



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 846 973**

⑮ Int. Cl.:

**C12Q 1/689** (2008.01)  
**B01L 3/00** (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.02.2017 PCT/SE2017/050147**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **24.08.2017 WO17142467**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2017 E 17753580 (4)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2020 EP 3417075**

---

④ Título: **Dispositivo de diagnóstico y método relacionado**

⑩ Prioridad:

**15.02.2016 SE 1650197**

④ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**30.07.2021**

⑩ Titular/es:

**EMPE DIAGNOSTICS AB (100.0%)**  
**Nobels Väg 16**  
**171 65 Solna, SE**

⑩ Inventor/es:

**ASALAPURAM, PAVANKUMAR y**  
**NILSSON BERNITZ, MATS**

⑩ Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 846 973 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

Dispositivo de diagnóstico y método relacionado

5 Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a un dispositivo para analizar muestras líquidas y a un método de diagnóstico que emplea dicho dispositivo.

10 Antecedentes de la técnica

Las enfermedades infecciosas son responsables de más de 56 millones de muertes al año (>153.000 al día), donde los miles de millones de personas afectadas restantes padecen morbilidad postinfecciosa, como desnutrición, crecimiento físico y mental deficiente, deterioro del desarrollo cognitivo, etc. Las infecciones prevalentes como la diarrea, el VIH y la tuberculosis (TB) contribuyen con más de la mitad a las tasas de mortalidad totales y requieren atención médica inmediata. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) y UNICEF, alrededor de 2 mil millones de personas sufren enfermedades diarreicas y 1,9 millones de niños menores de 5 años mueren cada año. Esto equivale al 18 % de todas las muertes infantiles (>5000 muertes al día). En 2014, se informó de que había alrededor de 36,9 millones de personas con VIH, de los que 2,6 millones son niños. Aunque las tasas de mortalidad son mínimas en los países desarrollados, entre el 50 y el 80 % de los casos se registran en países en vías de desarrollo situados en regiones de África y del Sudeste Asiático, donde las personas carecen de buenos servicios de salud y de sistemas de diagnóstico de enfermedades infecciosas adecuados.

Como ejemplo, la TB afecta a más de 9 millones de personas y causa 1,5 millones de muertes al año. El agente causal de la TB, el *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), desarrolla generalmente resistencia mediante la adquisición de mutaciones secuenciales en el cromosoma. Las cepas de MTB mutadas que se vuelven resistentes a al menos los dos principales fármacos antituberculosos de primera línea, isoniacida (INH) y rifampicina (RIF), se clasifican como TB multirresistentes (MDR-TB). Otras mutaciones en el MTB contribuyen a una resistencia extrema a los fármacos (XDR-TB) frente a la mayoría de antibióticos restantes, hecho que presenta un desafío en lo que se refiere al diagnóstico y al tratamiento. Básicamente, el MTB se detecta mediante microscopía de frotis, pero esta técnica no puede identificar a las cepas resistentes a los fármacos. Los métodos usados para las pruebas de susceptibilidad a fármacos (DST) basados en cultivos son laboriosos y requieren mucho tiempo (la obtención de resultados correctos requiere entre semanas y meses) debido al lento crecimiento del MTB. Por el contrario, las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT) basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) proporcionan resultados rápidos para la detección de cepas de MTB resistentes a los fármacos mediante diversas técnicas automatizadas y semiautomatizadas. Por ejemplo, la prueba GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, EE. UU.) basada en PCR en tiempo real proporciona resultados en menos de 2 horas mediante el análisis directo de las muestras de esputo. La prueba de hibridación de sonda GeneType MTBDRplus (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Alemania) es capaz de detectar múltiples marcadores de resistencia en paralelo, pero se estima que el sistema tan solo detecta un 95 % y un 74 % de las cepas resistentes a RIF e INH, respectivamente. Además, estas dos pruebas son difíciles de llevar a cabo en laboratorios con recursos limitados porque presentan la necesidad de infraestructura y de personal de laboratorio capacitado. Por consiguiente, la capacidad y el requisito de instrumentación y personal cualificado para las pruebas de amplificación de ácido nucleico (NAAT) disponibles en el presente dificultan la detección rápida de MDR-TB en entornos con recursos limitados.

45 La identificación correcta y sólida de los microbios que provocan enfermedades y de sus patrones genéticos que causan la resistencia a los fármacos continúa siendo un desafío, especialmente en las instalaciones clínicas periféricas. Por tanto, existe una necesidad continua de mejora de dispositivos y de métodos de diagnóstico en el campo del diagnóstico de varias infecciones bacterianas. En particular, existe la necesidad de un dispositivo sencillo y fiable que pueda ser utilizado en combinación con un método molecular competente que pueda abordar los desafíos técnicos y clínicos de las infecciones bacterianas, por ejemplo, de la MDR-TB, para ofrecer una solución adecuada para los centros de atención médica periféricos con recursos limitados.

55 En los documentos WO2010/079479 y WO2013/163353 se describen ejemplos de diferentes tipos de dispositivos de análisis de muestras que pueden proporcionar una señal de una muestra diana, de manera secuencial. Sin embargo, estos resultados son semicualitativos y pueden no brindar respuestas confirmatorias, lo cual afecta especialmente al tratamiento con antibióticos. Por consiguiente, existe la necesidad de dispositivos mejores y fáciles de utilizar que ofrezcan múltiples resultados para una muestra y que proporcionen resultados confirmatorios de las pruebas para poder iniciar un tratamiento adecuado, incluso desde el primer contacto clínico.

60 El documento EP0634215 divulga un dispositivo de flujo lateral para dispositivo para analizar múltiples analitos en tiras de ensayo paralelas.

## Resumen de la invención

Es un objeto de la presente divulgación proporcionar un nuevo dispositivo para analizar muestras líquidas que comprenden ácidos nucleicos amplificados.

5 Es un objeto de la presente divulgación proporcionar un dispositivo que supere los inconvenientes conocidos del estado de la técnica.

Es un objeto de la presente divulgación proporcionar un dispositivo que permita la detección simultánea de múltiples secuencias de ácido nucleico predeterminadas.

10 Es un objeto de la presente divulgación proporcionar un dispositivo que sea simple, conveniente en su uso y que brinde un resultado fiable.

Es además un objeto de la presente invención proporcionar un dispositivo que sea adecuado para su uso en laboratorios periféricos y con recursos limitados.

15 Es también un objeto de la presente invención proporcionar un método combinatorio para la detección de múltiples secuencias de ácido nucleico predeterminadas.

20 Es también un objeto de la presente divulgación proporcionar un método para la detección de la presencia de bacterias resistentes a fármacos y/o antibióticos, focalizándose en las mutaciones genéticas en un sujeto.

25 Estos y otros objetos, que pasan a ser evidentes para los expertos en la técnica a partir de la presente divulgación, se logran mediante diferentes aspectos de la invención según se reivindica en las reivindicaciones adjuntas y se describe de manera general en el presente documento.

25 Por tanto, en el primer aspecto de la presente divulgación se proporciona un dispositivo para analizar muestras líquidas que comprenden ácidos nucleicos amplificados, comprendiendo dicho dispositivo:

30 una almohadilla de muestra,

35 una primera y una segunda tiras de análisis de muestra configuradas para analizar diferentes aspectos de la muestra de ácido nucleico, en donde la primera y la segunda tiras son alargadas y se extienden desde la almohadilla de muestra y cada una de dichas primera y segunda tiras comprende una sección de análisis sustancialmente recta dividida en un número de segmentos, cada uno configurado para indicar si un ácido nucleico diana con una secuencia predeterminada está presente o ausente de dicha muestra, dicho ácido nucleico diana con una secuencia predeterminada estando acoplado directa o indirectamente a una molécula de detección, y

40 en donde las secciones de análisis de dichas primera y segunda tiras de análisis de muestra comprenden una película de respaldo cubierta por una capa transparente con un grosor de al menos 0,1 mm, dichas secciones de análisis están configuradas para analizar la presencia o la ausencia de ácidos nucleicos con diferentes secuencias predeterminadas, teniendo dichas secciones de análisis de las primera y segunda tiras de análisis de muestra sustancialmente la misma longitud y estando dispuestas una al lado de la otra de manera que el resultado del análisis es detectable a partir de la combinación de las marcas tridimensionales que aparecen en la capa transparente de segmentos alineados de dichas primera y segunda tiras de análisis,

45 en donde dichos segmentos comprenden secuencias de ácido nucleico que son complementarias a las secuencias predeterminadas de los ácidos nucleicos diana cuya presencia o ausencia es analizada;

50 y

una carcasa que encierra dicha almohadilla de muestra y al menos dos tiras alargadas de análisis de muestra, comprendiendo dicha carcasa un lado frontal en el que se forma un pasaje de entrada de muestra de manera que la almohadilla de muestra es accesible desde el exterior de la carcasa y al menos una abertura de manera que el resultado del análisis es detectable desde el exterior de la carcasa.

60 El dispositivo de la presente divulgación puede, por ejemplo, hacer uso de biosensores de ácido nucleico de flujo lateral (LFNAB). En un LFNAB, las etiquetas que comprenden una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a la secuencia de ácido nucleico predeterminada son inmovilizadas en una membrana, por ejemplo, una membrana de nitrocelulosa o una membrana de nylon. A medida que la muestra pasa por la tira de análisis, las moléculas de ácido nucleico que comprenden la secuencia de ácido nucleico predeterminada se unirán a sus secuencias complementarias inmovilizadas.

65 El dispositivo de acuerdo con la invención hace posible analizar muestras sin requerir análisis médicos avanzados adicionales, lo cual hace que sea muy útil en áreas geográficas en las que el acceso a los equipos de análisis médicos es limitado. El dispositivo, debido a su característico diseño, proporciona un resultado detallado que facilita una

medicación correcta y efectiva, evitando tratamientos empíricos. Por tanto, es muy ventajoso para el paciente y ayuda a evitar efectos adversos innecesarios y reduce la cantidad de fármacos prescritos sin tratar al paciente. La almohadilla de muestra y las secciones de análisis están protegidas por la carcasa y listas para su uso sin requerir ningún tipo de preparación.

- 5 En particular, el dispositivo de la presente invención proporciona una forma de brindar información sobre, por ejemplo, el patrón de susceptibilidad a fármacos en las primeras etapas del diagnóstico, lo cual ciertamente podría ayudar a los médicos a iniciar un tratamiento apropiado de las enfermedades infecciosas. Adicionalmente, el presente dispositivo es adecuado para su uso en laboratorios periféricos.
- 10 Además, los diferentes segmentos de las secciones de análisis que comprenden una película de soporte cubierta por una capa transparente generan una marca tridimensional muy distintiva que aparece en la capa transparente del segmento indicador, que facilita la lectura del resultado y que garantiza que el resultado sea leído correctamente.
- 15 Tal y como se usa en el presente documento, el término "enfermedades infecciosas" hace referencia a enfermedades fisiológicas causadas por microorganismos, tales como bacterias, virus, parásitos u hongos. Las enfermedades infecciosas pueden propagarse, directa o indirectamente, entre humanos y animales.
- 20 Tal y como se usa en el presente documento, el término "ácidos nucleicos" hace referencia a cualquier forma de ácido desoxirribonucleico (ADN) compuesto de bases como adenina, guanina, citosina y timina, que transporta códigos genéticos y que determina la función biológica de cualquier organismo vivo. De manera similar al ADN, pero más versátil, los ácidos ribonucleicos (ARN) que están formados por adenina, guanina, citosina y uracilo transfieren códigos genéticos y transmiten la información. Por consiguiente, el término ácidos nucleicos hace referencia a cualquier forma de ADN o ARN y sus asociados. Los ejemplos no excluyentes de dichos asociados incluyen CADN, mARN, tARN, 25 rARN, snARN, miARN, si-ARN, piARN, rnARN, scaARN, ncARN largo, ADN extracelular y ARN extracelular.
- 30 Tal y como se usa en el presente documento, el término "laboratorios periféricos" hace referencia a cualquier laboratorio clínico, por ejemplo, centros de salud rurales y campamentos médicos, con instalaciones médicas muy limitadas, que, por ejemplo, carezcan de equipos estándar, apósticos y medicamentos, antibióticos, así como con limitaciones o incluso carencias de personal sanitario capacitado para brindar diagnóstico y tratamiento.
- 35 En una realización del dispositivo según se describe en el presente documento, la primera y la segunda secciones de análisis de muestra están configuradas para analizar si la muestra líquida comprende una variante de tipo salvaje de un gen o gen parcial, o si comprende una variante mutante de dicho gen o gen parcial. Tal y como se usa en el presente documento, dicha variante de tipo salvaje y su variante mutante correspondiente se denominan "par de variantes tipo salvaje-mutante". El experto en la técnica apreciará que una secuencia mutante de un gen o de un gen parcial difiere de la secuencia de tipo salvaje de dicho gen o gen parcial en al menos una posición de nucleótido.
- 40 Por tanto, en una realización, se proporciona un dispositivo según se divulga en el presente documento, en donde la sección de análisis de la primera tira de análisis de muestra comprende al menos un segmento que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico parcial de un gen de tipo salvaje y la sección de análisis de la segunda tira de análisis de muestra comprende al menos un segmento que comprende la correspondiente secuencia de ácido nucleico de un mutante de dicho gen, dicha secuencia correspondiente de ácido nucleico incluyendo al menos una mutación. En una realización, dichas secuencias de ácido nucleico tienen una longitud de aproximadamente 10-40 nucleótidos, como una longitud de 18-30 nucleótidos. En otra realización, dichas secuencias de ácido nucleico tienen una longitud de aproximadamente 60-130 nucleótidos, como una longitud de 70-120 nucleótidos. En una realización, dicha secuencia de ácido nucleico es biotinilada y/o unida con proteína o péptido. En este contexto, el término "correspondiente" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que comprende la mutación o las múltiples mutaciones cuya presencia o ausencia se va a detectar. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico de un gen mutante a su correspondiente gen de tipo salvaje comprende las variaciones de secuencias de ácido nucleico iguales o complementarias en 5' y/o 3' del lugar de la mutación o las mutaciones.
- 45 Debe entenderse que dicha al menos una secuencia de ácido nucleico parcial en dicho al menos un segmento está acoplada o conjugada o hibridada o inmovilizada a la sección de análisis, por ejemplo, por medios covalentes o por medios hidrófobos. Por tanto, en una realización del dispositivo según se divulga en el presente documento, dicha al menos una secuencia de ácido nucleico parcial está acoplada covalentemente al menos un segmento de la sección de análisis. En otra realización del dispositivo según se divulga en el presente documento, dicha al menos una secuencia de ácido nucleico parcial está acoplada mediante un enlace hidrófobo o iónico o de hidrógeno al menos un segmento de la sección de análisis.
- 50 Los expertos en la técnica apreciarán que dicha al menos una secuencia de ácido nucleico parcial en dicho al menos un segmento de la sección de análisis puede adherirse por medio de la adsorción física no específica de un ADN monocatenario a una nitrocelulosa, mediante acoplamiento diazoico o mediante métodos fotoquímicos. Por ejemplo, el ácido nucleico a adherir puede ser desnaturizado y aplicado a la membrana en un tampón salino inmovilizado por radiación UV (en el caso de una membrana de nylon) o cocción (en el caso de una membrana de nitrocelulosa) o modificando las interacciones iónicas. Los expertos en la técnica conocen otros medios de acoplamiento adecuados.
- 55
- 60
- 65

Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "Biosensores de flujo lateral (LFNAB)" hace referencia a sensores utilizados en las pruebas inmunocromatográficas. El principio general es que las moléculas de prueba en la mezcla de reacción fluyen por movimiento capilar mediado por la gravedad y las señales visuales (cambio de color) se desarrollan en las tiras de membrana mediante la hibridación de sustratos, como por ejemplo estreptavidina, biotina, peroxidasa de rábano, nanopartículas de oro conjugado (AuNP) o fluoróforos. Los expertos en la técnica apreciarán que pueden existir muchas variantes de dichas pruebas.

5 En una realización del dispositivo, dichas secciones de análisis son formadas de un material de celulosa transparente o material polimérico. Estos materiales son favorables debido a su carácter sostenible.

10 En una realización del dispositivo, la película de respaldo y la marca tridimensional que aparece en los segmentos tienen colores diferentes para mejorar en mayor medida la precisión durante la lectura del resultado detectado y para garantizar que la información del dispositivo se lea correctamente.

15 En una realización de la presente divulgación, se proporciona un dispositivo tal y como el descrito, en donde la sección o tira de análisis comprende una membrana seleccionada entre el grupo consistente en membrana de nylon, membrana de PVDF, membrana de nitrocelulosa. En una realización particular, dicha membrana es una membrana de nitrocelulosa. En una realización, la tira de análisis y la sección de análisis son del mismo material.

