestras como resistentes a KAN (sensibilidad 77,4 %; CI del 95 % 68,0 a 84,7 %). Por el contrario, utilizando una Tm de SMB de *rrs* característica de la diana de tipo salvaje para definir la susceptibilidad, identificó 496/497 muestras susceptibles a KAN como susceptibles (Tabla 4) (especificidad 99,8 %; CI del 95 %, 98,7 al 100 %). La adición de los valores de Tm de las dos SMB de *eis* característicos de mutaciones en la la región promotora de *eis* a la definición de resistencia, aumentó la sensibilidad para detectar la resistencia a KAN de 77,4 % a 87,7 % (CI del 95 %, 79,5 a 93 %), ya que 11 muestras resistentes a KAN adicionales se clasificaron como resistentes. Sin embargo, la especificidad disminuyó del 99,8 % al 95,6 % (CI del 95 %, 93,3 al 97,1 %) ya que 21 muestras susceptibles a KAN con mutaciones en el promotor de *eis* se detectaron ahora "falsamente" como resistentes a KAN (Tabla 4).

Después, se realizó un análisis similar usando resultados de ensayo de susceptibilidad a fármacos basados en MGIT como patrón de oro para las 560 de las muestras para las que estaba disponible un resultado de MGIT. Este subconjunto incluía todas las muestras que albergaban solamente mutaciones en el promotor de *eis*. La comparación de los resultados del ensayo con el patrón de oro basado en MGIT ayudó a aclarar los mutantes de *eis* con resistencia discordante a KAN en medio LJ. Usando MGIT como patrón de oro y sólo los valores de Tm de SMB de *rrs* característicos para las mutaciones A1401G o C1402T para definir la resistencia a KAN, solo se identificaron 63/113 muestras resistentes a KAN como resistentes por el ensayo de SMB (sensibilidad 55,8 %; CI del 95 %, 46,1 a 65 %). A la inversa, el uso de la Tm de SMB de *rrs* característica para la diana de tipo salvaje para definir la susceptibilidad identificó 445/447 muestras como susceptibles a KAN (especificidad 99,8 %; CI del 95 %, 98,5 a 100 %; Tabla 4). A diferencia del caso con las pruebas de susceptibilidad basadas en LJ, la inclusión de los valores de Tm característicos para las mutaciones del promotor de *eis* en este caso aumentó la sensibilidad para el ensayo de resistencia del 55,8 % al 82,3 %, permaneciendo la especificidad del ensayo para la resistencia a KAN muy alta al 99,5 % (CI del 95 %, 98,2 al 100 %). Por lo tanto, basándose en una prueba de susceptibilidad basada en MGIT, el ensayo de *eis* permitió la detección de 29 muestras resistentes a KAN adicionales sin afectar a la especificidad (Tabla 4).

#### Ejemplo 5. Relación entre mutaciones detectadas por el ensayo y MIC

La discordancia entre la resistencia como se define por el ensayo divulgado en la presente memoria y la resistencia como se define por dos métodos de ensayo de susceptibilidad fenotípica divulgados en la presente memoria implicaba principalmente aislados con mutaciones en el promotor de *eis*. Estudios previos han mostrado que las mutaciones en el promotor de *eis* dan lugar a niveles relativamente bajos de resistencia a KAN, mientras que las mutaciones en el gen *rrs* dan como resultado un alto nivel de resistencia a AMK, KAN y CAP (Campbell 2011; Du, Q., et al., 2013, Diagn Microbiol Infect Dis 77:138-142; Georghiou 2012; y Zaunbrecher 2009). Un hallazgo adicional en los resultados fue la discordancia entre los resultados de la prueba de susceptibilidad basada en LJ frente a MGIT. Se realizó un ensayo de MIC para explorar más cuidadosamente la relación entre las mutaciones en *rrs* y promotor de *eis*, y sus patrones de susceptibilidad diferencial en el sistema LJ y MGIT. Las muestras que eran susceptibles tanto a AMK como a KAN (y de tipo salvaje en ambas regiones diana), o elegidas para ser representativas de los tipos de mutación más comunes en los dos genes diana (*rrs* A1401G y *eis* G(-10)A, C(-14)T y G(-37)T) se ensayaron por el método MYCOTB para determinar su MIC. También se probaron como controles aislados adicionales que se sabía que eran de tipo salvaje en ambas dianas de ensayo. Se observó que las MIC de AMK de los aislados que sólo tenían mutaciones en promotor de *eis* (sin mutaciones en *rrs*) variaban entre 0,25 µg/ml y 2 µg/ml, mostrando la mayoría de las muestras MIC de 0,5 µg/ml a 1 µg/ml (Fig. 3). Sólo un mutante del promotor de *eis* tenía una MIC de AMK de 4 µg/ml. Los aislados de control sin mutación en el promotor de *eis* o en *rrs* tenían MIC entre 0,25 µg/ml y 0,5 µg/ml de intervalo. Por tanto, las MIC de AMK de los aislados con secuencias promotoras de *eis* de tipo salvaje o mutante se solapaban sustancialmente. Por el contrario, las MIC de KAN para la mayoría de los mutantes del promotor de *eis* variaron de 5 µg/ml a 20 µg/ml, mostrando un aislado una MIC de 40 µg/ml (Fig. 3). Sólo dos mutantes del promotor de *eis* tenían MIC bajas de 2,5 µg/ml. Los aislados con secuencias de promotor de *eis* de tipo salvaje mostraron MIC entre 0,6 µg/ml

