



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 269 890**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03021347 .4**

86 Fecha de presentación : **20.09.2003**

87 Número de publicación de la solicitud: **1408120**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **14.04.2004**

54 Título: **Detección del *Enterococcus* spp vancomicina-resistente.**

30 Prioridad: **25.09.2002 US 254260**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

73 Titular/es: **MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL
EDUCATION AND RESEARCH
200 First Street S.W.
Rochester, Minnesota 55905, US**

72 Inventor/es: **Cockerill, Franklin R., III y
Sloan, Lynne M.**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 269 890 T3

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

DESCRIPCIÓN

Detección del *Enterococcus* spp vancomicina-resistente.

5 **Campo técnico**

Esta invención se relaciona con los diagnósticos bacterianos, y más particularmente para la detección de *Enterococcus* spp resistente a la vancomicina.

10 **Antecedentes**

Los enterococos son cocos Gram-positivos que se consideran habitantes normales del tracto gastrointestinal y la región genital femenina. Los *Enterococcus* spp. no son patógenos particularmente en humanos, pero los enterococos resistentes a la vancomicina ha sido progresivamente identificado como una causa importante de infección adquirida en los hospitales. Los enterococos resistentes a la vancomicina han sido reconocidos como la segunda causa más común de infección hospitalaria, excedidas únicamente por el *E. coli*. *Enterococcus faecalis* (85-90%) y *E. faecium* (5-10%), son las especies de Enterococos más comúnmente aisladas de los tractos gastrointestinales de humanos y representan la mayoría de los enterococos resistentes a la vancomicina.

20 WO 03/068911 A2 que se publicó después de la fecha de prioridad de la aplicación de la patente pendiente, revela un método para la realización de un PCR cuantitativo utilizando detección de Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia (FRET) de ácidos nucleicos empleando dos sondas, cada una conjugada a un diferente fluoróforo. Un fluoróforo es un fluoróforo donador que se excita por medio de una fuente de luz externa. La energía del fluoróforo donador luego se transfiere no-radiactivamente a un fluoróforo aceptor si los dos fluoróforos están en cercana proximidad. Esto puede ocurrir si las dos sondas hibridizan a un ácido nucleico blanco tal que los fluoróforos se separen, por ejemplo, por una a cinco bases. El método es apropiado para la detección de una infección microbiana de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*.

30 De Palladino, S. *et al.*, Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, vol. 45, no. 1, 2003, publicado después de la fecha de prioridad, se conoce un PCR a tiempo real para la detección rápida de genes *vanA* y *vanB* que son responsables de la resistencia a la vancomicina. Se revelan las secuencias de cebadores y sondas. El método de detección es apropiado para utilizar en la plataforma Roche LightCycler.

35 De Palladino, S. *et al.*, Journal de Clinical Microbiology, vol. 41, no. 6, 2003, páginas 2483-2486 que fue publicado después de la fecha de prioridad, se conoce un PCR múltiple apropiado para usar en la plataforma Roche LightCycler y capaz de identificar los genes *vanA* y *vanB* simultáneamente. El PCR se realizó con un extracto de ADN de muestras de hisopo rectal obtenidas de pacientes quienes previamente se encontraron por ser positivos para enterococos resistentes a la vancomicina (VRE). Se utilizaron como controles de una cepa de *Enterococcus faecalis* que contiene el gen *vanB* y un aislado clínico de *Enterococcus faecium* que contiene el gen *vanA*.

40 De Huletsky, A. *et al.*, Abstracts of the Interscience Conference on Antimicrobial Agents y Chemotroapy, vol. 41, 2001, página 409, se conoce una detección rápida de VRE por PCR tiempo real basado en fluorescencia. Los pares cebadores PCR *vanA*- y *vanB*-específico se designaron y combinaron para utilizar en un ensayo múltiple. Dos sondas balizas moleculares dirigidas a las regiones amplificadas respectivas de *vanA* y *vanB* se integraron en el ensayo múltiple por detección a tiempo real de VRE.

50 Grisold, A.J. *et al.*, Journal de Clinical Microbiology, vol. 40, no. 7, 2002, páginas 2392-2397 se relaciona con un ensayo molecular para la detección simultánea del gen *Staphylococcus aureus*-específico y el gen *mecA*. El ensayo se basa en un PCR a tiempo real se llevo a cabo con el dispositivo LightCycler, análisis de curvas de fluorescencia y la amplificación del gen *mecA* con una mezcla que contiene un grupo de cebadores dirigidos al gen *mecA* y un grupo de sondas.

55 Del manual técnico "LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes", Roche Diagnostics GmbH, 1999, se conocen los protocolos para descontaminación de PCR con uracilo-ADN glicosilasa (UDG).

WO 01/23604 A2 revela una secuencia nucleótido para la detección del gen de resistencia *vanA*.

WO 01/12803 A2 revela un cebador para la detección del gen *Enterococcus faecium vanA*.