20 Debe entenderse que pueden analizarse simultáneamente varios pares de variantes tipo salvaje-mutante diferentes en las mismas primera y segunda secciones de análisis de muestra. Por ejemplo, se pueden analizar al menos dos pares de variantes tipo salvaje-mutante de manera simultánea en las mismas primera y segunda secciones de análisis de muestra, como al menos 4, al menos 6, al menos 8 o al menos 10. Ello se debe a que cada sección de análisis 25 puede contener varios segmentos, en donde cada segmento comprende una secuencia de ácido nucleico que corresponde a la secuencia mutante o de tipo salvaje.

30 En una realización de la presente divulgación, la almohadilla de muestra y la parte de las tiras alargadas de análisis de muestra que se extiende desde la almohadilla de muestra hasta el primer segmento se forman en una sola pieza de material. Esta realización es muy favorable, puesto que la muestra podrá fluir más rápidamente, facilitando las fuerzas capilares, desde la almohadilla de muestra y a través de las tiras de análisis de muestra.

35 Por tanto, en una realización, se proporciona un dispositivo en donde cada sección de análisis de muestra contiene al menos 2 segmentos que comprenden diferentes ácidos nucleicos, como al menos 4 segmentos, como al menos 6 segmentos y como al menos 10 segmentos.

40 La presente invención puede ser utilizada para la detección de cualquier bacteria grampositiva o gramnegativa y sus marcadores de resistencia. La presente invención también puede ser utilizada para la detección de, por ejemplo, patógenos que causan enfermedades como actinomicosis, ántrax, brucelosis, infecciones por caphylobacter, cólera, infecciones clostridiales, difteria, diarrea, infecciones enterocócicas, erisipelotícosis, gangrena gaseosa, infecciones entéricas (por klebsiella, enterobactor, serratia, escherichia coli), legionelosis, leptospirosis, lesteriosis, enfermedad de Lyme, infecciones meningocócicas, tos ferina, peste, neumonía, infecciones pseudomónicas, salmonelosis, tifus, infecciones meningocócicas, infecciones estafilocócicas e infecciones por criptosporidio. También pueden detectarse 45 marcadores de las enfermedades antes mencionadas, como, por ejemplo, resistencia a la meticilina, resistencia a la beta-lactamasa de espectro extendido, resistencia a la vancomicina y resistencia a metales. La presente invención puede también ser útil para la identificación de virus de ADN y ARN que provocan enfermedades en animales y plantas y de sus marcadores de resistencia, como, por ejemplo, virus que pertenecen a la categoría de los adenovirus, virus de Epstein-Barr, herpes, hepatitis, citomegalovirus, influenza, VIH/SIDA, papiloma, polio, rabia, parainfluenza, virus 50 sincitial respiratorio, rubéola y virus de la varicela-zóster.

55 La presente invención puede también ser útil para la identificación de infecciones fúngicas y de sus marcadores, como, por ejemplo, aspergilosis, blastomicosis, candidiasis, coccidioidomicosis ( fiebre del valle), infección por c. neoformans, c. gattii, infecciones oculares como histoplasmosis, mucormicosis, neumonía por pneumocistis, infecciones por parásitos como tiña, gusano redondo, filariasis, esporotricosis y ascaris.

60 Tal y como se ilustra en el presente documento, el presente dispositivo puede ser utilizado en una prueba genética para la detección de microbios patógenos y de sus marcadores de resistencia, incluido el complejo *Mycobacterium tuberculosis*. El complejo *Mycobacterium tuberculosis* hace referencia a un grupo genéticamente relacionado de especies de *Mycobacterium* que pueden provocar tuberculosis en humanos, animales y en otros organismos multicelulares. Los ejemplos no excluyentes de las especies de *Mycobacteria* incluyen *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium suricattae*, *Mycobacterium mungi*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium paratuberculosis* y también cepas de micobacterias no tuberculosas como *Mycobacteria leprae* y *Mycobacterium lepromatosis*.

En la sección de Ejemplos, se describe la presente invención en el contexto de una prueba genética para la detección de marcadores de resistencia a antibióticos en el complejo Mycobacterium tuberculosis. Los expertos en la técnica se percatarán de que este ejemplo no debe verse como un ejemplo excluyente en modo alguno. El dispositivo de la presente divulgación es igualmente adecuado en una prueba genética para la indicación de la presencia o la ausencia de cualquier ácido nucleico con una secuencia predeterminada en una muestra.

Tal y como se usa en el presente documento, el término "resistencia a antibióticos" se refiere a la presencia de una mutación o de varias mutaciones en los genes o de mutaciones en las proteínas o las enzimas de cualquier ser vivo que provocan resistencia a los antimicrobianos, incluidos los antibióticos. Dichos fenotipos/genotipos resistentes no responden a los antibióticos.

Tal y como se usa en el presente documento, el término "marcador de resistencia a antibióticos" se refiere a la variante mutante de un gen, variante que confiere la resistencia a los antimicrobianos, incluidos los antibióticos.

En el contexto de la presente divulgación, un par de variantes tipo salvaje-mutante puede comprender un marcador de resistencia a antibióticos, que confiere resistencia a antibióticos mediante la mutación en cualquier posición de nucleótidos en genes como rpoB, katG, inhA, gyrA, rrs, eis o emb; y su secuencia de tipo salvaje, que no confiere resistencia a los antibióticos. Los ejemplos no excluyentes de marcadores de resistencia a antibióticos del complejo Mycobacterium tuberculosis incluyen rpoB 176 TGC, rpoB 432 GGC, rpoB 432 ACC, rpoB 432 AGC, rpoB 432 CAG, rpoB 432 CTG, rpoB 432 AGC, rpoB 432 CAG, rpoB 436 CTG, rpoB 437 AGC, rpoB 438 CAA, rpoB 438 TTC, rpoB 438 ATG, rpoB 441 GAC, rpoB 441 AAC, rpoB 441 CAG, rpoB 444 AAC, rpoB 444 CCG, rpoB 444 CTG, rpoB 447 TCG, rpoB 447 GGG, rpoB 447 TTG, rpoB 447 ACC, rpoB 451 CAC, rpoB 451 AAG, rpoB 451 CGC, rpoB 451 CGA, rpoB 451 CTG, rpoB 456 TCG, rpoB 456 GCG, rpoB 458 CTG, rpoB 486 CTG, rpoB 486 ATC, rpoB 496 CTG, rpoB 497 ATC, rpoB 513 CCA, rpoB 515 ATC, rpoB 516 TAC, rpoB 516 GTC, rpoB 522 TGG, rpoB 526 CGC, rpoB 526, rpoB 526 GAC, rpoB 526 CTC, rpoB 526 ACC, rpoB 531 TTG, rpoB 531 TGG, rpoB 533 CCG, rpoB 558 CGC, rpoB 598 GAG, katG 269 CGT, katG 463 CTG, katG 379 ACC, katG 98 TGC, katG 352 GAA, katG 463 CTG, katG 315 ACC, katG 202 GCA, katG 203 ACT, inserción katG 518 GGTC, katG 315 AAC, katG127 CCG, katG 506 TAG, katG 315 ACA, katG 315 ACG, katG 315 ACT, katG 315 ATC, katG 315 AGA, katG 315 CGC, katG 315 CGC, inhA -15 T, inhA -8, inhA -17G, inhA -17T, inhA -34G, inhA -34T, mutaciones de inhA -47 T, mutaciones en ahpC-oxyR en los codones -10, -6, -39, -48, -15, 12 y -9, rrs 483 T, rrs 485 G, rrs 496A, rrs 491 T, rrs 512T, rrs 798T, rrs 877A, rrs 904G, rrs 906 C, rrs 904 T, rrs 1401 G, rpsL 43 AGG, rpsL 88 CAG, rpsL 128 G, rpsL 263 G, rpsL 262 C, gyrA 94G, gyrA 90T, gyrA 90V, gyrA S91 P, gyrA D94A, gyrA D94G, gyrA 94N, gyrA 94H, emb 306v ATG, emb306i ATG, eis -10G/A, eis -12C/T, eis -15 C/G, y rrs 1401 A/G. Los ejemplos no limitantes de las correspondientes secuencias de tipo salvaje incluyen las regiones génicas conservadas de katG wt, rpoB wt, gyrA wt, rrs wt, eis wt, emb wt, ahpC wt, oxyR wt, y rpsL wt, por ejemplo, las secuencias de genes en los codones de rpoB 516 wt, katG 315 wt, rpoB 331 wt, rpoB 531 wt, rpoB 526 wt, inhA -15 wt, rrs 1401 wt, gyrA 94 wt, gyrA 90 wt, rpoB 533 wt, emb 306wt, eis -10wt, eis -12wt, y eis -15 wt. En este contexto, un ejemplo de par de variante tipo salvaje-mutante es rpoB 516 TAC y rpoB 516 wt.

En una realización, se proporciona un dispositivo según se describe en el presente documento, en donde el mencionado gen comprende un marcador de resistencia a antibióticos, como un marcador de resistencia a antibióticos del complejo Mycobacterium tuberculosis.

En una realización, dicho marcador de resistencia a antibióticos es seleccionado de entre el grupo constituido por rpoB 176 TGC, rpoB 432 GGC, rpoB 432 ACC, rpoB 432 AGC, rpoB 432 CAG, rpoB 432 CTG, rpoB 432 AGC, rpoB 432 CAG, rpoB 436 CTG, rpoB 437 AGC, rpoB 438 CAA, rpoB 438 TTC, rpoB 438 ATG, rpoB 441 GAC, rpoB 441 AAC, rpoB 441 CAG, rpoB 444 AAC, rpoB 444 CCG, rpoB 444 CTG, rpoB 447 TCG, rpoB 447 GGG, rpoB 447 TTG, rpoB 447 ACC, rpoB 451 CAC, rpoB 451 AAG, rpoB 451 CGC, rpoB 451 CGA, rpoB 451 CTG, rpoB 456 TCG, rpoB 456 GCG, rpoB 458 CTG, rpoB 486 ATC, rpoB 496 CTG, rpoB 497 ATC, rpoB 513 CCA, rpoB 515 ATC, rpoB 516 TAC, rpoB 516 GTC, rpoB 522 TGG, rpoB 526 CGC, rpoB 526, rpoB 526 GAC, rpoB 526 CTC, rpoB 526 ACC, rpoB 531 TTG, rpoB 531 TGG, rpoB 533 CCG, rpoB 558 CGC, rpoB 598 GAG, katG 269 CGT, katG 463 CTG, katG 379 ACC, katG 98 TGC, katG 352 GAA, katG 463 CTG, katG 315 ACC, katG 202 GCA, katG 203 ACT, inserción katG 518 GGTC, katG 315 AAC, katG127 CCG, katG 506 TAG, katG 315 ACA, katG 315 ACG, katG 315 ACT, katG 315 ATC, katG 315 AGA, katG 315 GGC, katG 315 CGC, inhA -15 T, inhA -8, inhA -17G, inhA -17T, inhA -34G, inhA -34T, mutaciones de inhA -47 T, mutaciones en ahpC-oxyR en los codones -10, -6, -39, -48, -15, 12 y -9, rrs 483 T, rrs 485 G, rrs 496A, rrs 491 T, rrs 512T, rrs 798T, rrs 877A, rrs 904G, rrs 906 C, rrs 904 T, rrs 1401 G, rpsL 43 AGG, rpsL 88 CAG, rpsL 128 G, rpsL 263 G, rpsL 262 C, rrs 1401 G, gyrA 94G, gyrA 90T, gyrA 90V, gyrA S91 P, gyrA D94A, gyrA D94G, gyrA 94N, gyrA 94H, emb 306v ATG, emb306i ATG, eis -10G/A, eis -12C/T, eis -15 C/G, y rrs 15 A/G. En una realización, dicho marcador de resistencia a los antibióticos es seleccionado de entre el grupo constituido por rpoB 176 TGC, rpoB 432 GGC, rpoB 432 ACC, rpoB 432 AGC, rpoB 432 CAG, rpoB 432 CTG, rpoB 432 AGC, rpoB 432 CAG, rpoB 436 CTG, rpoB 437 AGC, rpoB 438 CAA, rpoB 438 TTC, rpoB 438 ATG, rpoB 441 GAC, rpoB 441 AAC, rpoB 441 CAG, rpoB 444 AAC, rpoB 444 CCG, rpoB 444 CTG, rpoB 447 TCG, rpoB 447 GGG, rpoB 447 TTG, rpoB 447 ACC, rpoB 451 CAC, rpoB 451 AAG, rpoB 451 CGC, rpoB 451 CGA, rpoB 451 CTG, rpoB 456 TCG, rpoB 456 GCG, rpoB 458 CTG, rpoB 486 ATC, rpoB 486 CTG, rpoB 496 CTG, rpoB 497 ATC, rpoB 513 CCA, rpoB 515 ATC, rpoB 516 TAC, rpoB 516 GTC, rpoB 522 TGG, rpoB 526 CGC, rpoB 526, rpoB 526 GAC, rpoB 526 CTC, rpoB 526 ACC, rpoB 531 TTG, rpoB 531 TGG, rpoB 533 CCG, rpoB 558 CGC y rpoB 598 GAG. En una realización, dicho marcador de resistencia a los antibióticos se selecciona de entre el grupo constituido por katG 269 CGT, katG 463

CTG, katG 379 ACC, katG 98 TGC, katG 352 GAA, katG 463 CTG, katG 315 ACC, katG 202 GCA, katG 203 ACT, inserción katG 518 GGTC, katG 315 AAC, katG127 CCG, katG 506 TAG, katG 315 ACA, katG 315 ACG, katG 315 ACT, katG 315 ATC, katG 315 AGA, katG 315 GGC, katG 315 CGC, inhA -15 T, inhA -8, inhA -17G, inhA -17T, inhA -34G, inhA -34T, mutaciones de inhA -47 T. En una realización, dicho marcador de resistencia a los antibióticos se

5 selecciona de entre el grupo constituido por gyrA 94G, gyrA 90T, gyrA 90V, gyrA S91 P, gyrA D94A, gyrA D94G, gyrA 94N, gyrA 94H. En una realización, dicho marcador de resistencia a los antibióticos es seleccionado de entre el grupo constituido por mutaciones en ahpC-oxyR en los codones -10, -6, -39, -48, -15, 12 y -9, rrs 483 T, rrs 485 G, rrs 496A, rrs 491 T, rrs 512T, rrs 798T, rrs 877A, rrs 904G, rrs 906 C, rrs 904 T, rrs 1401 G, rpsL 43 AGG, rpsL 88 CAG, rpsL 128 G, rpsL 263 G, rpsL 262 C, rrs 1401 G, gyrA 94G, gyrA 90T, gyrA 90V, gyrA S91 P, gyrA D94A, gyrA D94G, gyrA 94N, gyrA 94H, emb 306v ATG, emb306i ATG, eis -10G/A, eis -12C/T, eis -15 C/G, y rrs 1401 A/G.