y 2,5 µg/ml, que es de 2 a 30 veces menor que la MIC media de la MIC de los mutantes del promotor de *eis* (Fig. 3). Por tanto, en contraste con la situación con AMK, las MIC de KAN de los aislados de tipo salvaje se solapaban muy poco con las MIC de KAN de los mutantes del promotor de *eis*. Estos resultados sugieren fuertemente que los mutantes del promotor de *eis* deberían considerarse que tienen un nivel de bajo a moderado de resistencia a KAN incluso si no se detecta resistencia en ensayos de susceptibilidad basados en LJ o incluso basados en MGIT.

#### Ejemplo 6. Especificidad del ensayo contra bacterias distintas de *M. Tb*.

La especificidad analítica del ensayo se ensayó frente a un panel de 18 especies de micobacterias no tuberculosas (NTM) obtenidas del depósito de la ATCC (Manassas, Virginia, EE. UU.), 121 cepas clínicas de NTM que representan 26 especies, y 18 especies de bacterias gram positivas y gram negativas. La región *rrs* diana en el ensayo aquí está altamente conservada entre diferentes especies de NTM. Por lo tanto, el ensayo de *rrs* generó una Tm de 70 °C (que es idéntica a la Tm generada en presencia de ADN de *M.tb* de tipo salvaje) para todas las NTM ensayadas como se esperaba en base a la homología de secuencia esperada *M. xenopi*, que no generó ninguna Tm. Las especies de NTM que generan valores de Tm idénticos a *M.tb* susceptible a aminoglucósidos no se esperaba que provocara un resultado de prueba de resistencia falsa. Cuando el ADN de *M.tb* de cepas resistentes a AMK y KAN con *rrs* mutante se mezcló con un exceso de 10 a 20 veces de ADN de NTM, se produjo un pico de Tm doble distinto mediante el ensayo, correspondiente a un valor de Tm mutante de la diana de *M.tb* y un valor de Tm de tipo salvaje de la secuencia de NTM (datos no mostrados) que indican que pueden detectarse mutaciones en *rrs* asociadas a resistencia en *M. tb* mediante el ensayo en este caso incluso en presencia de un fondo grande de ADN de NTM. No se generó curva de fusión visible por las sondas de *eis* en presencia de cualquier especie de NTM ensayada incluso cuando se añadieron 10<sup>7</sup> equivalentes genómicos de ADN al ensayo de PCR. Ninguna de las bacterias gram positivas o gram negativas produjo valores de Tm para ninguna de las SMB de *rrs* o *eis*; por tanto, no provocaron ninguna llamada de resistencia falsa que se realice mediante el ensayo.