60 De la base de datos EMBL, número de acceso M97297, se conoce la secuencia de ácido nucleico del gen *vanA*.

De la base de datos EMBL, números de acceso U72704 y U94528, se conocen las secuencias de codificación parcial del gen *Enterococcus faecalis vanB* y el gen *Enterococcus faecium vanB*.

65 **Resumen**

La invención provee para los métodos de identificación de enterococos resistentes a la vancomicina en una muestra biológica. Los cebadores y sondas para la detección de ácidos nucleicos que codifican *vanA*, *vanB*, o *vanB-2 /3* son

proporcionadas por la invención, como son kits que contienen tales cebadores y sondas. Los métodos de la invención pueden ser utilizados para identificar rápidamente los ácidos nucleicos a partir de enterococos resistentes a la vancomicina de las muestras. Utilizando cebadores y sondas específicos, los métodos incluyen la amplificación y el monitoreo del desarrollo de productos de amplificación específicos utilizando PCR a tiempo real.

5

En un aspecto de la invención, se proporciona un método para la detección de la presencia o ausencia de uno o más enterococos resistentes a la vancomicina en una muestra biológica de un individuo. El método para detectar enterococos resistentes a vancomicina incluye la realización de al menos una etapa de ciclado, que incluye una etapa de amplificación y una etapa de hibridación según se define en la reivindicación 1. La etapa de amplificación incluye el contacto de la muestra con un par de cebadores *vanA* para producir un producto de amplificación, si una molécula de ácido nucleico *vanA* esta presente en la muestra. La etapa de hibridación incluye el contacto de la muestra con un par de sondas *vanA*. Generalmente, los miembros del par de sondas *vanA* hibridizan al producto de amplificación dentro de no más de cinco nucleótidos del uno al otro. Una primera sonda *vanA* del par de sondas *vanA* es típicamente marcada con una fracción donador fluorescente y una segunda sonda *vanA* del par de sondas *vanA* es típicamente marcada con una fracción aceptor fluorescente correspondiente. El método además incluye la detección de la presencia o ausencia de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) entre la fracción donador fluorescente de la primera sonda *vanA* y la fracción aceptor fluorescente de la segunda sonda *vanA*. La presencia de FRET es usualmente indicativa de la presencia de uno o más enterococos resistentes a la vancomicina en la muestra biológica, mientras la ausencia de FRET es usualmente indicativa de la ausencia de enterococos resistentes a la vancomicina en la muestra biológica.

20

Alternativa o adicionalmente, la etapa de amplificación puede incluir el contacto la muestra con un par de cebadores *vanB* para producir un producto de amplificación *vanB*, si una molécula de ácido nucleico *vanB* está presente en la muestra. La etapa de hibridación incluye el contacto de la muestra con un par de sondas *vanB*. Generalmente, los miembros del par de sondas *vanB* hibridizan al producto de amplificación dentro de no más de cinco nucleótidos del uno al otro. Una primera sonda *vanB* del par de sondas *vanB* es típicamente marcada con una fracción donador fluorescente y una segunda sonda *vanB* del par de sondas *vanB* es típicamente marcada con una fracción aceptor fluorescente correspondiente. El método además incluye la detección de la presencia o ausencia de FRET entre la fracción donador fluorescente de la primera sonda *vanB* y la fracción aceptor fluorescente de la segunda sonda *vanB*. La presencia de FRET usualmente indica la presencia de uno o más enterococos resistentes a la vancomicina en la muestra biológica, y la ausencia de FRET usualmente indica la ausencia de enterococos resistentes a la vancomicina en la muestra biológica.

25

30

Un par de cebadores *vanA* incluye un primer cebador *vanA* y un segundo cebador *vanA*. El primer cebador *vanA* puede incluir la secuencia 5'-CGA GGA CGG ATA CAG GA-3' (SEQ ID NO: 1), y el segundo cebador *vanA* puede incluir la secuencia 5'-CTT ATC ACC CCT TTA ACG C-3' (SEQ ID NO: 2). Una primera sonda *vanA* puede incluir la secuencia 5'-CAA GAT AAC GGC CGC ATT GTA CTG AAC GA-3' (SEQ ID NO:3), y la segunda sonda *vanA* puede incluir la secuencia 5'-GTC AAT ACT CTG CCC GGT TTC AC-3' (SEQ ID NO:4).

35

Un par de cebadores *vanB/vanB-2 /3* generalmente incluye un primer cebador *vanB/vanB-2 /3* y un segundo cebador *vanB/vanB-2/3*. Un primer cebador *vanB vanB-2 /3* puede incluir la secuencia 5'-GAA GAT ACC GTG GCT CA-3' (SEQ ID NO:5), y el segundo cebador *vanB/vanB-2 /3* puede incluir la secuencia 5'-GTA CGG AAG AAC TTA ACG CT-3' (SEQ ID NO: 6). Una primera sonda *vanB/vanB-2 /3* puede incluir la secuencia 5'-GAT CCA CTT CGC CGA CAA-3' (SEQ ID NO:7), y la segunda sonda *vanB/vanB-2 /3* puede incluir la secuencia 5'-AAA TCA TCC TCG TTT CCC AT-3' (SEQ ID NO:8).