10 En una realización del dispositivo según se describe en el presente documento, dicho al menos un segmento comprende una secuencia de ácido nucleico de un marcador de resistencia a los antibióticos seleccionado de entre el grupo constituido por rpoB 176 TGC, rpoB 432 GGC, rpoB 432 ACC, rpoB 432 AGC, rpoB 432 CAG, rpoB 432 CTG, rpoB 432 AGC, rpoB 432 CAG, rpoB 436 CTG, rpoB 437 AGC, rpoB 438 CAA, rpoB 438 TTC, rpoB 438 ATG, rpoB 441 GAC, rpoB 441 AAC, rpoB 441 CAG, rpoB 444 AAC, rpoB 444 CCG, rpoB 444 CTG, rpoB 447 TCG, rpoB 447 GGG, rpoB 447 TTG, rpoB 447 ACC, rpoB 451 CAC, rpoB 451 AAG, rpoB 451 CGC, rpoB 451 CGA, rpoB 451 CTG, rpoB 456 TCG, rpoB 456 GCG, rpoB 458 CTG, rpoB 486 CTG, rpoB 486 ATC, rpoB 496 CTG, rpoB 497 ATC, rpoB 513 CCA, rpoB 515 ATC, rpoB 516 TAC, rpoB 516 GTC, rpoB 522 TGG, rpoB 526 CGC, rpoB 526, rpoB 526 GAC,

15 rpoB 526 CTC, rpoB 526 ACC, rpoB 531 TTG, rpoB 531 TGG, rpoB 533 CCG, rpoB 558 CGC, rpoB 598 GAG, katG 269 CGT, katG 463 CTG, katG 379 ACC, katG 98 TGC, katG 352 GAA, katG 463 CTG, katG 315 ACC, katG 202 GCA, katG 203 ACT, inserción katG 518 GGTC, katG 315 AAC, katG127 CCG, katG 506 TAG, katG 315 ACA, katG 315 ACG, katG 315 ACT, katG 315 ATC, katG 315 AGA, katG 315 GGC, katG 315 CGC, inhA -15 T, inhA -8, inhA -17G, inhA -17T, inhA -34G, inhA -34T, mutaciones de inhA -47 T, mutaciones en ahpC-oxyR en los codones -10, -6, -39, -48, -15, 12 y -9, rrs 483 T, rrs 485 G, rrs 496A, rrs 491 T, rrs 512T, rrs 798T, rrs 877A, rrs 904G, rrs 906 C, rrs 904 T, rrs 1401 G, rpsL 43 AGG, rpsL 88 CAG, rpsL 128 G, rpsL 263 G, rpsL 262 C, rrs 1401 G, gyrA 94G, gyrA 90T, gyrA 90V, gyrA S91 P, gyrA D94A, gyrA D94G, gyrA 94N, gyrA 94H, emb 306v ATG, emb306i ATG, eis -10G/A, eis -12C/T, eis -15 C/G, y rrs 1401 A/G. En una realización, dicho al menos un segmento comprende una secuencia de ácido nucleico de un marcador de resistencia a antibióticos seleccionado de entre el grupo constituido por rpoB 176 TGC,

20 rpoB 432 GGC, rpoB 432 ACC, rpoB 432 AGC, rpoB 432 CAG, rpoB 432 CTG, rpoB 432 AGC, rpoB 432 CAG, rpoB 436 CTG, rpoB 437 AGC, rpoB 438 CAA, rpoB 438 TTC, rpoB 438 ATG, rpoB 441 GAC, rpoB 441 AAC, rpoB 441 CAG, rpoB 444 AAC, rpoB 444 CCG, rpoB 444 CTG, rpoB 447 TCG, rpoB 447 GGG, rpoB 447 TTG, rpoB 447 ACC, rpoB 451 CAC, rpoB 451 AAG, rpoB 451 CGC, rpoB 451 CGA, rpoB 451 CTG, rpoB 456 TCG, rpoB 456 GCG, rpoB 458 CTG, rpoB 486 CTG, rpoB 486 ATC, rpoB 496 CTG, rpoB 497 ATC, rpoB 513 CCA, rpoB 515 ATC, rpoB 516 TAC, rpoB 516 GTC, rpoB 522 TGG, rpoB 526 CGC, rpoB 526, rpoB 526 GAC, rpoB 526 CTC, rpoB 526 ACC, rpoB 531 TTG, rpoB 531 TGG, rpoB 533 CCG, rpoB 558 CGC y rpoB 598 GAG. En una realización, dicho al menos un segmento comprende una secuencia de ácido nucleico de un marcador de resistencia a antibióticos seleccionado de entre el grupo constituido por katG 269 CGT, katG 463 CTG, katG 379 ACC, katG 98 TGC, katG 352 GAA, katG 463 CTG, katG 315 ACC, katG 202 GCA, katG 203 ACT, inserción katG 518 GGTC, katG 315 AAC, katG127 CCG, katG 506 TAG, katG 315 ACA, katG 315 ACG, katG 315 ACT, katG 315 ATC, katG 315 AGA, katG 315 GGC, katG 315 CGC, inhA -15 T, inhA -8, inhA -17G, inhA -17T, inhA -34G, inhA -34T, mutaciones de inhA -47 T. En una realización, dicho al menos un segmento comprende una secuencia de ácido nucleico de un marcador de resistencia a antibióticos seleccionado de entre el grupo constituido por mutaciones en ahpC-oxyR en los codones -10, -6, -39, -48, -15, 12 y -9, rrs 1401 G, gyrA 94G, gyrA 90T, gyrA 90V, gyrA S91 P, gyrA D94A, gyrA D94G, gyrA 94N, gyrA 94H, emb 306v ATG, emb306i ATG, eis -10G/A, eis -12C/T, eis -15 C/G, y rrs 1401 A/G.

25 30 35 40 45 En una realización, dicho al menos un segmento comprende una secuencia de ácido nucleico de un marcador de resistencia a antibióticos seleccionado de entre el grupo constituido por rpoB 513 CCA, rpoB 515 ATC, rpoB 516 TAC, rpoB 516 GTC, rpoB 522 TGG, rpoB 526 CGC, rpoB 526, rpoB 526 GAC, rpoB 526 CTC, rpoB 526 ACC, rpoB 531 TTG, rpoB 531 TGG y rpoB 533 CCG. En aras de la claridad, en lo sucesivo, se hará referencia a este grupo como marcador de resistencia a antibióticos del grupo X. En una realización, dicho al menos un segmento comprende una secuencia de ácido nucleico de un marcador de resistencia a antibióticos seleccionado de entre el grupo constituido por katG 315 ACC, katG 202 GCA, katG 203 ACT, inserción katG 518 GGTC, katG 315 AAC, katG127 CCG, katG 506 TAG, katG 315 ACA, katG 315 ACG, katG 315 ACT, katG 315 ATC, katG 315 AGA, katG 315 GGC, katG 315 CGC, inhA -15 T, inhA -8, inhA -17G y inhA -17T. En aras de la claridad, en lo sucesivo, se hará referencia a este grupo como marcador de resistencia a antibióticos del grupo Y. En una realización, dicho al menos un segmento comprende una secuencia de ácido nucleico de un marcador de resistencia a antibióticos seleccionado de entre el grupo constituido por rpoB 516 TAC, rpoB 516 GTC, rpoB 526 CGC, rpoB 526, rpoB 526 GAC, rpoB 526 CTC, rpoB 526 ACC, rpoB 531 TTG, rpoB 531 TGG, rpoB 533 CCG, inhA -15 T, inhA -8, inhA -17G, inhA -17T, katG 315 ACC, katG 315 AAC, katG 315 ACA, katG 315 ACG, katG 315 ACT, katG 315 ATC, katG 315 AGA, katG 315 GGC, katG 315 CGC, inhA -15 T, inhA -8, inhA -17G y inhA -17T. En aras de la claridad, en lo sucesivo, se hará referencia a este grupo como marcador de resistencia a antibióticos del grupo Z. En una realización, dicho al menos un segmento comprende una secuencia de ácido nucleico de un marcador de resistencia a antibióticos seleccionado de entre el grupo constituido por mutaciones en ahpC-oxyR en los codones -10, -6, -39, -48, -15, 12 y -9, rrs 1401 G, gyrA 94G, gyrA 90T, gyrA 90V, gyrA S91 P, gyrA D94A, gyrA D94G, gyrA 94N, gyrA 94H, emb 306v ATG, emb306i ATG, eis -10G/A, eis -12C/T, eis -15 C/G, y rrs 1401 A/G. En

50 55 60 65 En una realización, dicho al menos un segmento comprende una secuencia de ácido nucleico de un marcador de resistencia a antibióticos seleccionado de entre el grupo constituido por katG 315 ACC, katG 202 GCA, katG 203 ACT, inserción katG 518 GGTC, katG 315 AAC, katG127 CCG, katG 506 TAG, katG 315 ACA, katG 315 ACG, katG 315 ACT, katG 315 ATC, katG 315 AGA, katG 315 GGC, katG 315 CGC, inhA -15 T, inhA -8, inhA -17G y inhA -17T. En aras de la claridad, en lo sucesivo, se hará referencia a este grupo como marcador de resistencia a antibióticos del grupo Y. En una realización, dicho al menos un segmento comprende una secuencia de ácido nucleico de un marcador de resistencia a antibióticos seleccionado de entre el grupo constituido por rpoB 516 TAC, rpoB 516 GTC, rpoB 526 CGC, rpoB 526, rpoB 526 GAC, rpoB 526 CTC, rpoB 526 ACC, rpoB 531 TTG, rpoB 531 TGG, rpoB 533 CCG, inhA -15 T, inhA -8, inhA -17G, inhA -17T, katG 315 ACC, katG 315 AAC, katG 315 ACA, katG 315 ACG, katG 315 ACT, katG 315 ATC, katG 315 AGA, katG 315 GGC y katG 315 CGC. En aras de la claridad, en lo sucesivo, se hará referencia a este grupo como marcador de resistencia a antibióticos del grupo Z. En una realización, dicho al menos un segmento comprende una secuencia de ácido nucleico de un marcador de resistencia a antibióticos seleccionado de entre el grupo constituido por mutaciones en ahpC-oxyR en los codones -10, -6, -39, -48, -15, 12 y -9, rrs 1401 G, gyrA 94G, gyrA 90T, gyrA 90V, gyrA S91 P, gyrA D94A, gyrA D94G, gyrA 94N, gyrA 94H, emb 306v ATG, emb306i ATG, eis -10G/A, eis -12C/T, eis -15 C/G, y rrs 1401 A/G. En

aras de la claridad, en lo sucesivo, se hará referencia a este grupo como marcador de resistencia a antibióticos del grupo P.

En una realización, dicho al menos un segmento comprende una secuencia de ácido nucleico de un marcador de resistencia a antibióticos seleccionado de entre el grupo constituido por rpoB 531 TTG y katG 315 ACC. En una realización particular, dicho al menos un segmento comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre N.º ID SEC:2 y N.º ID SEC:4.

Los expertos en la técnica apreciarán que una sección de análisis según se divulga en el presente documento puede comprender varios segmentos, en donde cada segmento comprende una secuencia de ácido nucleico de un marcador de resistencia a antibióticos que es diferente de la secuencia de ácido nucleico de los otros segmentos. Por tanto, la sección de análisis puede comprender segmentos que comprenden cada uno una secuencia de ácido nucleico de un marcador de resistencia a antibióticos diferente. Los expertos en la técnica apreciarán que los marcadores listados anteriormente se pueden combinar libremente en una o más secciones de análisis. Por ejemplo, cualquier sección de análisis puede comprender un segmento que comprenda cualquiera de los marcadores de resistencia a antibióticos listados del grupo X anterior y un segmento que comprenda cualquiera de los marcadores de resistencia a antibióticos listados del grupo Y anterior. Una sección de análisis puede comprender un segmento que comprenda un marcador del grupo X, un segmento que comprenda un marcador del grupo Y, un segmento que comprenda un marcador del grupo Z y un segmento que comprenda un marcador del grupo P. Es también posible que una sección de análisis comprenda un segmento que comprenda uno o más marcadores de un grupo y uno o más segmentos que comprendan diferentes marcadores del mismo grupo. Los expertos en la técnica apreciarán que las combinaciones listadas en el presente documento no son excluyentes.

De esta forma, en una realización, dicha sección de análisis según se divulga en el presente documento comprende al menos dos segmentos, como al menos tres segmentos, como al menos seis segmentos, como al menos nueve segmentos, como al menos doce segmentos, como al menos catorce segmentos, que comprenden secuencia de ácido nucleico de diferentes marcadores de resistencia a antibióticos, como diferentes marcadores de resistencia a antibióticos seleccionados de entre diferentes o los mismos grupos listados anteriormente.

Por ejemplo, una sección de análisis puede comprender segmentos que comprenden una secuencia de ácido nucleico de marcadores de resistencia a antibióticos rpoB 176 TGC, rpoB 432 GGC, rpoB 438 CAA, rpoB 447 ACC, rpoB 516 TAC, rpoB 526 CGC, rpoB 531 TTG, katG 315 ACA, inha-15T, rrs 1401 G, gyrA 94G, emb 306v ATG y ies -10G/A, o un subconjunto de los mismos. Por ejemplo, una sección de análisis puede comprender segmentos que comprenden una secuencia de ácido nucleico de marcadores de resistencia a antibióticos rpoB 432 ACC, rpoB 438 ATG, rpoB 447 GGG, rpoB 516 GTC, rpoB526 GAC, rpoB 531 TGG, katG 315 ACT, inhA -8, gyrA 90T, emb 306i ATG y ies -12C/T, o un subconjunto de los mismos. Por ejemplo, una sección de análisis puede comprender segmentos que comprenden una secuencia de ácido nucleico de marcadores de resistencia a antibióticos rpoB 432 CAG, rpoB 438 TTC, rpoB 447 TCG., rpoB 526 CTC, katG 315 GGC, inhA -17G y ies-15 C/G, o un subconjunto de los mismos. Por ejemplo, una sección de análisis puede comprender segmentos que comprenden una secuencia de ácido nucleico de marcadores de resistencia a antibióticos rrs 483 T, rrs 485 G, rrs 496A, rrs 491 T, rrs 512T, rrs 798T, rrs 877A, rrs 904G, rrs 906 C, rrs 904 T, rrs 1401 G, rpsL 43 AGG, rpsL 88 CAG, rpsL 128 G, rpsL 263 G y rpsL 262 C o un subconjunto de los mismos. Por ejemplo, una sección de análisis puede comprender segmentos que comprenden una secuencia de ácido nucleico de marcadores de resistencia a antibióticos rpoB 432 CTG, rpoB 447 TTG, rpoB 526 ACC y katG 315 CGC o un subconjunto de los mismos.

En una realización del dispositivo según se divulga en el presente documento, dicho al menos un segmento que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico parcial de un gen de tipo salvaje comprende una secuencia seleccionada de entre katG, rpoB, gyrA, rrs, eis, emb, ahpC, oxyR, en los codones de rpoB 516 wt, katG 315 wt, rpoB 331 wt, rpoB 531 wt, rpoB 526 wt, inhA - 15 wt, rrs 1401 wt, gyrA 94 wt, gyrA 90 wt, rpoB 533 wt, emb 306wt, eis - 10wt, eis -12wt, y eis -15 wt, entre otros. En este contexto, un ejemplo de par de variante tipo salvaje-mutante es rpoB 516 TAC y rpoB 516 wt. En una realización, dicho al menos un segmento que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico parcial de un gen de tipo salvaje comprende una secuencia seleccionada entre rpoB 531 wt y katG 315 wt. En una realización particular, dicho al menos un segmento comprende una secuencia seleccionada entre N.º ID SEC:1 y N.º ID SEC:3.

Se apreciará que el dispositivo según se divulga en el presente documento permite el análisis de la presencia o de la ausencia de secuencias de tipo salvaje correspondientes en la muestra. En aras de la brevedad, no todas estas combinaciones de secuencias de tipo salvaje correspondiente están enumeradas en el documento. En una realización, todas las secuencias de tipo salvaje pertinentes se analizan en una sección de análisis que comprende varios segmentos, en donde cada segmento comprende una secuencia de ácido nucleico de tipo salvaje diferente. Por tanto, en una realización, una sección de análisis puede comprender segmentos que comprenden una secuencia de ácido nucleico de rpoB 176 wt, rpoB 432 wt, rpoB 438 wt, rpoB 447 wt, rpoB 516 wt, rpoB 526 wt, rpoB 531 wt, katG 315 wt, inhA -8, inhA -15, inhA -17 wt, 16s ARNr wt, gyrA 90, gyrA 91, gyrA 92, gyrA 93, gyrA 94, wt, emb 306 wt y ies -10, ies -12, eis -15 wt. rrs 483 wt, rrs 485 wt, rrs 496A wt, rrs 491 wt, rrs 512 wt, rrs 798 wt, rrs 877 wt, rrs 904 wt, rrs 906 wt, rrs 904 wt, rrs 1401 wt, rpsL 43 wt, rpsL 88 wt, rpsL 128 wt, rpsL 263 wt y rpsL 262 wt y ies -10, ies -12, eis -15 wt; en una realización, una sección de análisis puede comprender segmentos que comprenden una secuencia de ácido

nucleico de rpoB 432 wt, rpoB 438 wt, rpoB 447 wt, rpoB 516 wt, rpoB 526 wt, rpoB 531 wt, katG 315 wt, inhA -8, inhA -15, inhA -17 wt, , gyrA 90, gyrA 91 T, gyrA 92T, gyrA 93G, gyrA 94, wt, emb 306 wt y ies -10, ies -12, eis -15 wt; o rpoB 432 wt, rpoB 438 wt, rpoB 447 wt, rpoB 526 wt, katG 315 wt, inhA -8wt, inhA -15wt, inhA -17 wt, , rrs 483 wt, rrs 485 wt, rrs 496A wt, rrs 491 wt, rrs 512 wt, rrs 798 wt, rrs 877 wt, rrs 904 wt, rrs 906 wt, rrs 904 wt, rrs 1401 wt, rpsL 43 wt, rpsL 88 wt, rpsL 128 wt, rpsL 263 wt y rpsL 262 wt y ies -10, ies -12, eis -15 wt; o rpoB 432 wt, rpoB 447 wt, rpoB 526 wt y katG 315 wt.

También se contempla que la sección de análisis puede comprender segmentos que comprenden una secuencia de ácido nucleico de marcadores de resistencia a antibióticos y una correspondiente secuencia de ácido nucleico de un gen de tipo salvaje. Por ejemplo, la sección de análisis puede comprender segmentos que comprenden una secuencia de ácido nucleico de rpoB 176 wt y rpoB 176 TGC; rpoB 432 wt, rpoB 432 GGC, rpoB 432 ACC, rpoB 432 CAG y rpoB 432 CTG; rpoB 438 wt, rpoB 438 CAA, rpoB 438 ATG y rpoB 438 TTC; rpoB 447 wt, rpoB 447 ACC, rpoB 447 GGG, rpoB 447 TCG y rpoB 447 TTG; rpoB 516 wt, rpoB 516 TAC y rpoB 516 GTC; rpoB 526 wt, rpoB 526 CGC, rpoB 526 GAC, rpoB 526 CTC y rpoB 526 ACC; rpoB 531 wt, rpoB 531 TTG y rpoB 531 TGG; katG 315 wt, katG 315 ACA, katG 315 ACT, katG 315 GGC y katG 315 CGC; inhA -8wt, inhA -15wt, inhA -17 wt, inhA -8 y inhA -17G; 16s rRNAwt y rrs 1401 G; gyrA 90-94 wt gyrA 94G y gyrA 90T; emb 306 wt, emb 306v ATG, emb 306i ATG; o ies -8 wt, ies-12 wt, ies -15 wt, ies -10G/A, ies -12C/T y ies-15 C/G.