#### Ejemplo 7. Causas genéticas adicionales de resistencia a AMK y KAN

El estudio en este ejemplo incluyó 22 muestras que eran resistentes a AMK y/o KAN, pero tenían el gen *rrs* y las secuencias promotoras de *eis* de tipo salvaje. Investigaciones recientes han sugerido que las mutaciones en la región no traducida (UTR) en 5' del gen *whiB7* pueden causar resistencia a aminoglucósidos en *M.tb* (27). Determinar si las mutaciones en *whiB7* podrían ser responsables de algunos de los aislados fenotípicamente resistentes, pero susceptibles al ensayo, las 22 muestras se secuenciaron en una región de 412 pb en 5' del sitio de inicio del gen *whiB7* más una porción del marco de lectura abierto de *whiB7*. Como un conjunto de control, también se secuenciaron 30 aislados susceptibles en general elegidos aleatoriamente. De los 22 aislados discordantes, seis aislados de tres pacientes mostraron mutaciones en la región 5'UTR de *whiB7*. Una muestra tenía una delección de citosina en la posición +138 en la 5'UTR, dos muestras de un paciente contenían una mutación A a G en la posición +237, y las tres muestras restantes de un único paciente mostraron una mutación A a C en la posición +273 (Tabla 5) considerando el sitio de inicio de la transcripción como +1 (Reeves, A. Z., 2013, 57:1857-1865). Tres muestras de un único paciente no pudieron generar ninguna amplificación a partir de la 5'UTR después de intentos repetidos de PCR a pesar de que los controles de PCR positivos funcionaban. Esto sugirió la presencia de una gran delección en la región 5'UTR, ya que un fragmento de 275 pb podía amplificarse fácilmente desde dentro del ORF de *whiB7* para las tres muestras. Todas las muestras con mutaciones en *whiB7* eran resistentes solamente a KAN, lo que es consistente con el mecanismo de acción que se presume para *whiB7* por regulación al alza del gen *eis* (Reeves 2013). Las MIC de KAN para estos aislados también eran bajas a 5 µg/ml, lo que es similar a lo observado para los mutantes del promotor de *eis*. Ninguna de las 30 muestras de control que eran susceptibles a aminoglucósidos tenía ninguna mutación en la 5'UTR del gen *whiB7*. Son necesarios estudios adicionales para confirmar la relación de estas mutaciones y la delección en la 5'UTR del gen *whiB7* con resistencia a aminoglucósidos. Sin embargo, la ausencia de tales mutaciones en las cepas susceptibles implica que podrían tener algún papel para jugar en la resistencia a aminoglucósidos y ensayos futuros podrían dirigirse a estas mutaciones para mejorar la sensibilidad para detectar resistencia a KAN de bajo nivel.

Tabla 3: Valores de temperatura de fusión (Tm) de las sondas de rrs y eis ensayadas frente a ADN clínico con secuencias de tipo salvaje y mutantes

		Tm media (°C)			SD (°C) para sonda no.			dTm (°C) para sonda no.			No. de aislados detectado / No. total de aislados con el tipo de mutación
		rrs-1400	eis1	eis2	1	2	3	1	2	3	
gen rrs	No mutación (NM)	78.16	63.98	69.86	0.15	0.19	0.23				487/487
	A1401G	66.26	63.98	69.16	0.10	0.20	0.20	-1.90	0.09	-0.10	75/75
	A1401G + NM	66.20 - 70.16	64.00	69.16	0.18	0.10	0.10	-1.90	-0.10	-0.10	3/4
	C1402T + NM	64.50 - 70.16	64.10	69.26	0.00	0.00	0.00	-3.90	-0.20	-0.20	1/1
promotor eis	delección C(-8)	70.16	64.18	63.16	0.00	0.00	0.00	0.00	-0.20	-0.20	1/1
	G(-10)Δ	76.20	63.80	64.70	0.10	0.20	0.20	-0.10	0.10	+0.10	14/14
	G(-10)Δ + NM	76.20	63.80	64.80 - 69.10	0.10	0.20	0.20	-0.10	0.10	+0.20	1/1
	C(-12)T	70.15	64.04	62.82	0.08	0.22	0.03	-0.05	-0.13	-0.08	3/2
	C(-14)T	70.16	64.00	62.66	0.10	0.20	0.20	0.00	-0.10	-0.10	10/10
gen rrs + promotor eis	rrs-A1401G + eis C(-14)T	66.30	64.10	62.50	0.12	0.14	0.17	-1.80	-0.20	-0.30	4/4

5 SD representa +/- la desviación estándar de los valores de Tm para cada una de las sondas para las diferentes muestras clínicas y dTm representa la diferencia en Tm de las secuencias mutantes respecto a las secuencias de tipo salvaje para cada sonda.