40

45

Los miembros del par de sondas *vanA* o sondas *vanB/vanB-2 /3* pueden hibridizar entre no más de dos nucleótidos del uno al otro, o pueden hibridizar entre no más de un nucleótido del uno al otro. Una fracción representativa donador fluorescente es fluoresceína, y fracciones aceptor fluorescente correspondientes incluyen LC-Red 640, LC-Red 705, Cy5, y Cy5.5. Adicionales fracciones donador y aceptor fluorescente correspondientes se conocen en el oficio.

50

En un aspecto, la etapa de detección incluye la excitación de la muestra biológica a una absorción de longitud de onda por la fracción donador fluorescente y la visualización y/o medida de la longitud de onda emitida por la fracción aceptor fluorescente (i.e., la visualización y/o medida FRET). En otro aspecto, la detección comprende la cuantificación de FRET. En otro aspecto, la etapa de detección puede llevarse a cabo después de cada etapa de ciclado (i.e., en tiempo real).

55

Generalmente, la presencia de FRET dentro de 50 ciclos (por ejemplo, 30, o 40, ciclos) indica la presencia de uno o más enterococos resistentes a la vancomicina en el individuo. En adición, la determinación de la temperatura de fusión entre uno o ambas de la(s) sonda(s) *vanA*(s) y el producto de amplificación confirma la presencia o la ausencia de un enterococos resistente a vancomicina, mientras la determinación de la temperatura de fusión entre uno o ambas de la(s) sonda(s) *vanB/vanB-2 /3* y el producto *vanB/vanB-2 /3* de amplificación también confirma la presencia o la ausencia del enterococos resistente a vancomicina particular.

60

Muestras biológicas representativas incluyen hisopo anal o perirrectal, muestras de deposición, sangre, y fluidos corporales. Los métodos descritos arriba pueden además incluir la prevención, amplificación de un ácido nucleico contaminante. La prevención de la amplificación de un ácido nucleico contaminante puede incluir la realización de la

65

etapa de amplificación en la presencia de uracilo y el tratamiento de la muestra biológica con uracilo-ADN glicosilasa antes de la amplificación.

En adición, la etapa de ciclado puede llevarse a cabo sobre una muestra control. Una muestra control puede incluir una molécula de ácido nucleico *vanA*, *vanB*, o *vanB-2 /3*. Alternativamente, una muestra control puede incluir una molécula de ácido nucleico a parte de una molécula de ácido nucleico *vanA*, *vanB* o *vanB-2 /3*. Las etapas de ciclado pueden llevarse a cabo sobre tal muestra control utilizando un par de cebadores control y un par de sondas control. Los cebadores control y las sondas control son aparte de los cebadores y sondas *vanA* o *vanB/vanB- 2/3*. Una o más de las etapas de amplificación pueden producir un producto de amplificación control. Cada una de las sondas control hibridiza al producto de amplificación control.

En otro aspecto de la invención, se proporcionan artículos de producción.

Los artículos de producción de la invención según se define en las reivindicaciones 21 a 23, 26 y 27 pueden además o alternativamente incluir un par de cebadores *vanB/vanB-2 /3*; un par de sondas *vanB/vanB-2 /3*; y una fracción donador fluorescente y una fracción aceptor fluorescente correspondiente. Por ejemplo, el primer cebador *vanB/vanB-2 /3* proporcionado en un kit de la invención puede incluir la secuencia 5'-gala GAT ACC GTG GCT CA-3' (SEQ ID NO: 5), y el segundo cebador *vanB/vanB-2 /3* puede incluir la secuencia 5'-GTA CGG AAG AAC TTA ACG CT-3' (SEQ ID NO: 6). La primera sonda *vanB/vanB-2 /3* proporcionada en un kit de la invención puede incluir la secuencia 5'-GAT CCA CTT CGC CGA CAA-3' (SEQ ID NO: 7), y la segunda sonda *vanB/vanB-2 /3* puede incluir la secuencia 5'-AAA TCA TCC TCG TTT CCC AT-3' (SEQ ID NO: 8).

Los artículos de la invención pueden incluir fracciones fluorofóricas para la marcación de las sondas, o sondas ya marcadas con fracciones aceptor fluorescente y donador correspondientes. El artículo de producción también puede incluir una etiqueta de empaque o instrucciones de empleo que tienen las indicaciones en este para el uso del par de cebadores *vanA* y el par de sondas *vanA* para detectar la presencia o ausencia de uno o más enterococos resistentes a la vancomicina en una muestra biológica, o para el uso del par de cebadores *vanB/vanB-2 /3* y el par de sondas *vanB/vanB-2 /3* para detectar la presencia o ausencia de uno o más enterococos resistentes a la vancomicina en una muestra biológica.