Tabla 1

| WT para sección de análisis 1                | Conjunto de marcadores para la sección de análisis 2 | Conjunto de marcadores para la sección de análisis 3 | Conjunto de marcadores para la sección de análisis 4 | Conjunto de marcadores para la sección de análisis 5 |
|--|--|--|--|--|
| rpoB 176                                     | rpoB 176 TGC   |  |  |  |
| rpoB 432                                     | rpoB 432 GGC   | rpoB 432 ACC   | rpoB 432 CAG   | rpoB 432 CTG   |
| rpoB 438                                     | rpoB 438 CAA   | rpoB 438 ATG   | rpoB 438 TTC   |  |
| rpoB 447                                     | rpoB 447 ACC   | rpoB 447 GGG   | rpoB 447 TCG   | rpoB 447 TTG   |
| rpoB 516                                     | rpoB 516 TAC   | rpoB 516 GTC   |  |  |
| rpoB 526                                     | rpoB 526 CGC   | rpoB 526 GAC   | rpoB 526 CTC   | rpoB 526 ACC   |
| rpoB 531                                     | rpoB 531 TTG   | rpoB 531 TGG   |  |  |
| katG 315                                     | katG 315 ACA   | katG 315 ACT   | katG 315 GGC   | katG 315 CGC   |
| inhA -8, inh - 15, inhA -17                  | inha -15T  | inha -8  | inha -17G  |  |
| 16s rRNA                                     | rrs 1401 G   |  |  |  |
| gyrA 90, gyrA 91 , gyrA 92, gyrA 93, gyrA 94 | gyrA 94G   | gyrA 90T   | gyrA 91T   | gyrA93G  |
| emb 306                                      | emb 306v ATG   | emb 306i ATG   |  |  |
| ies -10, ies - 12, ies - 15                  | ies -10G/A   | ies -12C/T   | ies-15C/G  |  |

Se apreciará que, en realizaciones del presente dispositivo, en donde están presentes más de dos tiras de análisis, dichos marcadores pueden dividirse entre dichas más de dos tiras.

Como ejemplo, se prevé que el dispositivo según se describe en el presente documento comprenda una sección de análisis para el análisis del tipo salvaje tal y como se ilustra en la columna 1 de la Tabla 1 y al menos una sección de análisis seleccionada de entre las secciones ilustradas en las columnas 2-5 de la Tabla 1, como las columnas 1 y 2, las columnas 1 y 3, las columnas 1 y 4 y las columnas 1 y 5. También se prevén combinaciones de una sección de análisis de acuerdo con la columna 1 con las columnas 2 y 3; 2 y 4; 2 y 5, 3 y 4; 3 y 5; 4 y 5; 2, 3 y 4; 3, 4 y 5; 2, 4 y 5; 2, 3 y 5; o 2, 3, 4 y 5.

Se contempla además que una sección de análisis de muestra pueda comprender al menos un segmento que permita la detección de la especie bacteriana, como una de las especies incluidas en el complejo *Mycobacterium tuberculosis*. De manera adicional, los expertos en la técnica apreciarán que cada sección de análisis de muestra puede comprender un segmento que actúa como control para cualquiera de los tipos salvajes y su mutación causante de la resistencia en las especies *Mycobacterium*. En una realización particular, se proporciona un dispositivo que comprende una sección de análisis de muestra que comprende un segmento de control. En una realización, dicho segmento de control comprende al menos una secuencia parcial de un gen constitutivo de la especie bacteriana, tal como un gen constitutivo de la especie *Mycobacterium tuberculosis* y sus marcadores de resistencia. En una realización particular, dicha secuencia es N.º ID SEC:5.

En una realización del dispositivo, la almohadilla de muestra y las tiras alargadas de análisis de muestra están formadas de material de fibra absorbente a través de la cual la muestra puede fluir por fuerza gravitacional o por movimiento capilar. Como alternativas de materiales se cuentan los materiales de celulosa transparente o los materiales poliméricos.

- Este dispositivo está destinado a disponerse, por ejemplo, sobre una mesa o escritorio de manera que la almohadilla de muestra y las tiras alargadas de análisis de muestra queden dispuestas en una posición sustancialmente horizontal para facilitar el flujo de la muestra dentro de las tiras alargadas de análisis de muestra. Además, el material absorbente utilizado en la almohadilla de muestra y las tiras de análisis garantizan que la muestra sea transferida a la sección de análisis de muestra.
- Una realización preferida del dispositivo comprende una película de respaldo elaborada de plástico o sustancia inerte u opaca, dispuesta de manera opuesta al pasaje de entrada y a las aberturas de la carcasa. La película de respaldo previene que la muestra líquida se escape de la almohadilla de muestra o del material de la tira de análisis de muestra antes de llegar a la sección de análisis de muestra, mejorando de esta forma la precisión del resultado del análisis.
- En una realización del dispositivo, las tiras alargadas de análisis de muestra se extienden primero en una dirección sustancialmente radial desde el centro de la almohadilla de muestra antes de inclinarse de manera que las secciones de análisis quedan dispuestas paralelas entre sí y el resultado es detectable a partir de la combinación de segmentos dispuestos transversalmente a las tiras alargadas de análisis de muestra. Esta realización es favorable, puesto que la muestra puede fluir fácilmente desde la almohadilla de muestra hasta las tiras alargadas de muestra, lo cual garantiza que se transfiera una cantidad de muestra suficiente a cada tira alargada de análisis de muestra.
- En una realización del dispositivo, los segmentos correspondientes de la primera y la segunda secciones de análisis están dispuestos transversalmente a las secciones de análisis. Esta realización del dispositivo hace que sea fácil leer el resultado del análisis correcto de una manera fiable y sencilla, por ejemplo, genotipos de tipo salvaje y mutantes. En una realización particular del dispositivo, un agente de detección está presente en las secciones de análisis de muestra. En una realización, el agente de detección está presente tan solo en los segmentos de las secciones de análisis.
- Una realización del dispositivo comprende una tercera tira alargada de análisis de muestras configurada para analizar diferentes aspectos de la muestra de ácido nucleico, en donde la sección de análisis de dicha tercera tira de muestras está configurada para analizar la presencia o la ausencia de ácidos nucleicos con diferentes secuencias predeterminadas y tiene sustancialmente la misma longitud que, y está dispuesta entre, dichas primera y segunda tiras alargadas de análisis de muestra de manera que el resultado del análisis es detectable por la combinación de los segmentos correspondientes de las tres tiras de análisis. La tercera tira alargada de análisis de muestra aumenta en mayor medida la precisión diagnóstica del análisis, dado que es posible detectar más variaciones fenotípicas.
- En una realización del dispositivo, se forma un ángulo  $\alpha$  de entre  $40^\circ$  y  $80^\circ$  entre la primera y la segunda tiras alargadas de muestra y se forma una muesca, que se extiende desde la periferia hacia el centro de la almohadilla de muestra, en la almohadilla de muestra entre la primera y la segunda tiras alargadas de muestra de manera que la muestra sea dirigida hacia la primera y la segunda tiras alargadas de muestra. Este diseño del dispositivo garantiza que la muestra fluya con facilidad hacia las tiras alargadas de análisis de muestra.
- En una realización del dispositivo, la tercera tira alargada de muestra se extiende en una dirección sustancialmente radial desde la almohadilla de muestra, desde la punta de la muesca.
- Una realización del dispositivo comprende una cuarta y una quinta tiras alargadas de análisis de muestra configuradas para analizar diferentes aspectos de la muestra de ácido nucleico, en donde las secciones de análisis de las cuarta y quinta tiras de muestra están configuradas para analizar la presencia o la ausencia de ácidos nucleicos con diferentes secuencias predeterminadas y tienen la misma longitud y están dispuestas en lados opuestos a las primera y segunda tiras de análisis de muestra de manera que el resultado del análisis es detectable por la combinación de los segmentos correspondientes de las cuatro o las cinco tiras de análisis. La cuarta y la quinta tiras alargadas de análisis de muestra aumentan la precisión y proporcionan detalles del análisis, puesto que hacen posible detectar parámetros como el género, la especie, los genes constitutivos, los marcadores de genes de resistencia y el tipo salvaje.
- En una realización del dispositivo, la cuarta y la quinta tiras alargadas de muestra se extienden en una dirección sustancialmente radial desde el centro de la almohadilla de muestra antes de inclinarse de manera que las secciones de análisis quedan dispuestas paralelas entre sí y las primera y segunda secciones de análisis quedan alineadas con las secciones de análisis de las primera y segunda tiras alargadas de muestra.
- Una realización del dispositivo comprende una estructura de soporte formada dentro de la carcasa para soportar la almohadilla de muestra y las tiras alargadas de muestra en su posición correcta dentro de la carcasa, lo cual es sumamente importante para garantizar que el resultado del análisis se visualice correctamente.
- En otro aspecto de la presente divulgación se proporciona un método de diagnóstico para determinar la presencia o la ausencia de un ácido nucleico diana con una secuencia predeterminada en una muestra de un sujeto, comprendiendo el método los pasos de:
- a) proporcionar una muestra biológica que se ha obtenido previamente de un sujeto de manera no invasiva,

- 5 b) someter a la muestra a la amplificación selectiva de al menos un ácido nucleico diana con una secuencia predeterminada para obtener ácido nucleico diana amplificado,

10 c) aplicar el ácido nucleico diana amplificado a la almohadilla de muestra del dispositivo (10; 30; 50) según se describe en el presente documento,

15 d) incubar dicho dispositivo durante un período de tiempo suficiente como para permitir la detección de dicho ácido nucleico diana por medio de un agente de detección, y

20 e) detectar la presencia o la ausencia del al menos un ácido nucleico diana con una secuencia predeterminada.

25 En una realización del método según se describe en el presente documento, el mencionado ácido nucleico diana amplificado obtenido en el paso b) es directamente o indirectamente acoplado a un agente de detección antes de aplicar el ácido nucleico diana amplificado a la almohadilla de muestra del dispositivo.

30 En otra realización, el ácido nucleico diana amplificado obtenido en el paso b) y el agente de detección se añaden por separado a la almohadilla de muestra del dispositivo, de manera que el acople directo o indirecto se produce in situ.

35 En una realización, dicho ácido nucleico diana amplificado se añade antes de la adición del agente de detección. En otra realización, dicho agente de detección se añade antes de la adición del ácido nucleico diana amplificado.

40 En otra realización más, el agente de detección está presente en la almohadilla de muestra y/o las secciones de análisis. En una realización, dicho agente de detección está presente tan solo en los segmentos de las secciones de análisis. Por tanto, en esta realización, el ácido nucleico diana amplificado obtenido en el paso b) no es acoplado a un agente de detección antes de ser añadido a la almohadilla de muestra del dispositivo según se describe en el presente documento.

45 En una realización, dicha muestra biológica se obtiene del mencionado sujeto de manera no invasiva, como de manera no quirúrgica, no conllevando dicha manera ningún riesgo para dicho paciente y no necesitando ser llevada a cabo por un profesional médico. En una realización del método según se describe en el presente documento, la muestra biológica es un cultivo bacteriano primario de dicho sujeto.

50 En una realización, dicha muestra es una muestra seleccionada de fluidos biológicos como orina, sangre, esputo y tejidos, por ejemplo, orina, sangre y esputo, o, por ejemplo, orina y esputo.

55 En una realización del método según se describe en el presente documento, la incubación en el paso e) se produce durante un período de tiempo suficiente como para permitir la detección, siendo dicho período inferior a 180 minutos, por ejemplo, inferior a 120 minutos, inferior a 90 minutos o inferior a 80 minutos. Se apreciará que la rápida provisión de los resultados del análisis es beneficiosa.

60 En una realización del método descrito, el paso c) se lleva a cabo de manera simultánea junto al paso b). En otra realización, el paso c) se lleva a cabo después del paso b).

65 En una realización de este método, la amplificación selectiva del paso b) es una amplificación selectiva multiplex. Una amplificación selectiva multiplex se refiere a la amplificación selectiva simultánea de múltiples secuencias de ácido nucleico predeterminadas diferentes en un vial de reacción. Generalmente, las moléculas diana pueden amplificarse mediante un método de amplificación de ácido nucleico, como la amplificación isotérmica, sin embargo, continúa siendo un desafío identificar correctamente mutaciones puntuales en el ADN diana, por ejemplo, en el caso de infecciones bacterianas resistentes a fármacos. Por tanto, la provisión de un método que permita la amplificación fiable, específica y selectiva del ADN diana es de crucial importancia, método que permita la detección precisa de variantes de un solo nucleótido.

70 Por tanto, en una realización del segundo aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método, en donde la amplificación selectiva del paso b) se selecciona de entre el grupo constituido por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), pruebas del ADN ramificado (quantiplex bDNA), reacción en cadena de la ligasa, amplificación mediada por transcripción (TMA), amplificación basada en secuencia de ácidos nucleicos (NASBA), amplificación de círculo rodante (RCA) en combinación con reconocimiento de diana mediante sondas de candado (PLPs).

75 Como ejemplo, las PLP son sondas oligonucleótidas lineales que contienen secuencias de detección, restricción, etiqueta específica y enlazador, donde los brazos 5' y 3' (extremos) están diseñados para hibridarse con la secuencia diana. A medida que los extremos de la sonda se hibridan en yuxtaposición en el sitio específico de la diana, se requiere una coincidencia perfecta en el extremo 3' para la ligación, discriminando con eficacia las mutaciones puntuales. El segmento enlazador del centro contiene secuencias con funciones para la amplificación, la identificación y la detección, incluso de una manera altamente multiplexada. El candado circularizado mediado por ligación puede

ser sometido a una RCA para producir un concatémero monocatenario, que contiene múltiples repeticiones complementarias de la secuencia PLP. Para mejorar la sensibilidad, el concatémero puede ser digerido por restricción, religado en nuevos círculos y sometido a una ronda adicional de RCA conocida como amplificación de círculo a círculo (C2CA). Los amplicones (monómeros) digeridos por restricción se hibridan en forma de sándwich con sus etiquetas comunes de oligonucleótidos AuNP y con las etiquetas correspondientes de oligonucleótidos de tipo salvaje y mutantes inmovilizadas en las tiras de flujo lateral para producir señales visuales. Por tanto, en una realización del mencionado método, la amplificación selectiva del paso b) es una amplificación de círculo rodante en combinación con el reconocimiento de diana mediante sondas de candado opcionalmente comprendiendo un paso de amplificación de círculo a círculo.

10 En una realización, dichas sondas de candado tienen una longitud de 70-120 nucleótidos, por ejemplo, una longitud de 70-100 nucleótidos.

15 En una realización del presente método, el paso de aplicación emplea al menos una sonda de candado que es específica para un marcador de resistencia a antibióticos seleccionado de entre el grupo constituido por rpoB 176 TGC, rpoB 432 GGC, rpoB 432 ACC, rpoB 432 AGC, rpoB 432 CAG, rpoB 432 CTG, rpoB 432 AGC, rpoB 432 CAG, rpoB 436 CTG, rpoB 437 AGC, rpoB 438 CAA, rpoB 438 TTC, rpoB 438 ATG, rpoB 441 GAC, rpoB 441 AAC, rpoB 441 CAG, rpoB 444 AAC, rpoB 444 CCG, rpoB 444 CTG, rpoB 447 TCG, rpoB 447 GGG, rpoB 447 TTG, rpoB 447 ACC, rpoB 451 CAC, rpoB 451 AAG, rpoB 451 CGC, rpoB 451 CGA, rpoB 451 CTG, rpoB 456 TCG, rpoB 456 GCG, rpoB 458 CTG, rpoB 486 CTG, rpoB 486 ATC, rpoB 496 CTG, rpoB 497 ATC, rpoB 513 CCA, rpoB 515 ATC, rpoB 516 TAC, rpoB 516 GTC, rpoB 522 TGG, rpoB 526 CGC, rpoB 526, rpoB 526 GAC, rpoB 526 CTC, rpoB 526 ACC, rpoB 531 TTG, rpoB 531 TGG, rpoB 533 CCG, rpoB 558 CGC, rpoB 598 GAG, katG 269 CGT, katG 463 CTG, katG 379 ACC, katG 98 TGC, katG 352 GAA, katG 463 CTG, katG 315 ACC, katG 202 GCA, katG 203 ACT, inserción katG 518 GGTC, katG 315 AAC, katG127 CCG, katG 506 TAG, katG 315 ACA, katG 315 ACG, katG 315 ACT, katG 315 ATC, katG 315 AGA, katG 315 GGC, katG 315 CGC, inhA -15 T, inhA -8, inhA -17G, inhA -17T, inhA -34G, inhA -34T, mutaciones de inhA -47 T, mutaciones en ahpC-oxyR en los codones -10, -6, -39, -48, -15, 12 y -9, rrs 483 T, rrs 485 G, rrs 496A, rrs 491 T, rrs 512T, rrs 798T, rrs 877A, rrs 904G, rrs 906 C, rrs 904 T, rrs 1401 G, rpsL 43 AGG, rpsL 88 CAG, rpsL 128 G, rpsL 263 G y rpsL 262 C, rrs 1401 G, gyrA 94G, gyrA 90T, gyrA 90V, gyrA S91 P, gyrA D94A, gyrA D94G, gyrA 94N, gyrA 94H, emb 306v ATG, emb306i ATG, eis -10G/A, eis -12C/T, eis -15 C/G, y rrs 1401 A/G y al menos una sonda de candado, siendo esta sonda de candado específica para la secuencia de tipo salvaje correspondiente.