SD; desviación estándar, dTM; delta Tm

Las sondas no 1, 2 y 3 corresponden a las sondas rrs-1400, eis-1 y eis-2 respectivamente.

10 Tabla 4: Susceptibilidad de las cepas clínicas a AMK y KAN por los métodos LJ y MGIT y su relación con las mutaciones presentes en el gen rrs y la región promotora de eis

	rrs A1401G	rrs C1402T	mutaciones en el promotor de eis	gen rrs y promotor de eis de tipo salvaje	Número total de aislados
Resistente a AMK (LJ)	82	0	1	7	90
Susceptible a AMK (LJ)	0	1	31	481	513
Resistente a KAN (LJ)	82	0	11	13	106
Susceptible a KAN (LJ)	0	1	21	475	497
Resistente a KAN (MGIT)	63	0	30	20	113
Susceptible a KAN (MGIT)	1	0	1	445	447

LJ y MGIT implican pruebas de susceptibilidad mediante las proporciones de LJ y los métodos de MGIT, respectivamente.

Tabla 5: Susceptibilidad de las cepas clínicas a AMK y KAN y mutaciones en la región no traducida en 5' del gen *whiB7*

#Aislado	#Paciente	AMK (LJ)	KAN (LJ)	KAN (MGIT)	<i>whiB7</i> 5' UTR
#1	1	S	S	R	NM
#2	2	S	S	R	NM
#3	3	S	S	R	NM
#4	3	S	S	R	NM
#5	4	S	R	R	NM
#6	5	S	R	R	+273-A->C
#7	5	S	R	ND	+273-A->C
#8	5	S	R	R	+273-A->C
#9	6	R	R	R	NM
#10	6	S	S	R	NM
#11	6	R	R	ND	NM
#12	7	S	S	R	Delección +138-C
#13	8	S	S	R	NM
#14	9	S	S	R	Delección probable en UTR
#15	9	S	S	R	Delección probable en UTR
#16	9	S	S	R	Delección probable en UTR
#17	10	R	R	R	NM
#18	11	S	S	R	NM
#19	12	R	R	S	NM
#20	13	S	R	R	+237-A->G
#21	13	S	R	R	+237-A->G
#22	14	R	R	R	NM

LJ y MGIT implican ensayo de susceptibilidad por los métodos de proporciones LJ y MGIT, respectivamente.

ND; no determinado, NM; sin mutación, R; resistente, S; susceptible.