En un aspecto, la amplificación puede emplear una enzima polimerasa que tiene actividad exonucleasa 5' a 3'. De esa manera, las fracciones donador fluorescente y aceptor estaría dentro de más de 5 nucleótidos del uno al otro cerca de la longitud de la sonda. En otro aspecto, la sonda *vanA* incluye una secuencia de ácido nucleico que permite la formación de la estructura secundaria. Tal formación de estructura secundaria generalmente resulta en una proximidad espacial entre la fracción aceptor fluorescente y la fracción donador. De acuerdo con este método, la fracción aceptor fluorescente es un apaciguador.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en esta tienen el mismo significado como comúnmente se entiende por alguien de ordinaria habilidad en el oficio al que esta invención pertenece. A pesar de que los métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos pueden ser usados en la práctica o en las pruebas de la presente invención, métodos y materiales apropiados se describen abajo. En adición, los materiales, métodos, y ejemplos únicamente son ilustrativos y no pretenden ser limitantes. En caso de conflicto, la presente especificación, inclusive las definiciones, controlará.

Los detalles de uno o más modalidades de la invención son publicados en la compañía de los dibujos y la descripción abajo. Otras características, objetos, y ventajas de la invención se apreciarán en los dibujos y detalles de la descripción, y a partir de las reivindicaciones.

Descripción de los dibujos

Figura 1 es una alineación de las secuencias de ácido nucleico *vanA*.

Figura 2 es una alineación de las secuencias de ácido nucleico *vanB*.

Descripción detallada

Un ensayo PCR a tiempo real, que es más sensible que los ensayos existentes, se describe en esta para la detección de enterococos resistentes a vancomicina en una muestra biológica tal como una muestra fecal. Los cebadores y sondas para la detección de ácidos nucleicos *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2 /3* se proporcionan por la invención, como son artículos de producción que contienen tales cebadores y sondas. El ensayo para enterococos resistentes a la vancomicina se diseñó para discriminar entre los genotipos *vanA*, *vanB* y *vanB-2 /3* basados en una diferencia en la temperatura de fusión entre un par de sondas *vanA* y un par de sondas *vanB*. El incremento de la sensibilidad del ensayo PCR a tiempo real para la detección de ácidos nucleicos de enterococos resistentes a la vancomicina comparado con otros métodos, así como las características mejoradas de PCR a tiempo real incluyendo la contención de la muestra y el tiempo real de detección del producto amplificado, hace factible la implementación de esta tecnología para laboratorio clínico rutinario para la detección de enterococos resistentes a la vancomicina.

El tiempo total para el proceso de una muestra utilizando el ensayo *Enterococcus* resistente a la vancomicina LightCycler™ es menor de 3 horas comparado con 4-7 días para la detección por el cultivo acostumbrado. La invención tiene el potencial para reemplazar los métodos de cultivo estándar que requieren de medios exclusivos, pruebas bioquímicas, y pruebas de susceptibilidad y por consiguiente, resulta en ahorro de costos para las instituciones. Dado que los clínicos reciben un único resultado de la prueba dentro de pocas horas, los procedimientos de aislamiento apropiados y la terapia antimicrobiana pueden ser casi inmediatamente. El ensayo PCR a tiempo real de *Enterococcus* resistente a la vancomicina rápido permite a los hospitales tomar las precauciones necesarias con pacientes infectados con enterococos resistentes a la vancomicina de tal manera que la diseminación del enterococos resistentes a la vancomicina a otros pacientes se previene.

Enterococcus spp

Los *Enterococcus spp* tienen la característica de ser resistentes a muchos agentes antimicrobianos, que hacen de ellos formidables agentes patógenos y limita las opciones terapéuticas disponibles para los clínicos. Todos los enterococos son intrínsecamente resistentes a un número de antibióticos y exhiben niveles bajos de resistencia a los agentes β -lactámicos, los aminoglucósidos, y las lincosamidas. Ellos han adquirido genes de resistencia a todos los agentes antimicrobianos conocidos, incluyendo los glicopéptidos vancomicina y teicoplanina. Una de las preocupaciones es la posibilidad de que los genes resistentes a la vancomicina se puedan transferir a otros organismos Gram-positivos, especialmente *Staphylococcus aureus*.

Una alineación BLAST de las secuencias *vanA* no encontró otros organismos que contengan secuencias similares a *vanA*. Una alineación BLAST de las secuencias *vanB* mostró que las secuencias *vanB* se pueden encontrar en *Enterococcus spp.* y animal s ies (cría de ternera) de estreptococo tal como *S. gallolyticus* y *S. infantarius* (GenBank Accesos Nos. AY035705 y Z70527). Otro aislado, *S. bovis*, también tiene las secuencias que muestran homología a las secuencias *vanB*. Estos aislados de estreptococos aparecen haber adquirido genes de resistencia a vancomicina enterococcal *vanB*.

El enterococo resistente a la vancomicina muestra óptimo crecimiento a 35°C y crecerá en 6.5% de NaCl. Los enterococos resistentes a la vancomicina están capacitados para hidrolizar la esculina. Los enterococos resistentes a la vancomicina son selectivamente cultivados sobre agar Enterococosele que contiene 8 $\mu\text{g/ml}$ de vancomicina. La resistencia del glicopéptido de enterococos resistentes a la vancomicina tiene tres diferentes fenotipos. *vanA* es el fenotipo aislado más frecuentemente con altos niveles de resistencia a vancomicina y teicoplanina. Los fenotipos *vanB* (por ejemplo, *vanB*, o *vanB-2/3*) tienen resistencia a la vancomicina variable y son susceptibles a la teicoplanina. El fenotipo *vanC* tiene niveles bajos de resistencia a la vancomicina y es susceptible a la teicoplanina y por consiguiente es menos importante para la detección por un laboratorio clínico.