30 Los ejemplos no excluyentes de secuencias correspondientes de tipo salvaje incluyen katG, rpoB, gyrA, rrs, eis, emb, ahpC, oxyR, en los codones de rpoB 516 wt, katG 315 wt, rpoB 331 wt, rpoB 531 wt, rpoB 526 wt, inhA - 15 wt, rrs 1401 wt, gyrA 94 wt, gyrA 90 wt, rpoB 533 wt, emb 306wt, eis -8 wt, eis -10wt, eis -12wt, eis -15 wt, rrs 483 wt, rrs 485 wt, rrs 496A wt, rrs 491 wt, rrs 512 wt, rrs 798 wt, rrs 877 wt, rrs 904 wt, rrs 906 wt, rrs 904 wt, rrs 1401 wt, rpsL 43 wt, rpsL 88 wt, rpsL 128 wt, rpsL 263 wt y rpsL 262 wt. En este contexto, un ejemplo de par de variante tipo salvaje-mutante es rpoB 516 TAC y rpoB 516 wt.

40 En una realización del presente método, el paso de aplicación emplea al menos sondas de candado que son específicas para los marcadores de resistencia a antibióticos rpoB 513 CCA, rpoB 515 ATC, rpoB 516 TAC, rpoB 516 GTC, rpoB 522 TGG, rpoB 526 CGC, rpoB 526, rpoB 526 GAC, rpoB 526 CTC, rpoB 526 ACC, rpoB 531 TTG, rpoB 531 TGG y rpoB 533 CCG, y sondas de candado que son específicas para las secuencias de tipo salvaje correspondientes. En una realización del presente método, el paso de aplicación emplea al menos sondas de candado que son específicas para los marcadores de resistencia de antibióticos katG 315 ACC, katG 202 GCA, katG 203 ACT, inserción katG 518 GGTC, katG 315 AAC, katG127 CCG, katG 506 TAG, katG 315 ACA, katG 315 ACG, katG 315 ACT, katG 315 ATC, katG 315 AGA, katG 315 GGC, katG 315 CGC, inhA -15 T, inhA -8, inhA -17G y inhA -17T, y sondas de candado que son específicas para la secuencia de tipo salvaje correspondiente. En una realización del presente método, el paso de aplicación emplea al menos sondas de candado que son específicas para los marcadores de resistencia a antibióticos rpoB 516 TAC, rpoB 516 GTC, rpoB 526 CGC, rpoB 526, rpoB 526 GAC, rpoB 526 CTC, rpoB 526 ACC, rpoB 531 TTG, rpoB 531 TGG, rpoB 533 CCG, inhA -15 T, inhA -8, inhA -17G, inhA -17T, katG 315 ACC, katG 315 AAC, katG 315 ACA, katG 315 ACG, katG 315 ACT, katG 315 ATC, katG 315 AGA, katG 315 GGC y katG 315 CGC, y sondas de candado que son específicas para la secuencia de tipo salvaje correspondiente.

55 En una realización del presente método, el paso de aplicación emplea al menos sondas de candado que son específicas para los marcadores de resistencia a antibióticos mutaciones en ahpC-oxyR en los codones -10, -6, -39, -48, -15, 12 y -9, rrs 1401 G, gyrA 94G, gyrA 90T, gyrA 90V, gyrA S91 P, gyrA D94A, gyrA 94G, gyrA 94N, gyrA 94H, emb 306v ATG, emb306i ATG, eis -10G/A, eis -12C/T, eis -15 C/G, y rrs 1401 A/G, y sondas de candado que son específicas para la secuencia de tipo salvaje correspondiente. En una realización del presente método, el paso de aplicación emplea al menos sondas de candado que son específicas para los marcadores de resistencia a antibióticos rpoB 176 TGC, rpoB 432 GGC, rpoB 438 CAA, rpoB 447 ACC, rpoB 516 TAC, rpoB 526 CGC, rpoB 531 TTG, katG 315 ACA, inha-15T, rrs 1401 G, gyrA 94G, emb 306v ATG y eis -10G/A y sondas de candado que son específicas para la secuencia de tipo salvaje correspondiente. En una realización del presente método, el paso de aplicación emplea al menos sondas de candado que son específicas para los marcadores de resistencia a antibióticos rpoB 432 ACC, rpoB 438 ATG, rpoB 447 GGG, rpoB 516 GTC, rpoB526 GAC, rpoB 531 TGG, katG 315 ACT, inhA -8, gyrA 90T, emb 306i ATG y eis -12C/T y sondas de candado que son específicas para la secuencia de tipo salvaje

correspondiente. En una realización del presente método, el paso de aplicación emplea al menos sondas de candado que son específicas para los marcadores de resistencia a antibióticos rpoB 432 CAG, rpoB 438 TTC, rpoB 447 TCG, rpoB 526 CTC, katG 315 GGC, inhA -17G y ies-15 C/G y sondas de candado que son específicas para la secuencia de tipo salvaje correspondiente. En otra realización más del presente método, el paso de aplicación emplea al menos 5 sondas de candado que son específicas para los marcadores de resistencia a antibióticos rpoB 432 CTG, rpoB 447 TTG, rpoB 526 ACC y katG 315 CGC y sondas de candado que son específicas para la secuencia de tipo salvaje correspondiente. En otra realización del presente método, el uso de marcadores de resistencia rrs 483 wt, rrs 485 wt, rrs 496A wt, rrs 491 wt, rrs 512 wt, rrs 798 wt, rrs 877 wt, rrs 904 wt, rrs 906 wt, rrs 904 wt, rrs 1401 wt, rpsL 43 wt, rpsL 88 wt, rpsL 128 wt, rpsL 263 wt y rpsL 262 wt y ies -10, ies -15 wt y los codones mutantes de 10

10 Los expertos en la técnica apreciarán que la combinación de sondas de candado empleada dependerá de la identidad de los marcadores de resistencia a antibióticos cuya ausencia o presencia se ha de detectar y que cualquier combinación de los marcadores enumerados en relación con el primer aspecto de la presente invención es igualmente relevante para este segundo aspecto. En aras de la brevedad, los listados no se repetirán aquí.

15 En un ejemplo, las sondas de candado utilizadas en el paso b) de amplificación selectiva pueden ser específicas para los marcadores de resistencia a antibióticos rpoB 516 TAC, rpoB 516 GTC y para la secuencia de tipo salvaje rpoB 516 wt correspondiente, respectivamente. En otro ejemplo, las sondas de candado utilizadas en el paso b) de amplificación selectiva pueden ser específicas para los marcadores de resistencia a antibióticos rpoB 531 TGG y rpoB 20 531 wt, respectivamente. En una realización, dichas sondas de candado comprenden las secuencias N.º ID SEC: 10 y N.º ID SEC:9, respectivamente. En otro ejemplo más, las sondas de candado utilizadas en el paso b) de amplificación selectiva pueden ser específicas para los marcadores de resistencia a antibióticos katG 315 ACC y katG315 wt, respectivamente. En una realización, dichas sondas de candado comprenden las secuencias N.º ID SEC:8 y N.º ID SEC:7, respectivamente. Los expertos en la técnica apreciarán que se pueden combinar varias sondas de candado 25 diferentes en una amplificación selectiva, por ejemplo, una reacción de amplificación selectiva puede llevarse a cabo utilizando varias sondas de candado, cada una siendo específica para uno de entre rpoB 531 TGG, rpoB 531 wt, katG 315 ACC y katG315 wt. En una realización particular del método según se divulga en el presente documento, las sondas de candado son al menos una de N.º ID SEC:7-10, como al menos dos de N.º ID SEC:7-10, como al menos tres de N.º ID SEC:7-10, como al menos las cuatro N.º ID SEC:7-10. En una realización, dichas sondas de candado 30 son N.º ID SEC:7 y 8. En otra realización, dichas sondas de candado son N.º ID SEC:9 y 10.

35 El requisito de instrumentos sofisticados, como fluorímetros, microscopios de fluorescencia, escáneres de matriz para leer las señales RCA o C2CA obstaculiza el uso de RCA en laboratorios con recursos limitados, como son los laboratorios periféricos, por lo que existe la necesidad de métodos alternativos. Los expertos en la técnica apreciarán que el presente dispositivo puede ser utilizado como un método que no requiere equipo de análisis avanzado y caro y, por lo tanto, es adecuado para laboratorios periféricos.

40 En realizaciones del presente método, la molécula de ácido nucleico diana amplificado se acopla a un agente de detección. Dicho acople puede ser un acople directo o indirecto, por ejemplo, por medio de una molécula de ácido nucleico adicional. Los métodos para acoplar una molécula de detección a una molécula de ácido nucleico están bien establecidos en el estado del arte y los expertos en la técnica conocen métodos adecuados, incluidos métodos eléctricos o mecánicos o iónicos o químicos o la combinación de dichos métodos. Los ejemplos no excluyentes de 45 agentes de detección de ácido nucleico orgánico e inorgánico y sus combinaciones incluyen radionúclidos, nanopartículas de oro, fluoróforos o cualquier sustancia coloreada, aptámeros o enlazadores, agentes asociados a la estreptavidina, biotina, peroxidasa de rábano o nanopartículas de oro conjugado (AuNP). En una realización, dicho agente de detección está constituido por nanopartículas de oro, como nanopartículas de oro conjugadas con una molécula de ácido nucleico. En alguna realización, dicho agente de detección es detectable visualmente. En algunas realizaciones, dicho agente de detección proporciona una señal de color.

50 En un aspecto relacionado se proporciona un kit que comprende un dispositivo según se describe en el presente documento y al menos una sonda específica para un marcador de multirresistencia, al menos una sonda que es específica para la secuencia de tipo salvaje correspondiente, y un agente de detección según se divulga en el presente documento. Por ejemplo, se pueden utilizar las combinaciones de sondas de candado descritas. Los expertos en la técnica apreciarán que la descripción de los marcadores de resistencia y de las sondas de candado efectuadas con 55 respecto al primero y al segundo aspecto de la presente divulgación es igualmente relevante para este tercer aspecto.

60 Por tanto, como se muestra en el Ejemplo 1 de la presente divulgación, la amplificación de ácido nucleico puede implicar el uso combinatorio y la integración de sondas de candado, amplificación de círculo rodante, dispositivo de lectura de flujo lateral y nanopartículas de oro para proporcionar señales de visión visibles para una evaluación simplificada del resultado de la prueba, como se analiza en detalle a continuación. Por ejemplo, la tira de prueba de flujo lateral puede tener oligonucleótidos conjugados con ácido nucleico con o sin nanopartículas de oro como una parte integral y un método para la preparación de dicha tira de prueba para la detección y/o la determinación de ácido nucleico. Las nanopartículas de oro conjugadas con ácido nucleico se estabilizan en forma seca y conservan todas sus propiedades tras la rehidratación (forma, textura, movilidad, capacidad de hibridación y estado coloidal). La presencia del ácido nucleico diana en la muestra se detecta por la formación de dos bandas rojas en las zonas de prueba y de control.

- 5 Aunque la invención se ha descrito haciendo referencia a varios aspectos y realizaciones ejemplares, aquellos expertos en la técnica entenderán que pueden efectuarse varios cambios y los elementos de la invención pueden ser sustituidos por elementos equivalentes sin abandonar el alcance de la propia invención. Además, pueden efectuarse muchas modificaciones para adaptar una situación o molécula particular a las enseñanzas de la invención sin abandonar el alcance esencial de la misma. Por tanto, se pretende que la invención no se limite a ninguna realización particular contemplada, sino que la invención incluya todas las realizaciones que se sitúen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.
- 10 Breve descripción de los dibujos
- 15 La figura 1 muestra imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) a magnificación de 50.000x y 300.000x (A y B) que muestran que las nanoesferas de oro tienen un diámetro medio de 15 o 0,5 nm. Un corrimiento de luz en el espectro de absorción (C) desde los 520 nm a los 528 nm muestra que las partículas de oro preparadas están conjugadas con los oligonucleótidos. Un único espectro terso de las mediciones de DLS (D) confirma la conjugación y la monodispersión de los conjugados AuNP-oligonucleótido.
- 20 La figura 2 muestra los resultados de la investigación del límite de detección del método PLP-LF mediante ensayos de diluciones en serie al décimo del ADN genómico de MTB (A). Los densitogramas en B, mostrados mediante el cálculo de las intensidades de color locales, representan los cambios semicuantitativos en las líneas de control y prueba.
- 25 La figura 3 muestra los resultados de las pruebas de las muestras de ADN genómico caracterizadas (300 ng) aisladas de MTB clínico con contenido de codones de tipo salvaje o mutante de rpoB 531 y katG 315. Los densitogramas muestran cualitativamente la presencia y/o la ausencia de genotipos de tipo salvaje y/o mutante de los aislados clínicos.
- 30 La figura 4 es una lista de las secuencias de ácido nucleico descritas en el Ejemplo 1 con N.º ID SEC: 1-18.
- 35 Las figuras 5a, 6a y 7a ilustran una vista en perspectiva de diferentes realizaciones del dispositivo 10; 30; 50 de acuerdo con la invención. Los dispositivos 10; 30; 50 están destinados a analizar muestras líquidas que comprenden ácidos nucleicos amplificados.
- 40 El dispositivo 10 ilustrado en la figura 6a comprende una carcasa protectora rectangular 11 que tiene una parte frontal 12, una parte trasera 13 y cuatro superficies laterales 14. El dispositivo 10 está destinado a ser dispuesto de manera sustancialmente horizontal con la parte frontal 12 hacia arriba durante su uso.
- 45 En la parte frontal 12 de la carcasa 11, se forma un pasaje de entrada de muestra sustancialmente circular 15, de manera que la muestra a analizar pueda acceder a una almohadilla de muestra 16 desde el exterior de la carcasa 11. Además, se forman dos aberturas 17 a través de las cuales se pueden visualizar los resultados del análisis en el lado frontal de la carcasa. Las aberturas 17 pueden cubrirse con una capa transparente para proteger el interior de la carcasa. El tamaño y la forma del pasaje de entrada de muestra 15 y de las aberturas 17 podrían ser modificados de diferentes maneras sin abandonar el alcance de la invención. Por ejemplo, las dos aberturas podrían ser reemplazadas por una abertura más grande.
- 50 La carcasa está elaborada, por ejemplo, de un material de plástico que proporcione soporte a los diferentes componentes del dispositivo y que proporcione la protección requerida al dispositivo.
- 55 La carcasa encierra una almohadilla de muestra 16 y una primera 18 y una segunda 19 tiras alargadas de análisis de muestra ilustradas esquemáticamente en la figura 6b.
- 60 La almohadilla de muestra 16 es en las realizaciones ilustradas sustancialmente circular y está elaborada de un material de fibra absorbente, por ejemplo, elaborada de vidrio, fibras sintéticas o de un material de celulosa. La muestra líquida se suministra a la almohadilla de muestra 16 y fluye a través de la almohadilla de muestra por movimiento capilar hasta las primera 18 y segunda 19 tiras alargadas de análisis de muestra. Esta realización se ilustra en la figura 5b y en la figura 8.
- 65 Para facilitar el flujo de la muestra, una muesca 23 que se extiende desde la periferia de la almohadilla de muestra hacia el centro de la almohadilla de muestra es formada en la almohadilla de muestra, entre la primera y la segunda tiras de alargadas de análisis. La almohadilla de muestras ilustrada es sustancialmente circular, pero la forma puede ser modificada de diversas maneras para facilitar el flujo de la muestra hasta las tiras alargadas de análisis de muestra. Una forma alternativa podría ser como una gota con el extremo estrecho orientado hacia las tiras alargadas de análisis de muestra.
- 70 La primera sección de las tiras de análisis de muestra, conectada a la almohadilla de muestra 16, es preferiblemente elaborada del mismo material que la almohadilla de muestra 16 para transferir la muestra a la sección de análisis de

muestra 20 respectiva. Para mejorar en mayor medida la transferencia de la muestra desde la almohadilla de muestra hasta las tiras de análisis de muestra, la almohadilla de muestra y la parte de las tiras alargadas de análisis de muestra que se extiende desde la almohadilla de muestra hasta la sección de análisis de muestra se forma de una única pieza de material.