**REIVINDICACIONES**

1. Un kit para detectar *Mycobacterium tuberculosis* resistente a múltiples fármacos en una muestra, comprendiendo el kit:
  - 5 una primera sonda de ácido nucleico para una primera región, siendo dicha primera región un gen *katG* de *Mycobacterium tuberculosis*, en donde la primera sonda de ácido nucleico comprende una secuencia de sonda que tiene una secuencia de SEQ ID No: 56, y
  - una segunda sonda de ácido nucleico para una segunda región seleccionada del grupo que consiste en gen *rpoB*, gen *gyrA*, gen *gyrB*, promotor de *inhA*, gen *rrs*, promotor de *eis* y gen *embB* de *Mycobacterium tuberculosis*.
2. El kit de la reivindicación 1, en donde la primera o segunda sonda de ácido nucleico está marcada.
3. El kit de la reivindicación 2, en donde la primera o segunda sonda de ácido nucleico está marcada con un fluoróforo y un apantallador en sus dos extremos, respectivamente.
- 10 4. El kit de la reivindicación 3, en donde el fluoróforo es fluoresceína, cianina 5, TexasRed o TAMRA.
5. El kit de la reivindicación 3 ó 4, en donde el apantallador es BHQ1, BHQ2 o DABCYL.
6. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la primera o segunda sonda de ácido nucleico es una sonda lineal, una sonda Taqman, una sonda de baliza molecular o una sonda de baliza molecular descuidada.
- 15 7. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende además un par de cebadores directos e inversos para amplificar una porción de un gen *katG* de *Mycobacterium tuberculosis*, en donde el cebador directo comprende una secuencia que es al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 7, 8 ó 9 y el cebador inverso comprende una secuencia que es al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 10 u 11.
8. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la segunda región es el gen *rpoB* o el gen *rrs*.
- 20 9. El kit de la reivindicación 8, que comprende además una ADN polimerasa, nucleótidos de extensión y un tampón.
10. Un método para detectar *Mycobacterium tuberculosis* resistente a múltiples fármacos en una muestra usando un kit según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. Un método para detectar *Mycobacterium tuberculosis* resistente a múltiples fármacos en una muestra, que comprende:
  - 25 amplificar una primera secuencia diana de ácido nucleico con un primer par de cebadores para generar un primer amplicón, siendo el primer par de cebadores específico para una porción de una región del gen *katG*, en donde el cebador directo comprende una secuencia que es al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 7, 8 ó 9 y el cebador inverso comprende una secuencia que es al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 10 u 11,
  - detectar una primera mutación en el primer amplicón,
  - 30 determinar la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* resistente a múltiples fármacos en la muestra en base a la presencia de la primera mutación,
  - en donde la presencia de la mutación es indicativa de la resistencia a fármacos;
  - en donde la etapa de detección se realiza mediante un proceso que comprende
  - poner en contacto el primer amplicón con una primera sonda específica de dicha mutación en condiciones que conducen a una hibridación para formar un híbrido sonda-diana;
  - 35 realizar un análisis de la temperatura de fusión (Tm) para determinar un valor de Tm de ensayo para dicho híbrido sonda-diana; y
  - comparar el valor de Tm de ensayo con un valor de Tm de referencia predeterminado,
  - mediante lo cual el valor de Tm de ensayo, si es diferente del valor de Tm predeterminado, indica la presencia de la mutación,
  - 40 en donde la primera sonda comprende una secuencia de sonda que tiene una secuencia de la SEQ ID No: 56.
12. El método de la reivindicación 11, en donde el valor de Tm de ensayo, si es menor que el valor de Tm de referencia predeterminado, indica la presencia de la mutación.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11-12, que comprende además amplificar una segunda secuencia diana de ácido nucleico con un segundo par de cebadores para generar un segundo amplicón, siendo el segundo par de cebadores específico para una porción de una segunda región seleccionada del grupo que consiste en el gen *rpoB*, gen *gyrA*, gen *gyrB*, promotor de *inhA*, gen *rrs*, promotor de *eis* y gen *embB*.
- 45