Los ensayos PCR-RFLP seguidos por la digestión de restricción MspI se pueden utilizar para diferenciar el genotipo *vanA* a partir del genotipo *vanB*. Las cepas *vanA* típicamente muestran un alto nivel de resistencia a la vancomicina (concentración inhibitoria mínima (MIC) > 64 $\mu\text{g/ml}$). Las cepas *vanA* también muestran inducible resistencia a la vancomicina y teicoplanina. Los genes que codifican *vanA* se localizan sobre un gen móvil transposon o un plásmido, y son fácilmente transferidos por conjugación. La primera cepa *vanA* de enterococos resistentes a la vancomicina se reportó en 1986, y representa aproximadamente el 70% de enterococos resistentes a la vancomicina aislados a partir de muestras de pacientes. Por otra parte, las cepas *vanB* muestran resistencia variable a la vancomicina (MIC 4 a > 1024 $\mu\text{g/ml}$), y muestran resistencia inducible a la vancomicina únicamente. Los genes que codifican *vanB* son cromosómicos y se pueden transferir por conjugación. Las cepas *vanB* primero se identificaron en la U.S. en 1987, y actualmente constituye aproximadamente el 25% de la resistencia a la vancomicina en pacientes aislados.

Ácidos nucleicos y oligonucleótidos de enterococos resistentes a la vancomicina

La invención provee los métodos para detectar ácidos nucleicos *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2/3* por amplificación, por ejemplo, moléculas de ácido nucleicos correspondientes a una porción de *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2/3*. Las moléculas de ácido nucleicos aparte de aquellas ejemplificadas en esta (por ejemplo, aparte de *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2/3*) también se pueden usar para detectar enterococos resistentes a la vancomicina en una muestra y se conocen por aquellos de habilidad en el oficio. Las secuencias de ácido nucleico *vanA*, *vanB*, y *vanB-2/3* han sido descritas (ver, por ejemplo, GenBank Acceso Nos. M97297, U94528, y U72704). Específicamente, los cebadores y sondas para amplificar y detectar ácidos nucleicos de *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2/3* se proporcionan por la invención.

Los cebadores que amplifican una molécula de ácido nucleico *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2/3*, por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican una porción de *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2/3*, se pueden designar utilizando, por ejemplo, un programa de ordenador tal como OLIGO (Molecular Biology Insights Inc., Cascade, CO). Las características importantes cuando se designan los oligonucleótidos para ser usados como cebadores de amplificación incluyen, pero no limitan a, un producto de amplificación de tamaño apropiado para facilitar la detección (por ejemplo, por electroforesis), temperaturas de fusión similares para los miembros de un par de cebadores, y la longitud de cada cebador (i.e., los cebadores necesitan tener el largo suficiente para fijación con la especificidad de la secuencia e iniciar la síntesis pero no así de alargado que la fidelidad se reduce durante la síntesis del oligonucleótido). Típicamente, los cebadores oligonucleótido tienen 8 a 50 nucleótidos de longitud (por ejemplo, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, o 50 nucleótidos de longitud). “cebadores *vanA*”, “cebadores *vanB*”, o “cebadores *vanB2/3*”

ES 2 269 890 T3

como se utiliza en esta se refiere a los cebadores oligonucleótido que fijación a las secuencias de ácido nucleico *vanA*, *vanB*, y/o *vanB2/3*, respectivamente, e iniciar la síntesis de esto bajo condiciones apropiadas.

El diseño de oligonucleótidos para utilizarse como sondas de hibridización puede llevarse a cabo de manera similar al diseño de cebadores, a pesar de que los miembros de un par de sondas preferiblemente fijación a un producto de amplificación dentro de no más de 5 nucleótidos del uno al otro sobre la misma cadena tal que la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) pueda ocurrir (por ejemplo, dentro de no más de 1, 2, 3, o 4 nucleótidos del uno al otro). Este grado mínimo de separación típicamente trae las respectivas fracciones fluorescentes en una proximidad suficiente tal que FRET ocurra. Se debe entender, sin embargo, que otras distancias de separación (por ejemplo, 6 o más nucleótidos) son posibles a condición de que las fracciones fluorescentes estén posicionadas apropiadamente relativas a cada otra (por ejemplo, con un brazo conector) tal que FRET pueda ocurrir. En adición, las sondas se pueden diseñar para hibridizar a los blancos que contienen una mutación o polimorfismo, por consiguiente permite la detección diferencial de enterococos resistentes a la vancomicina basada en la hibridización absoluta de diferentes pares de sondas correspondientes a cada enterococo particular para ser distinguido o temperaturas de fusión diferencial entre, por ejemplo, miembros de un par de sondas y cada producto de amplificación generado a partir de un enterococo resistente a la vancomicina. Como con cebadores oligonucleótido, las sondas oligonucleótido usualmente tienen temperaturas de fusión similares, y la longitud de cada sonda debe ser suficiente para que la hibridización secuencia-específico ocurra pero no tan larga que la fidelidad se reduzca durante la síntesis. Las sondas oligonucleótido típicamente tienen de 8 a 50 nucleótidos de longitud (por ejemplo, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, o 50 nucleótidos de longitud). "sondas *vanA*" como se utiliza en esta se refiere a las sondas oligonucleótido que específicamente fijación a los productos de amplificación *vanA*. Como se utiliza en esta, "sondas *vanB/vanB-2/3*" se refiere a sondas oligonucleótido que fijación a *vanB* o *vanB-2/3*, que se pueden diferenciar basadas en la temperatura de fusión de las sondas *vanB/ vanB-2 /3* con el respectivo producto de amplificación (i.e., *vanB* o *vanB-2 /3*).