5 Las secciones de análisis 20 de las primera y segunda tiras alargadas de muestra tienen la misma longitud y están dispuestas de manera paralela entre sí, una al lado de la otra, de manera que el resultado se puede leer desde la parte frontal de la carcasa a partir del resultado combinado de las dos secciones de análisis de muestra 20 de cada tira.

10 Cada sección de análisis comprende el mismo número de segmentos 22. Los segmentos 22 de cada sección de análisis de muestra están dispuestos uno al lado del otro para proporcionar el contacto deseado entre segmentos adyacentes y hacer posible que la muestra fluya a través de la sección de análisis de muestra. La sección de análisis de muestra, es decir, los diferentes segmentos dispuestos adyacentes entre sí, están elaborados de material 15 transparente dispuesto sobre la película de respaldo 31. El material transparente tiene un grosor de al menos 0,1 mm y una vez que uno de los segmentos detecta el gen o la sustancia predeterminados en la muestra, una marca tridimensional aparece dentro de la capa transparente del segmento. La capa transparente en combinación con la película de respaldo proporciona una marca muy distintiva que es fácil de leer para el usuario. Los diferentes segmentos no son visibles en las tiras de análisis, pero cuando se aplica la muestra, una marca aparece en el 20 segmento correspondiente al resultado de la muestra analizada. El resultado es detectable por la combinación de los dos segmentos transversales correspondientes de la primera y la segunda tiras de análisis.

25 Un ángulo  $\alpha$  de entre 40° y 80° se forma entre la primera y la segunda tiras alargadas de muestra para garantizar que la muestra fluya fácilmente hacia las tiras alargadas de análisis de muestra.

30 En las figuras 6a y 6b se ilustra esquemáticamente una realización alternativa del dispositivo. La carcasa tiene sustancialmente el mismo diseño que en la realización anterior, pero el dispositivo comprende una tercera tira alargada de análisis de muestra adicional dispuesta entre la primera y la segunda tiras de análisis de muestra. La tercera tira alargada de análisis de muestra es sustancialmente idéntica a la primera y a la segunda tiras alargadas de análisis de muestra y hace posible analizar características adicionales en el mismo dispositivo. La tercera tira alargada de muestra se extiende en una dirección sustancialmente radial desde el centro de la almohadilla de muestra desde la punta de la muesca formada entre las primera y segunda tiras alargadas de análisis de muestra.

35 En las figuras 7a y 7b, se ilustra esquemáticamente una realización alternativa 50 más del dispositivo 30. La carcasa tiene sustancialmente el mismo diseño que en la realización anterior, pero el dispositivo comprende una cuarta 25 y una quinta 26 tiras alargadas de análisis de muestra dispuestas en el exterior de las primera y segunda tiras alargadas de análisis de muestra, es decir, en lados opuestos a las primera y segunda tiras alargadas de análisis de muestra. Las cuarta y quinta tiras alargadas de análisis de muestra son sustancialmente idénticas a las primera y segunda tiras alargadas de análisis de muestra y hacen posible analizar características adicionales en el mismo dispositivo. Las 40 cuarta y quinta tiras alargadas de muestra se extienden primero en dirección sustancialmente radial desde el centro de la almohadilla de muestra antes de inclinarse de manera que las secciones de muestra quedan dispuestas en paralelo y lado a lado con las secciones de muestra de la primera y segunda secciones alargadas de análisis de muestra.

45 Un ángulo  $\beta$  de entre 60° y 100° se forma entre las cuarta y quinta tiras alargadas de muestra para garantizar que la muestra pueda fluir con facilidad hacia todas las tiras alargadas de análisis de muestra.

50 En la figura 7b, se ilustra en perspectiva la sección de muestra. La almohadilla de muestra 16 y las tiras alargadas de análisis de muestra 18, 19, 24, 25, 26 comprenden preferiblemente una película de respaldo de plástico 31 dispuesta de manera opuesta al pasaje de entrada 15 y a las aberturas 17 de la carcasa para prevenir que la muestra líquida se escape de la almohadilla de muestra y de las tiras alargadas de análisis de muestra. Cada una de las primera, segunda, tercera, cuarta y quinta tiras alargadas de análisis de muestra comprende una sección de análisis 20 que comprende un número de segmentos preparados para mostrar una marca si se detecta una secuencia de ácido nucleico predeterminada en la muestra líquida que fluye a través de la sección de muestra 20. Cada una de las primera, segunda, tercera, cuarta y quinta tiras alargadas de análisis de muestra comprende además una almohadilla 55 absorbente 28 dispuesta en el extremo de la tira de muestra. La almohadilla absorbente facilita el flujo de la muestra a través de la sección de análisis 20.

60 Los diferentes segmentos 22 de las secciones de muestra 20 no son visibles antes de que se haya aplicado la muestra y el resultado se muestra en la sección de análisis de muestras mediante una línea o un símbolo que aparece en la tira de análisis de muestra si se detecta en la muestra la bacteria o el ácido nucleico en particular que activa la marca en ese segmento.

65 El número de segmentos de la sección de muestra 20 podría adaptarse al análisis específico para el que está adaptado el dispositivo, pero en la mayoría de los casos comprende al menos 5 segmentos. El resultado del análisis se lee a partir de la combinación del resultado indicado en las respectivas secciones de análisis de muestra dispuestas lado a lado, es decir, los dos, tres o cinco segmentos dispuestos transversalmente a las secciones de muestra 20.

**Ejemplo 1**

## Resumen

5 Los siguientes Ejemplos revelan la prueba de concepto de la preparación y el análisis de muestras del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) que forma la base de la presente invención.

## Materiales y métodos

10 Químicos y oligonucleótidos: Estreptavidina de *streptomyces avidinii*, trihidrato de cloruro de oro (III) (HAuCl<sub>4</sub>), sacarosa, ditiotreitol (DTT), Tritón-X 100, citrato de trisodio, tris(hidroximetil)aminometano clorhidrato (Tris-HCl), Tween 20, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y albúmina de suero bovino (ASB, para los conjugados de oligonucleótidos-AuNP), tampón de cloruro de sodio-citrato de socio (SSC) (pH 7,0), tampón fosfato salino (PBS, pH 15 7,4 0,01 M) y cloruro de sodio (NaCl, 5 M, pH 7,0), ATP, dNTPs, oligonucleótidos (adquiridos a Integrated DNA Technologies y Sigma-Aldrich). Para el ensayo de flujo lateral, almohadillas de fibra de vidrio de borosilicato sin aglutinantes (grado A/C), almohadillas absorbentes de fibra de celulosa (grado 113) y membrana de nitrocelulosa unida a las tarjetas/tiras laminadas (0,4 y 0,5 cm de ancho).

20 Cepas bacterianas y extracción de ADN: La cepa de referencia MTB H37Rv (ATCC 25618) y diez aislados clínicos de MTB (Tabla 2) se cultivaron en un medio Lowenstein-Jensen con y sin 40 mg/l de RIF, respectivamente. Se extrajo el ADN y se fragmentaron enzimáticamente 10 mg de ADN genómico utilizando 10 U de Nael y de HpyCH4V y 1x tampón CutSmart (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE. UU.) a 37 °C durante 90 minutos, a lo que siguió la inactivación de la enzima a 65 °C durante 20 minutos. La concentración de ADN se midió mediante los ensayos dsDNA HS y BR 25 utilizando el fluorómetro Qubit 2.0 (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.).

Tabla 2. Información genotípica de las cepas

| ID de cepa | Genotipo rpoB    | Genotipo katG   |
|------------|------------------|-----------------|
| 2          | S531 L (TCG/TTG) | S315T (AGC/ACC) |
| 4          | S531 L (TCG/TTG) | S315T (AGC/ACC) |
| 8          | S531 L (TCG/TTG) | S315T (AGC/ACC) |
| 9          | S531 L (TCG/TTG) | S315T (AGC/ACC) |
| 12         | S531 L (TCG/TTG) | S315T (AGC/ACC) |
| 13         | S531 L (TCG/TTG) | WT              |
| 17         | S531 L (TCG/TTG) | S315T (AGC/ACC) |
| 19         | WT               | WT              |
| 20         | WT               | WT              |
| 21         | WT               | WT              |

30 Sondas de candado y amplificación de círculo rodante: Las secuencias de oligonucleótidos utilizadas en este estudio se proporcionan en la Figura 4. Se diseñaron cuatro PLPs dirigidas a dos codones en los genes katG y rpoB y sus correspondientes secuencias de tipo salvaje (katG 315 ACC (MUT), katG 315 AGC (WT), rpoB 531 TTG (MUT) y rpoB 531 TCG (WT)). Tras verificar las estructuras secundarias utilizando el servidor web Mfold, las PLPs se fosforilaron en el extremo 5' incubando una mezcla de reacción consistente en 1 mM de oligonucleótido, 1x tampón PNK A, 1 mM 35 ATP y 1 U/ml polinucleótido quinasa T4 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) a 37 °C durante 30 minutos, a lo que siguió la inactivación de la enzima a 65 °C durante 20 minutos. La confirmación de la eficacia de la PLP se comprobó llevando a cabo una C2CA [Dahl et al. Proc Natl Acad Sci EE. UU. 2004, 101, 4548-4553] con modificaciones. La sensibilidad del ensayo se evaluó mediante tiras de flujo lateral con amplicones preparados a partir de 300 pg, 3 ng, 30 ng y 300 ng de ADN genómico.

40 Preparación y caracterización de nanopartículas de oro conjugadas con oligonucleótidos: Las nanopartículas de oro fueron preparadas por un método de reducción de citrato estándar [Frens G. Nature Phys Sci. 1973, 241, 20-22] con modificaciones. En un matraz seco de fondo redondo de 500 ml de vidrio borosilicato, limpiado en acuña regia (ácido nítrico y ácido clorhídrico en una proporción de 3:1), se hirvieron 100 ml de HAuCl<sub>4</sub> al 0,01 % en agua MilliQ agitando de manera vigorosa. Se añadieron cuatro milímetros de solución de citrato tridósico al 1 % tras volverse de color rojo vino. Se redujeron cincuenta micromolares de oligonucleótidos tiolados, diseñados para hibridarse con una secuencia presente en todos los monómeros de C2CA, con 500 mM de DTT en tampón SSC durante 30 minutos. Se utilizó una columna NAP™-5 (GE Healthcare Biosciences, Little Chalfont, Reino Unido) para purificar los oligonucleótidos y se eluyeron directamente en 1 ml de AuNPs. Despues de incubar durante 2 horas a 37 °C, se añadió de forma incremental 50 1 M NaCl y se mantuvo la mezcla a 4 °C para su "envejecimiento". La solución fue centrifugada a 13.000 g durante 25 minutos, se descartó el sobrenadante y se redispersaron los conjugados AuNP-oligonucleótidos en 1 ml de BSA al 5 %, Tween 20 al 0,25 % y 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0).

55 Se obtuvieron imágenes convencionales de microscopio electrónico de transmisión (TEM) de las AuNP preparadas a 100 kV para comprobar la calidad de las partículas preparadas. Se caracterizaron los conjugados AuNP-

oligonucleótidos midiendo su absorción de luz a 520 nm en un lector de microplatas multimodo (SpectraMaxR M5, Molecular Devices) y su carga superficial (potencial  $\zeta$ ) se midió mediante dispersión de luz dinámica (DLS) utilizando un Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, Reino Unido) equipado con un láser HeNe de 4,0 mW y un detector de fotodiodo de avalancha.

5 Diseño, ensamblaje y preparación de las tiras de flujo lateral: La tira de flujo lateral de 100 x 5 mm consta de una almohadilla de aplicación de muestra, una membrana de nitrocelulosa y una almohadilla absorbente que se montan sobre un soporte de plástico delgado. La almohadilla de muestra seca (25 x 5 mm), después de la saturación con BSA al 1 %, Triton X-100 al 1 %, 20 mm de Tris-HCl, 100 mm de NaCl; pH 8,0), se fijó en un extremo de la membrana de nitrocelulosa (45 x 5 mm) con un solapamiento de 2-3 mm y la almohadilla absorbente (30 x 5 mm) se fijó en el otro extremo de la membrana de nitrocelulosa. Los oligonucleótidos en tira biotinilados (Figura 3) fueron inmovilizados en zonas de prueba y de control en la membrana de nitrocelulosa. La zona de control contenía una línea de oligonucleótidos inmovilizados complementarios a los conjugados AuNP-oligonucleótido. La zona de prueba contenía 4 líneas separadas por 3 mm, en donde cada línea constaba de oligonucleótidos en tira únicos para la detección de los monómeros de C2CA correspondientes a sus genotipos específicos de katG 315 WT, katG 315 MUT (AGC/ACC), rpoB 531 WT y rpoB 531 MUT (TCG/TTG) por hibridación. Se mezclaron cincuenta micromolares de oligonucleótidos en tiras con un volumen igual de 1 x PBS que contenía 15 mM de estreptavidina. Tras la incubación a 37 °C durante 2 horas, el oligonucleótido conjugado con estreptavidina fue inmovilizado en la membrana de nitrocelulosa utilizando un trazador de gráficos nanométrico (Nano-Plotter NP2.0, GeSiM, Grosserkmannsdorf, Alemania).

10 20 Visualización de los amplicones de C2CA en las tiras de flujo lateral: Se hibridaron cincuenta y cinco microlitros de los monómeros de C2CA (fragmentos de ácido nucleico amplificados) con 13 ml de conjugados de AuNP-oligonucleótido y se aplicaron a la almohadilla de muestra de las tiras de flujo lateral, gota a gota. Se dejó fluir la muestra durante 5-7 minutos y se lavó con un tampón de 4x SSC para visualizar las bandas de color rojo. El desarrollo del color en la línea de control indicaba el control positivo del ensayo, mientras que las señales de cada línea de prueba se referían específicamente a la presencia de los genotipos WT y/o MUT de katG 315 y rpoB 531. Se generaron gráficos de intensidad para las bandas y se midieron las densidades de píxeles para cuantificar los resultados en densitogramas, utilizando la herramienta de código abierto ImageJ (Versión 1.49q) [Schneider et al. Nat. Meth. 2012, 9, 671 -675].

### 30 Resultados

35 Como se muestra en el presente documento, el presente Ejemplo proporciona un ensayo de prueba de principio que puede producir señales visuales rápidas para discriminar entre el tipo salvaje y las mutaciones en los genes katG y rpoB que causan MDR-TB, es decir, resistencia a INH y RIF. El método puede producir señales visuales en aproximadamente 75 minutos y los resultados pueden guiar a los médicos en la toma de decisiones informadas sobre acciones de control de salud pública, así como en la adaptación a un régimen antibiótico eficaz. Este ensayo proporciona información preliminar alternativa a la prueba DST convencional, que requiere grandes cantidades de tiempo, y ofrece una solución compatible para los laboratorios clínicos con recursos limitados. Por tanto, los presentes inventores han desarrollado una prueba de diagnóstico sencilla, específica y rentable para la rápida identificación de 40 resistencia a fármacos y/o antibióticos. La prueba basada en ADN es adecuada para su aplicación en laboratorios clínicos con recursos limitados y proporciona información sobre el patrón de resistencia a fármacos y/o antibióticos de las bacterias que infectan a un paciente, lo cual es valioso para los médicos a la hora de tomar las medidas adecuadas para el tratamiento y el control de las infecciones.

45 50 Evaluación de los conjugados AuNP-oligonucleótidos: Las imágenes TEM de las AuNP (figuras 1A y B) confirman que el tamaño de las partículas esféricas es de  $\sigma$  3,5 nm. La curva de distribución de tamaño basada en la absorción de luz de las AuNP mostró una  $\lambda$ -máx a 520 nm antes de la conjugación de oligonucleótidos y el pico se desplazó a 527 nm después de la conjugación (figura 1C). Las medidas de DLS (figura 1D) revelaron un diámetro promedio de 90  $\sigma$  4 nm con un único pico que indica una solución monodispersa sin agregación de partículas. Las medidas de potencial  $\zeta$  de -37,4 mV y -34,5 mV de las AuNP y sus conjugados de oligonucleótidos, respectivamente, mostraron que las preparaciones eran estables.

55 60 Límite de detección de la prueba de flujo lateral con sonda de candado: El límite de detección (LOD) de este ensayo de PLP-LF se llevó a cabo por triplicado analizando varias diluciones de ADN genómico de la cepa de referencia MTB H37Rv. Dado que ambas señales se observaron claramente con 300 ng de ADN (figura 2A), el resto de experimentos con ADN de muestras clínicas (Tabla 2) de este ensayo de prueba de concepto se llevó a cabo utilizando dicha cantidad. Los densitogramas (figura 2B) basados en la densidad de píxeles local de las señales de color rojo desarrolladas en las tiras de flujo lateral se correlacionaron con la observación visual. La intensidad de señal de rpoB 531 VVT fue inferior a la de katG 315 VVT, lo cual pudo deberse al alto contenido GC en la región diana del gen rpoB, resultando potencialmente en un rendimiento de monómeros de C2CA menor. Se observaron variaciones menores entre los densitogramas de las líneas de control, aunque se utilizaron las tiras de flujo lateral de la misma sesión de impresión. Las mejoras encaminadas a lograr una mayor sensibilidad permitirían llevar a cabo pruebas directas en muestras de esputo.