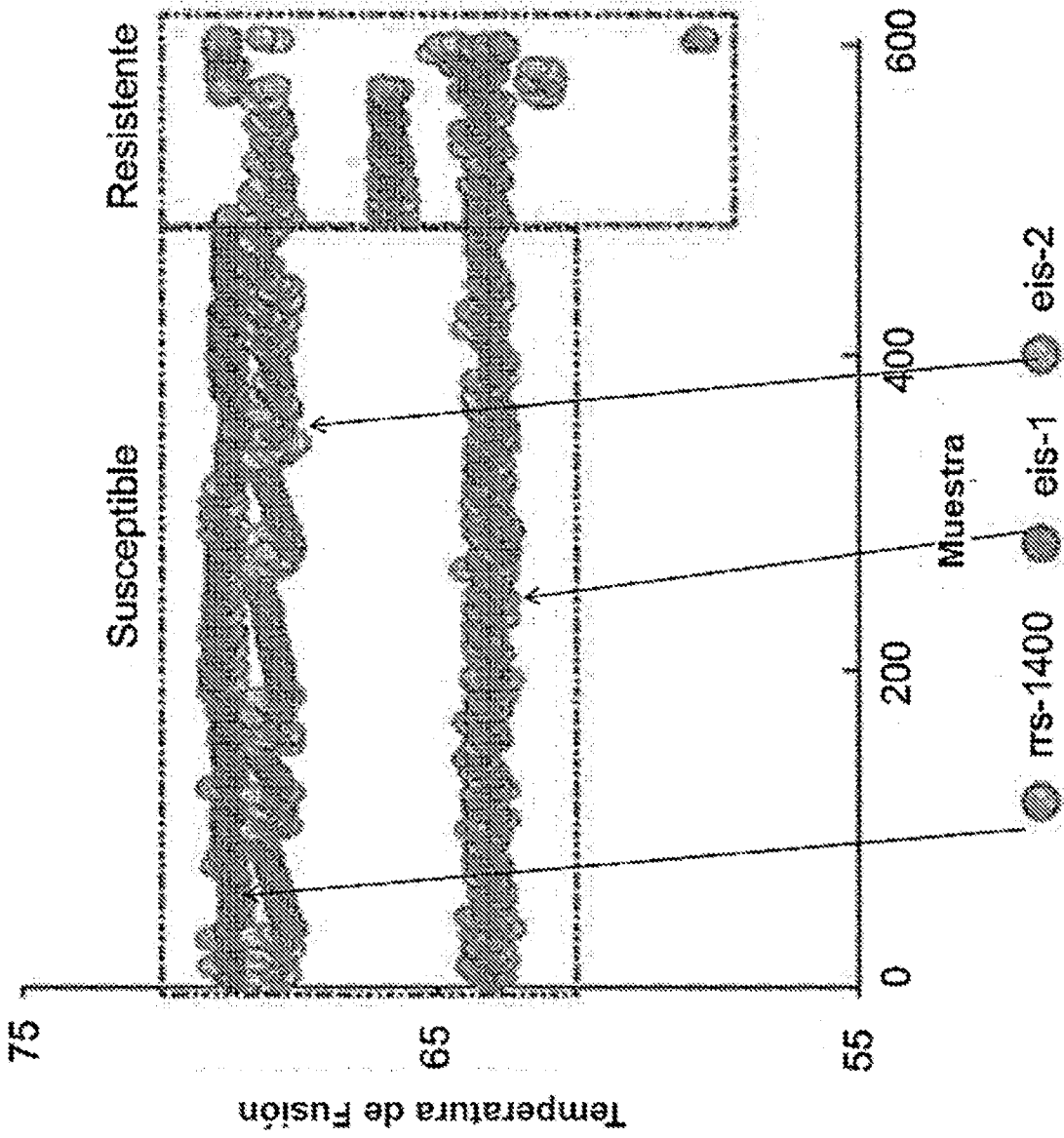
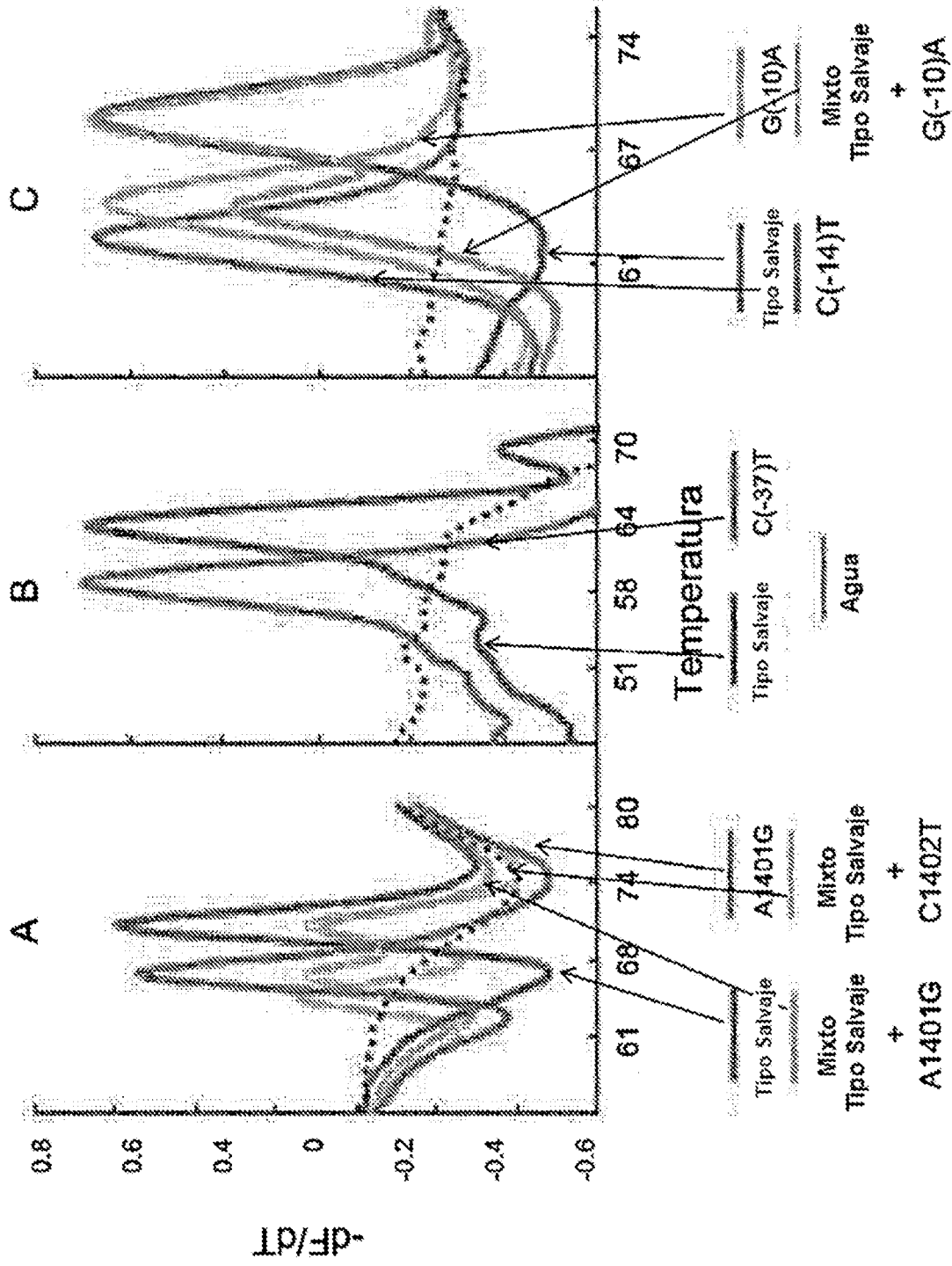