Las construcciones de la invención incluyen vectores que contienen una molécula de ácido nucleico *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2/3*, por ejemplo, un gen *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2/3*, o un fragmento de estos. Las construcciones se pueden utilizar, por ejemplo, como plantilla control de ácidos nucleicos. Los vectores apropiados para utilizar en la presente invención son comercialmente disponibles o se pueden producir por métodos rutinarios en el oficio de tecnología de ADN recombinante. Una molécula de ácido nucleico *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2/3* se puede obtener, por ejemplo, por síntesis química, clonación directa a partir de un enterococo resistente a la vancomicina, o por amplificación PCR. Una molécula de ácido nucleico de *Enterococcus* resistente a la vancomicina o fragmentos de este se pueden manejar ligado a un promotor u otro elemento regulador tal como una secuencia potenciadora, un elemento de respuesta o un elemento inducible que modula la expresión de la molécula de ácido nucleico *Enterococcus*. Como se utiliza en esta, ligado de manera operable se refiere a la conexión de un promotor y/o otros elementos reguladores a una molécula de ácido nucleico *Enterococcus* de tal manera que permita y/o regule la expresión de la molécula de ácido nucleico. Un promotor que normalmente no dirige la expresión de *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2 /3* se puede utilizar para conducir la transcripción de una molécula de ácido nucleico *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2 /3* utilizando, por ejemplo una polimerasa viral, una polimerasa bacteriana, o una polimerasa ARN eucariota. De manera alterna, un promotor nativo *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2/3* se puede utilizar para conducir la transcripción de una molécula de ácido nucleico *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2 /3* utilizando, por ejemplo, una polimerasa ARN *E. coli* o una polimerasa ARN huésped. En adición, ligado de manera operable se puede referir a una conexión apropiada entre un promotor *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2 /3* u otro elemento regulador a una secuencia heteróloga codificada (i.e., una secuencia codificada no-*vanA*, -*vanB*, y/o -*vanB-2/3*, por ejemplo un gen reportero) de tal manera para permitir la expresión de la secuencia heteróloga codificada.

Las construcciones apropiadas para utilizar en los métodos de la invención típicamente incluyen, en adición a una molécula de ácido nucleico *vanA*, *vanB*, y/o *vanB 2 /3*, las secuencias que codifican un marcador genético (por ejemplo, un gen con resistencia a antibióticos) para la selección se construcciones y/o transformantes deseados, y un origen de replicación. La selección de un sistema vector usualmente depende de varios factores, incluyendo, pero no limitando a, la selección de células huésped, eficiencia de replicación, capacidad seleccionable, inducible, y la facilidad de la recuperación.

Las construcciones de la invención que contienen una molécula de ácido nucleico *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2/3* se pueden propagar en una célula huésped. Como se utiliza en esta, el término célula huésped se entiende que incluye procariontes y eucariotas. Las procariontes huésped pueden incluir *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* y *Bacillus subtilis*. Las eucariotas huésped incluyen levaduras tal como *S. cerevisiae*, *S. pombe*, y *Pichia pastoris*, células de mamífero tal como células COS o células de ovario de hamster Chino (CHO), células de insecto, y células de plantas tal como *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum*. Una construcción de la invención se puede introducir en una célula huésped utilizando cualquiera de las técnicas comúnmente conocidas por aquellos de ordinaria habilidad en el oficio. Por ejemplo, precipitación de fosfato de calcio, electroporación, tes de choque térmico, lipofección, microinyección, y transferencia de ácido nucleico viral-mediado son métodos comunes para la introducción de ácidos nucleicos en células huésped. En adición, El ADN desnudo se puede entregar directamente a las células (ver, por ejemplo, Patente U.S. Nos. 5, 580,859 y 5, 589,466).