65 Evaluación visual del ensayo de flujo lateral con sondas de candado en aislados clínicos de MTB: Se probó un conjunto de 10 aislados clínicos de MTB (Tabla 2) que eran resistentes y/o susceptibles a INH y RIF, mediante el método PLP-

LF. Tal y como se puede ver en la figura 3, seis cepas (N.º de identificación: 2, 4, 8, 9 y 12) contenían los codones mutantes katG y rpoB; tres cepas (19, 20 y 21) poseían solo codones de tipo salvaje y una cepa (13) mostró la presencia del codón katG de tipo salvaje y del codón rpoB mutante. Todas las señales visuales del ensayo de PLP-LF de las cepas analizadas fueron totalmente concordantes con la caracterización genotípica de las cepas por pirosecuenciación y los respectivos densitogramas de debajo de cada tira de flujo lateral corresponden a sus señales visuales. El método podría ampliarse incluyendo una variedad de otras mutaciones que causan MDR-TB y la sensibilidad podría mejorarse para su aplicación directa en muestras de esputo de pacientes con TB.

## REIVINDICACIONES

1. Dispositivo (10; 30; 50) para analizar muestras líquidas que comprenden ácidos nucleicos amplificados, dicho dispositivo comprendiendo:

- 5 una almohadilla de muestra (16);
- 10 una primera (18) y una segunda (19) tiras de análisis de muestra configuradas para analizar diferentes aspectos de la muestra de ácido nucleico, en donde la primera y la segunda tiras son alargadas y se extienden desde la almohadilla de muestra y cada una de dichas primera y segunda tiras comprende una sección de análisis sustancialmente recta (20) dividida en un número de segmentos (22), cada uno configurado para indicar si un ácido nucleico diana con una secuencia predeterminada está presente o ausente de dicha muestra, dicho ácido nucleico diana con una secuencia predeterminada estando acoplado directa o indirectamente a una molécula de detección, y
- 15 en donde las secciones de análisis de dichas primera y segunda tiras de análisis de muestra comprenden una película de respaldo cubierta por una capa transparente con un grosor de al menos 0,1 mm, dichas secciones de análisis están configuradas para analizar la presencia o la ausencia de ácidos nucleicos con diferentes secuencias predeterminadas, teniendo dichas secciones de análisis de las primera y segunda tiras de análisis de muestra sustancialmente la misma longitud y estando dispuestas una al lado de la otra de manera que el resultado del análisis es detectable a partir de la combinación de las marcas tridimensionales que aparecen en la capa transparente de segmentos alineados de dichas primera y segunda tiras de análisis,
- 20 25 en donde dichos segmentos comprenden secuencias de ácido nucleico que son complementarias a las secuencias predeterminadas de los ácidos nucleicos dianas cuya presencia o ausencia es analizada; y
- 30 una carcasa (11) que encierra dicha almohadilla de muestra y al menos dos tiras alargadas de análisis de muestra, comprendiendo dicha carcasa un lado frontal (12) en el que se forma un pasaje de entrada de muestra (15) de manera que la almohadilla de muestra es accesible desde el exterior de la carcasa y al menos una abertura (17) de manera que el resultado del análisis es detectable desde el exterior de la carcasa.
- 35 40 45 50 55 60 65 2. Dispositivo para analizar muestras líquidas que comprende ácidos nucleicos amplificados según lo reivindicado en la reivindicación 1, en donde la sección de análisis de la primera tira de análisis de muestra comprende al menos un segmento que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico parcial de un gen de tipo salvaje y la sección de análisis de la segunda tira de análisis de muestra comprende al menos un segmento que comprende la correspondiente secuencia de ácido nucleico de un mutante de dicho gen, dicha secuencia correspondiente de ácido nucleico incluyendo al menos una mutación.
3. Dispositivo para analizar muestras líquidas que comprende ácidos nucleicos amplificados de acuerdo con lo reivindicado en la reivindicación 2, en donde dicho gen comprende al menos un marcador de resistencia a antibióticos, tal como un marcador de resistencia a antibióticos de *Mycobacterium tuberculosis*, tal como al menos un marcador de resistencia a antibióticos seleccionado de entre el grupo constituido por *rpoB* 516 TAC, *rpoB* 516 GTC, *katG* 315 ACC, *rpoB* 531 TTG, *rpoB* 531 TGG, *rpoB* 526 TAC, *rpoB* 526 GAC, *rpoB* 526 CTC, *rpoB* 526 ACC, *inhA* - 15 T, *rrs* 1401 G, *gyrA* 94 GGC, *gyrA* 90 GTG y *rpoB* 533 CCG.
4. Dispositivo para analizar muestras líquidas que comprenden ácidos nucleicos amplificados de acuerdo con lo reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dichas secciones de análisis son biosensores de flujo lateral o están formadas por un material de celulosa transparente o material polimérico.
5. El dispositivo de acuerdo con lo reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la película de respaldo (31) y la marca tridimensional que aparece en los segmentos tienen colores diferentes.
6. El dispositivo de acuerdo con lo reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la almohadilla de muestra y las tiras alargadas de análisis de muestra se forman de un material de fibra absorbente a través del cual la muestra puede fluir por fuerza gravitacional y/o movimiento capilar.
7. El dispositivo de acuerdo con lo reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la almohadilla de muestra y la parte de las tiras alargadas de análisis de muestra que se extiende desde la almohadilla de muestra hasta el primer segmento se forma en una sola pieza de material.
8. El dispositivo de acuerdo con lo reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las primera y segunda tiras alargadas de muestra se extienden en una dirección sustancialmente radial desde el centro de la almohadilla de muestra antes de inclinarse de manera que las secciones de análisis de la primera y la segunda tiras alargadas de análisis de muestra quedan dispuestas sustancialmente paralelas entre sí y el resultado es detectable a partir de la combinación de los segmentos dispuestos transversalmente con respecto a las tiras alargadas de análisis de muestra.

9. El dispositivo de acuerdo con lo reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo una tercera tira de análisis de muestras alargada (24) configurada para analizar diferentes aspectos de la muestra de ácido nucleico, en donde la sección de análisis de dicha tercera tira de muestra está configurada para analizar la presencia o la ausencia de ácidos nucleicos con diferentes secuencias predeterminadas y tiene sustancialmente la misma longitud que, y está dispuesta entre, dichas primera y segunda tiras alargadas de análisis de muestra de manera que el resultado del análisis es detectable a partir de la combinación de los segmentos correspondientes de las tres tiras de análisis, preferiblemente en donde la tercera tira alargada de muestra se extiende en una dirección sustancialmente radial desde la almohadilla de muestra desde la punta de una muesca (23).

10. El dispositivo de acuerdo con lo reivindicado en la reivindicación 8, en donde se forma un ángulo  $\alpha$  de entre 40° y 80° entre la primera y la segunda tiras alargadas de muestra y se forma una muesca (23), que se extiende desde la periferia hacia el centro de la almohadilla de muestra, en la almohadilla de muestra entre la primera y la segunda tiras alargadas de muestra de manera que la muestra sea dirigida hacia la primera y la segunda tiras alargadas de muestra.

15. El dispositivo de acuerdo con lo reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1-10, comprendiendo una cuarta (25) y una quinta (26) tiras alargadas de análisis de muestra configuradas para analizar diferentes aspectos de la muestra de ácido nucleico, en donde las secciones de análisis de las cuarta y quinta tiras de muestra están configuradas para analizar la presencia o la ausencia de ácidos nucleicos con diferentes secuencias predeterminadas y tienen la misma longitud y están dispuestas en lados opuestos a las primera y segunda tiras de análisis de muestra de manera que el resultado del análisis es detectable por la combinación de los segmentos correspondientes de las cuatro o las cinco tiras de análisis, preferiblemente en donde la cuarta y la quinta tiras alargadas de muestra se extienden en una dirección sustancialmente radial desde el centro de la almohadilla de muestra antes de inclinarse de manera que las secciones de análisis quedan dispuestas paralelas entre sí y las primera y segunda secciones de análisis quedan alineadas con las secciones de análisis de las primera y segunda tiras alargadas de muestra.

20. El dispositivo de acuerdo con lo reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde se forma una estructura de soporte dentro de la carcasa para soportar la almohadilla de muestra y las tiras alargadas de muestra en su posición correcta dentro de la carcasa.

25. Método para determinar la presencia o la ausencia de un ácido nucleico diana con una secuencia predeterminada en una muestra de un sujeto, comprendiendo el método los pasos de:

- 30 a) proporcionar una muestra biológica que se ha obtenido previamente de un sujeto de manera no invasiva,
- 35 b) someter a la muestra a la amplificación selectiva de al menos un ácido nucleico diana con una secuencia predeterminada para obtener ácido nucleico diana amplificado,
- 40 c) aplicar el ácido nucleico diana amplificado a la almohadilla de muestra del dispositivo (10; 30; 50) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12,
- 45 d) incubar dicho dispositivo durante un período de tiempo suficiente como para permitir la detección de dicho ácido nucleico diana por medio de un agente de detección, y
- 50 e) detectar la presencia o la ausencia del al menos un ácido nucleico diana con una secuencia predeterminada.

14. Método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicho ácido nucleico es ADN o ARN, tal como ADN bacteriano, tal como ADN del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

55. Kit que comprende un dispositivo de acuerdo con lo reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1-12 y al menos una sonda específica para un marcador de multirresistencia, al menos una sonda que es específica para la secuencia de tipo salvaje correspondiente, y un agente de detección.