Figura 1



Figuras 2A-C

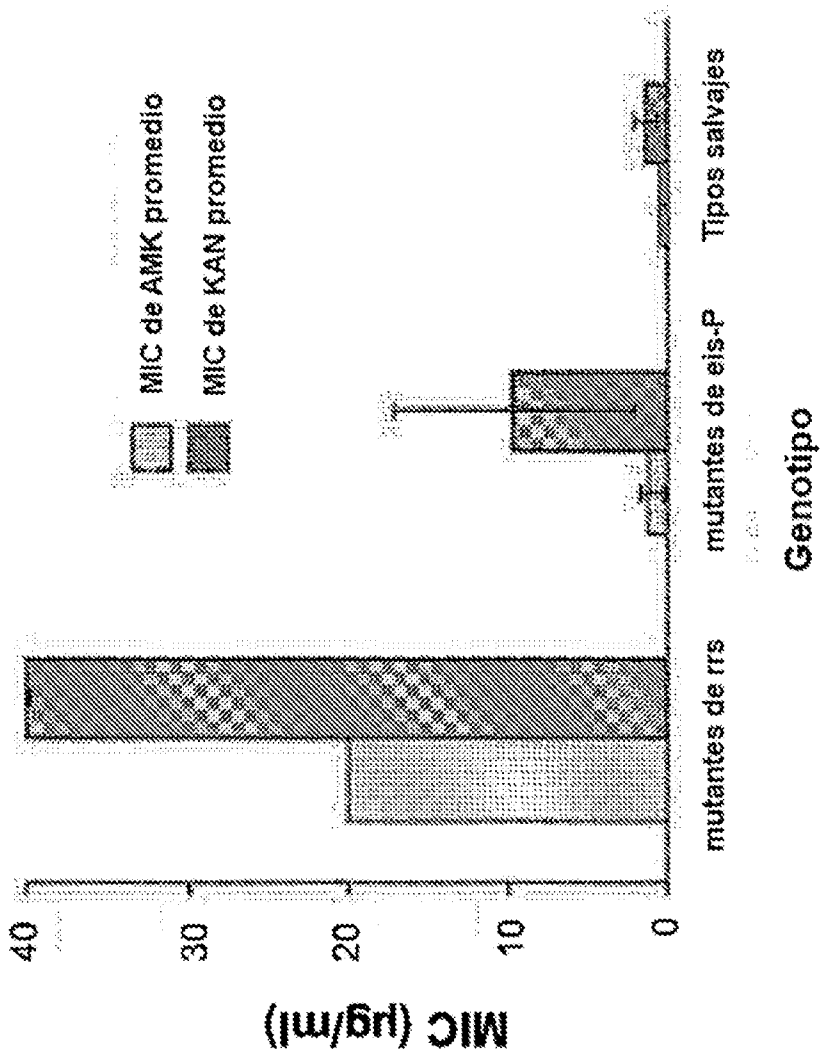


Figura 3