65 *Reacción en cadena de polimerasa (PCR)*

La Patente U.S. Nos. 4, 683,202, 4, 683,195, 4, 800,159, y 4, 965,188 revela técnicas PCR convencionales. Una PCR típicamente emplea dos oligonucleótido cebadores que se unen a una plantilla de ácido nucleico seleccionada

(por ejemplo, ADN o ARN). Los cebadores útiles en la presente invención incluyen oligonucleótidos capaces de actuar como puntos de iniciación de la síntesis de ácido nucleico dentro de una secuencia de ácido nucleico de enterococos resistentes a la vancomicina. Un cebador se puede purificar a partir de una digestión de restricción por métodos convencionales, o se puede producir sintéticamente. Un cebador es preferiblemente monocatenario para una eficiencia máxima en amplificación, pero un cebador puede ser bicatenario. Los cebadores bicatenarios primero son desnaturalizados, i.e., tratados para separar las cadenas. Un método de desnaturalización de ácidos nucleicos bicatenarios es por calentamiento.

El término “polimerasa termoestable” se refiere a una enzima polimerasa que es estable al calor, i.e., la enzima cataliza la formación de productos de extensión del cebador complementario a una plantilla y no se desnaturaliza irreversiblemente cuando se somete a temperaturas elevadas por el tiempo necesario para efectuar la desnaturalización de la plantilla de ácidos nucleicos bicatenarios. Generalmente, la síntesis se inicia en el terminal 3’ de cada cebador y continúa en la dirección 5’ a 3’ a lo largo de la plantilla de la cadena de ADN. Las polimerasas termoestables han sido aisladas de *Thermus flavus*, *T. ruber*, *T. thermophilus*, *T. aquaticus*, *T. lacteus*, *T. rubens*, *Bacillus stearotromophilus*, y *Methanotromus fervidus*. No obstante, las polimerasas que no son termoestables también se pueden emplear en la PCR a condición de que la enzima se surta de nuevo.

Si la plantilla de ácido nucleico es bicatenaria, es necesario separar las dos cadenas antes de que se pueda utilizar como un plantilla en PCR. La separación de la cadena se puede acompañar por cualquier método de desnaturalización apropiado incluyendo medios físicos, químicos o enzimáticos. Un método de separación de las cadenas de ácido nucleico involucra el calentamiento del ácido nucleico hasta que este sea predominantemente desnaturalizado (por ejemplo, desnaturalizado más del 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95%). Las condiciones de calentamiento necesarias para la desnaturalización de la plantilla de ácido nucleico dependerán, por ejemplo, de la concentración de la sal de la solución reguladora y la longitud y composición del nucleótido de los ácidos nucleicos que son desnaturalizados, pero típicamente fluctúa desde aproximadamente 90°C a aproximadamente 105°C durante un tiempo que depende de las características de la reacción, tal como la temperatura y la longitud del ácido nucleico. La desnaturalización típicamente se llevo a cabo durante aproximadamente 0 seg a 4 min.

Si el ácido nucleico bicatenario se desnaturaliza por calor, la mezcla de reacción se deja enfriar a una temperatura que estimula fijación de cada cebador a su secuencia blanco en el ácido nucleico de enterococos resistentes a la vancomicina. La temperatura para la fijación usualmente es desde aproximadamente 35°C a aproximadamente 65°C. La mezcla de reacción luego se ajusta a una temperatura a la cual la actividad de la polimerasa se promueve u optimiza, por ejemplo, una temperatura suficiente para que la extensión ocurra desde el fija al cebador para generar los productos complementarios a la plantilla ácido nucleico. La temperatura debería ser suficiente para sintetizar una producto de extensión de cada cebador que se fija a una plantilla de ácido nucleico, pero no debería ser tan alta como para desnaturalizar un producto de extensión desde su plantilla complementaria. La temperatura generalmente oscila desde aproximadamente 40°C a 80°C.

Los ensayos PCR pueden emplear un plantilla de ácido nucleico tal como ADN o ARN, incluyendo ARN mensajero (mARN). La plantilla de ácido nucleico no necesita ser purificada; esta puede tener una fracción menor de una mezcla compleja, tal como ácido nucleico de *Enterococcus* resistente a la vancomicina contenido en células humanas. El ADN o ARN se puede extraer de cualquier muestra biológica tal como deposición, hisopos anal o perirrectal, o fluidos corporales (por ejemplo, sangre u orina) mediante técnicas rutinarias tales como aquellas descritas en Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications (Persing *et al.* (eds), 1993, American Society for Microbiology, Washington D.C). Los ácidos nucleicos *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2/3* para ser utilizados como controles se pueden obtener de cualquier número de fuentes, tal como plásmidos, o fuentes naturales incluyendo bacterias, levaduras, virus, organelos, u organismos más grandes tales como plantas o animales.

Los cebadores oligonucleótido se combinaron con otros reactivos PCR bajo las condiciones de reacción que inducen la extensión del cebador. Por ejemplo, reacciones de extensión en cadena generalmente incluyen KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8.3), MgCl₂ 1.5 mM, 0.001% (w/v) de gelatina, 0.5-1.0 µg de plantilla de ADN desnaturalizada, 50 pmoles de cada oligonucleótido cebador, 2.5 U de Taq polimerasa, y 10% de DMSO. Las reacciones usualmente contienen 150 a 320 µM cada de dATP, dCTP, dTTP, dGTP, o uno o más análogos de estos. En ciertas circunstancias, 300 a 640 µM de dUTP pueden ser sustituidos por dTTP en la reacción.