Figura 1

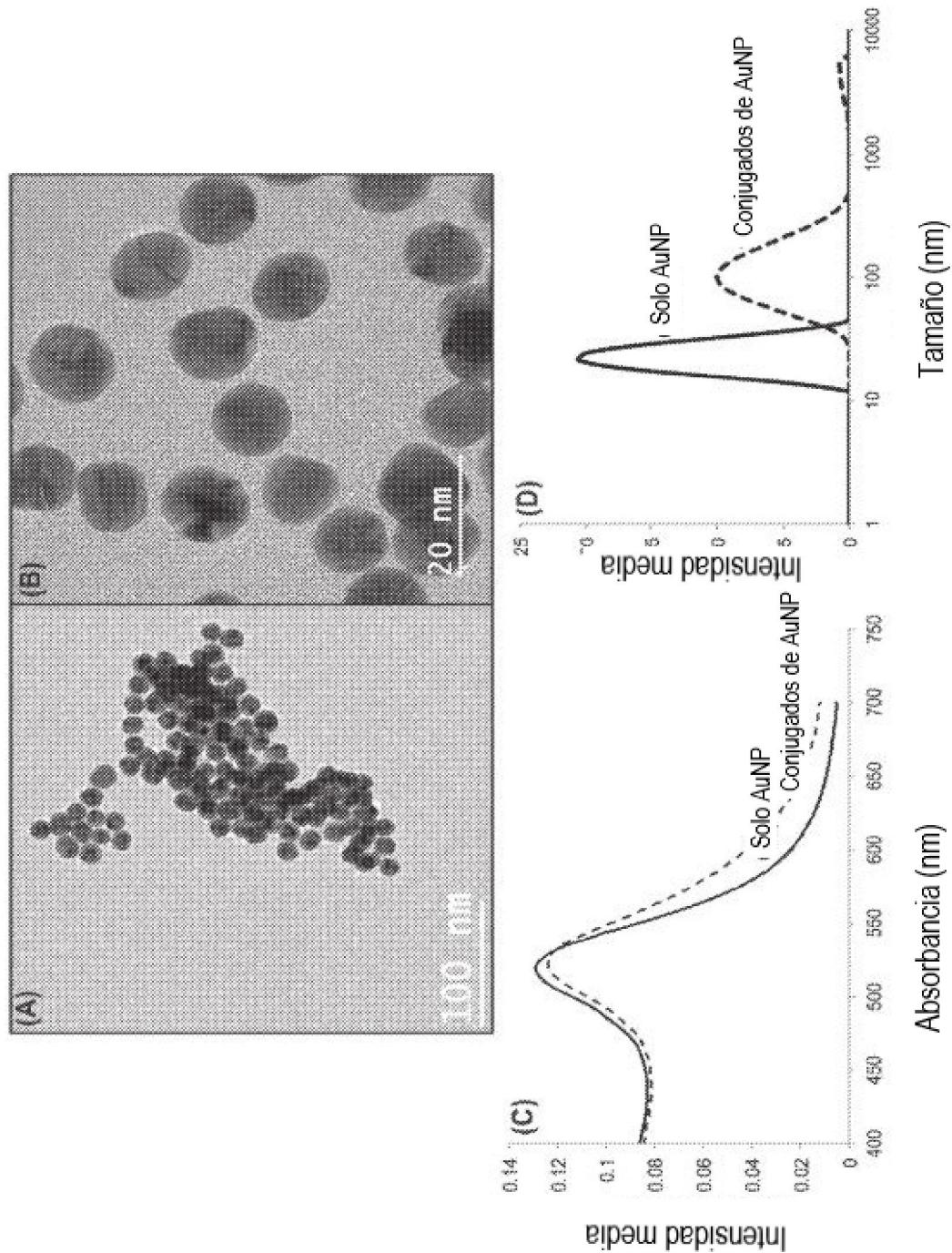


Figura 2

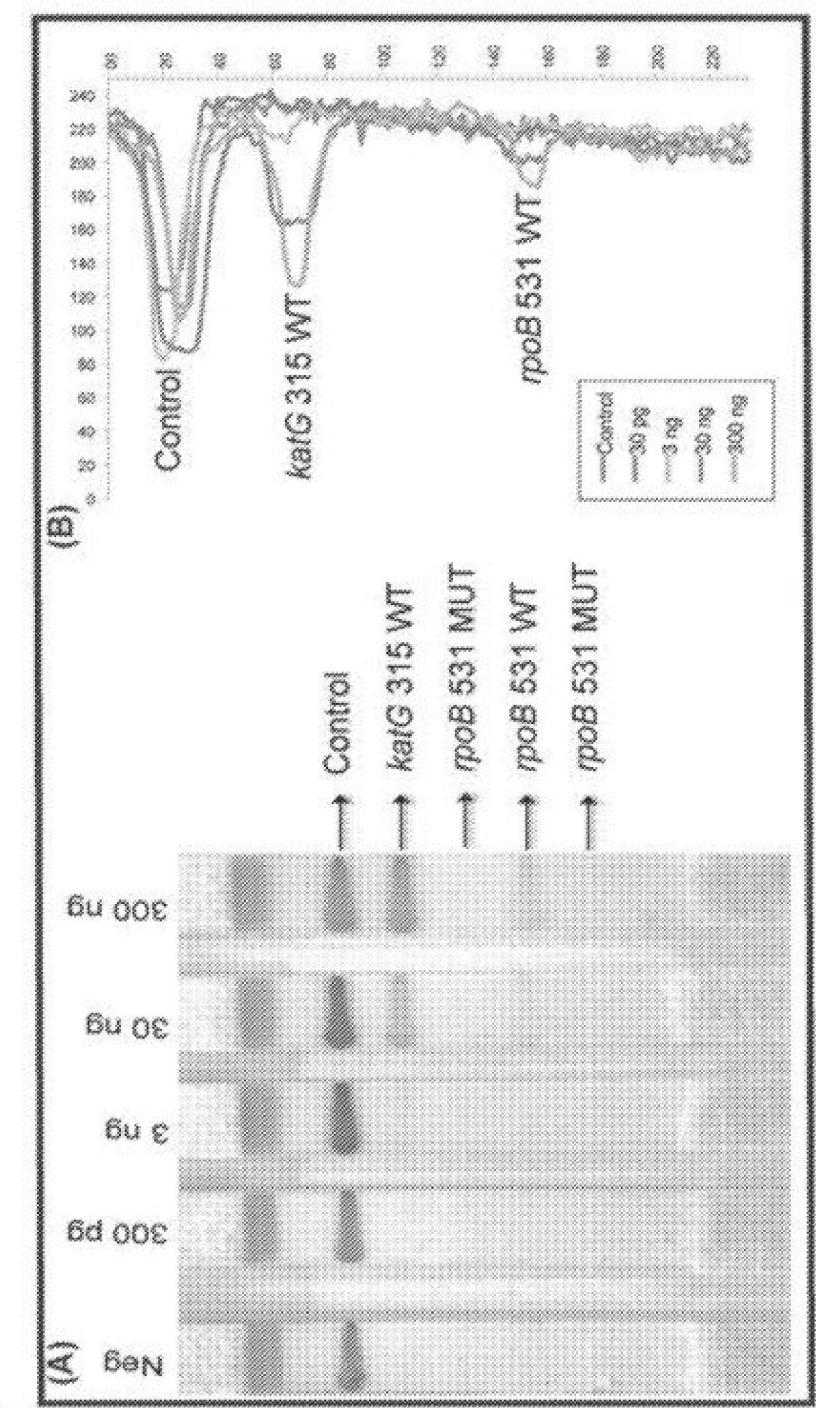


Figura 3

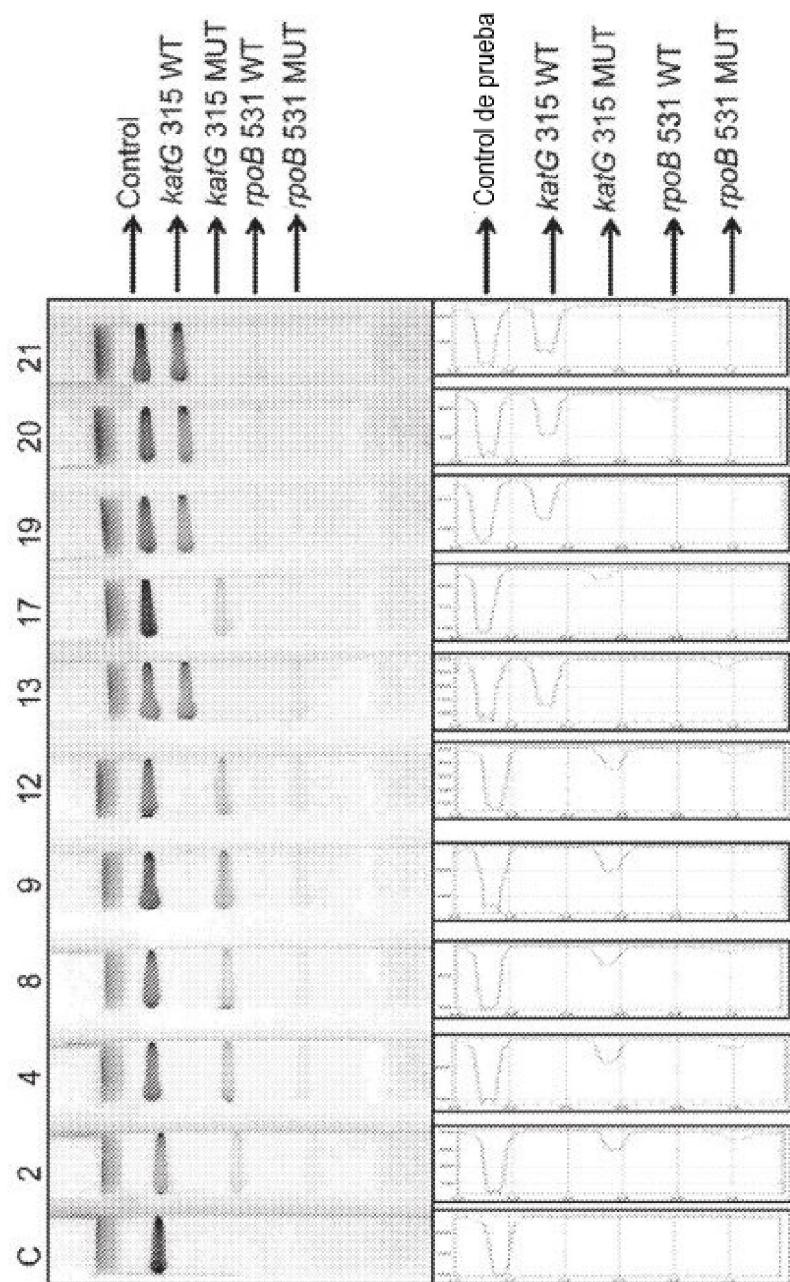


Figura 4A

| N.º ID SEC | ID Oligo | Nombre               | Secuencia (5' → 3')                    | Descripción                    | Modificación 5' | Modificación 3' |
|------------|----------|----------------------|--|--------------------------------|-----------------|-----------------|
| 1          | S01233   | <i>rpoB</i> 531 wt   | AAAAAAAAAAAGATCACACTTACGGAACAGC        | Oligonucleótido en tira        | Biotina         |                 |
| 2          | S01234   | <i>rpoB</i> 531 TTG  | AAAAAAAAAAAGATCTAACGACGGAACTC          | Oligonucleótido en tira        | Biotina         |                 |
| 3          | S01237   | <i>katG</i> 315 wt   | AAAAAAAAAAAGACTGAGAGTTGATGACCTGT       | Oligonucleótido en tira        | Biotina         |                 |
| 4          | S01239   | <i>katG</i> 315 ACC  | AAAAAAAAAAAGACTGGAAAGGCTACTC           | Oligonucleótido en tira        | Biotina         |                 |
| 5          | S01235   | TB-control oligo_v1  | ATAGTSTCTTACTTAAAAAAA                  | Oligonucleótido en tira        | Biotina         |                 |
| 6          | S01236   | TB-Gold Oligo_v1     | GTAAAGACACTATTACTGAGGGAAAAAAA          | Conjugado AuNP-oligonucleótido |                 | Tiol            |
| 7          | S003448  | <i>katG</i> 315 wt   | TGGTGATGGCTCTTACACAGTCATC3AACTCT       |                                |                 |                 |
|            |          |                      | AGGTGTATGCAAGCTCTCAGTAATAAGTGTCTTACATA | Sonda de candado               |                 |                 |
| 8          | S003565  | <i>katG</i> 315 ACC  | TGGTGATGGCTCTTACCGAGTAGCCCTCCGAGCA     |                                |                 |                 |
|            |          |                      | CGACCTCGATGCC                          | Sonda de candado               |                 |                 |
| 9          | S003592  | <i>rpoB</i> 531 wt   | GGGCTGGGGTTGCTGTTCCGTAAGTGTGATGCT      |                                |                 |                 |
|            |          | 8S Popeye2           | ATGCAGCTCTCAGTAATAAGTGTCTTACTGGTGGACC  | Sonda de candado               |                 |                 |
| 10         | S00228   | <i>rpoB</i> 531 TTG  | CACAAGTTTTCGACATGTC                    |                                |                 |                 |
|            |          | R5 v1                | GGGCTGGGGAGTTCCGTTAGATGCTGTT           | Sonda de candado               |                 |                 |
|            |          |                      | GCAGCTCTCAGTAATAAGTGTCTTACGCGCCGACTGT  |                                |                 |                 |
| 11         | 111783   | TB <i>rpoB</i> CO RS | T                                      |                                |                 |                 |
|            |          |                      | CTCTCTCTCTCTCTCTCTGCCCCGACGTGACCCG     | Oligonucleótido de captura     | Biotina         |                 |
| 12         | 111860   | <i>katG</i> CO       | TCGCACTACGGCCGGATGTGCC                 |                                |                 |                 |
|            |          |                      | CTCTCTCTCTCTCTCTCTTCCAGCCCCAACGCCATCT  | Oligonucleótido de captura     | Biotina         |                 |
|            |          |                      | GCTCCAGGGAGGAGGAGCTGGGTTC              |                                |                 |                 |

Figura 4B

| N.º ID SEC | ID Oligo | Nombre              | Secuencia (5' → 3')  | Descripción                    | Modificación 5' | Modificación 3' |
|------------|----------|---------------------|--|--------------------------------|-----------------|-----------------|
| 13         | S00244   | BNL_RO_Alu          | GTGTATGCAGCTCTCAGTA  | Oligonucleótido de restricción |                 |                 |
| 14         | S00166   | Alu/RO              | TACTGAGGAGCTGCATACAC   | Oligonucleótido de restricción |                 |                 |
| 15         | 112879   | TB rpob SW RS wt v2 | GGCACATCGGGGGTAGTGCACGGTGCACGTGCG<br>GGACCTCACGTCAGACGGGGGGGGGGGGGGGGGG<br>GACAGTCGGCGCTTGEGGGTAACCCCCAACAGCGG   | Diana sintética                |                 |                 |
| 16         | 111801   | TB rpob SW RS mut   | GGCACATCGGGGGTAGTGCACGGTGCACGTGCG<br>GGACCTCACGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG<br>GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG<br>ACCCGACAGGGGGTTGT                    | Diana sintética                |                 |                 |
| 17         | 112721   | katG SW wt v2       | GAACCCGAGGGCTGGCTGGCTGGAGCAGATGGCTTG<br>GGCTGGAAAGAGCTCGTATGGTAAGGACGGGATCAC<br>CAGCGGCGATCGAGGGCTGAT  | Diana sintética                |                 |                 |
| 18         | 112560   | katG 315 ACC diana  | GAACCCGAGGGCTGGCTGGAGCAGATGGCTTG<br>GGCTGGAAAGAGCTCGTATGGTAAGGACGGGATCAC<br>GGACCGGATACCGGGCATCGAGGGGGAAACGGTAA<br>GGACCGGATACCGGGCATCGAGGGGGAAACGGTAA | Diana sintética                |                 |                 |

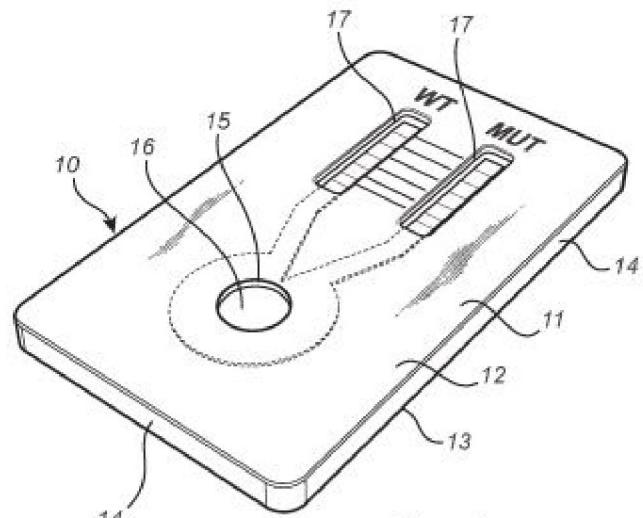


Fig. 5a

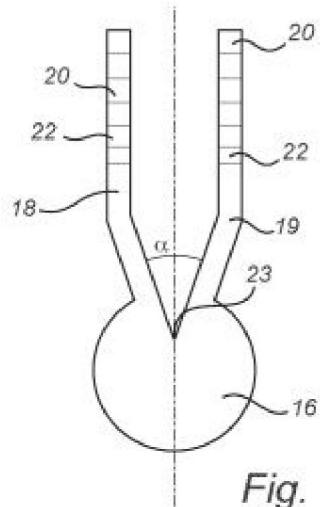


Fig. 5b

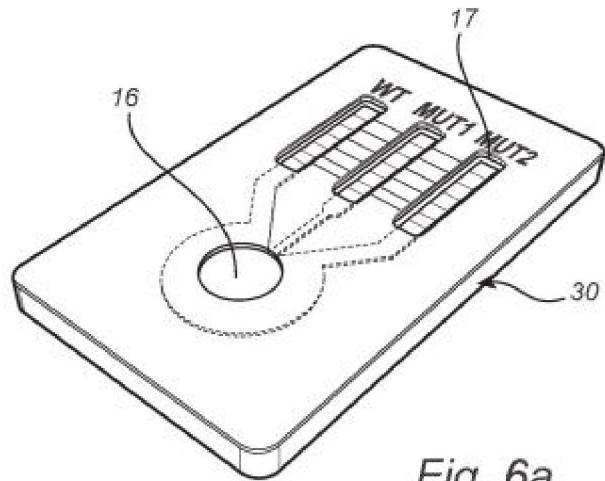


Fig. 6a

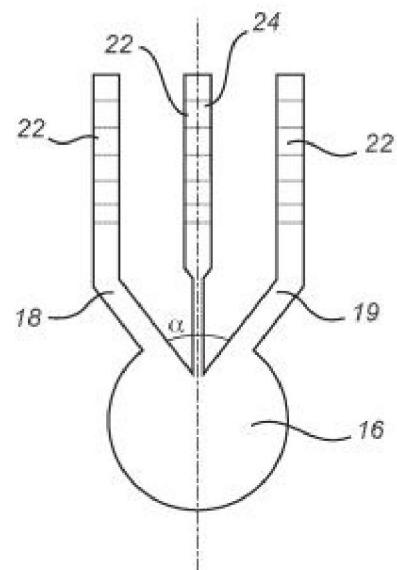


Fig. 6b

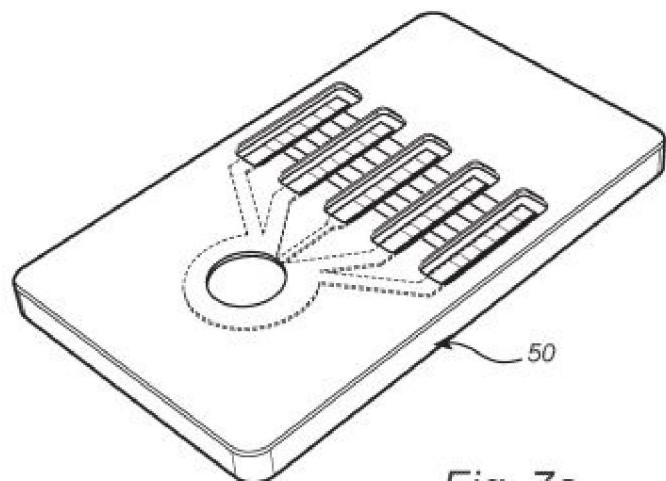


Fig. 7a

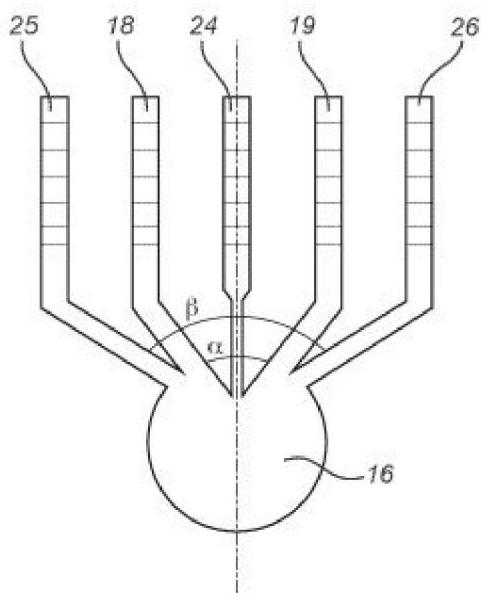


Fig. 7b

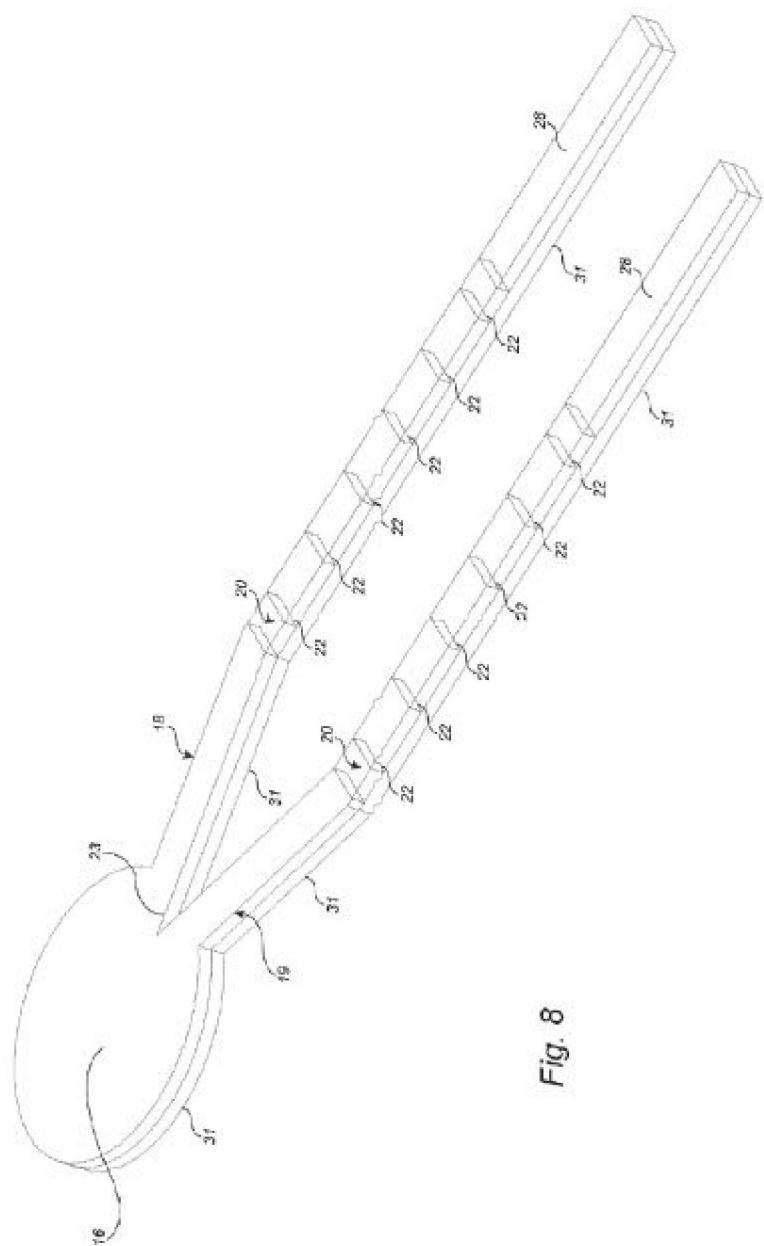


Fig. 8