Las cadenas sintetizadas recientemente a partir de una molécula bicatenaria que se pueden utilizar en las etapas que suceden en la reacción. Las etapas de separación en cadena, fijación, y la elongación se pueden repetir cuando se necesite para producir la deseada cantidad de amplificación de los productos correspondientes a la molécula de ácido nucleico de enterococos resistentes a la vancomicina blanco. Los factores limitantes en la reacción son las cantidades de cebadores, la enzima termoestable, y los trifosfatos nucleosidos presentes en la reacción. Las etapas de ciclado (i.e., amplificación e hibridización) preferiblemente se repiten al menos una vez. Para utilizar en la detección, el número de etapas de ciclado dependerá, por ejemplo, de la naturaleza de la muestra. Si la muestra es una mezcla compleja de ácidos nucleicos, pueden ser requeridas más etapas de ciclado para amplificar suficiente la secuencia blanco para la detección. Generalmente, las etapas de ciclado se repiten al menos aproximadamente 20 veces, pero se pueden repetir tanto como 40, 60, o aún 100 veces.

Energía de Transferencia por resonancia de fluorescencia (FRET)

La tecnología FRET (ver, por ejemplo, Patente U.S. Nos. 4, 996,143, 5, 565,322, 5, 849,489, y 6, 162,603) se basa en el hecho de que cuando un donador y una fracción aceptor fluorescente correspondiente se sitúan dentro de una cierta distancia uno del otro, la energía de transferencia tiene lugar entre las dos fracciones fluorescentes que pueden ser visualizadas o de otra manera detectadas y/o cuantificadas. Como se utiliza en esta, dos sondas de oligonucleótidos, cada una conteniendo una fracción fluorescente, puede hibridizar a un producto de amplificación en posiciones particulares determinadas por la complementariedad de las sondas oligonucleótido para secuencia de ácido nucleico blanco de los enterococos resistentes a la vancomicina. Una señal FRET se genera, bajo la hibridización de las sondas oligonucleótido del producto de amplificación en las posiciones apropiadas.

El análisis fluorescente se puede llevar a cabo utilizando, por ejemplo, un sistema de microscopio epifluorescente de contador de fotón (que contiene el apropiado espejo dicróico y filtros para el monitoreo de emisión fluorescente en un rango particular), un sistema fotomultiplicador con contador de fotón o un fluorómetro. La excitación para iniciar la energía de transferencia se puede llevar a cabo con un láser de argón ionizado, una lámpara de arco de mercurio (Hg) de alta intensidad, una fuente de luz de fibra óptica, u otra fuente de luz de alta intensidad apropiadamente filtrada por excitación en el rango deseado.

Como se utiliza en esta con respecto a un donador y a las fracciones fluorescentes aceptor correspondientes, "correspondiente" se refiere a una fracción aceptor fluorescente que tiene un espectro de emisión que traslapa el espectro de excitación de la fracción donador fluorescente. La longitud de onda máxima del espectro de emisión de la fracción aceptor fluorescente preferiblemente debería ser al menos 100 nm mayor que la longitud de onda máxima del espectro de excitación de la fracción donador fluorescente. Por consiguiente, la transferencia de energía eficiente no-radiactiva se puede producir entre ellos.

Las fracciones donador y aceptor fluorescentes correspondientes generalmente se seleccionan por (a) transferencia de energía Förster de alta eficiencia; (b) un cambio Stokes final grande (> 100 nm); (c) cambio de la emisión hasta el punto posible en la porción roja del espectro visible (> 600 nm); y (d) cambio de la emisión a una longitud de onda mayor que la de la emisión fluorescente del agua Raman producida por la excitación en la longitud de onda de excitación del donador. Por ejemplo, una fracción donador fluorescente se puede seleccionar para que tenga su excitación máxima cerca a la línea de láser (por ejemplo, Helio-Cadmio 442 nm o Argón 488 nm), un coeficiente de extinción alto, un límite cuántico alto, y un buen traslapo de su emisión fluorescente con el espectro de excitación de la fracción aceptor fluorescente correspondiente. Una fracción aceptor fluorescente correspondiente se puede seleccionar para que tenga un coeficiente de extinción alto, un límite cuántico alto, un buen traslapo de su excitación con la emisión de la fracción donador fluorescente, y emisión en la parte roja del espectro visible (>600 nm).

Las fracciones donador fluorescentes representativas que se pueden utilizar con varias fracciones aceptor fluorescente en la tecnología FRET incluye fluoresceína, amarillo de Lucifer, B-ficoeritrina, 9-acridineisotiocianato, Lucifer Yellow VS, 4-acetamido-4'-isotiocianatostilbene-2,2'-ácido disulfónico, 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina, succinimidil 1-pirenobutirato, y derivados 4-acetamido-4'-isotiocianatostilbene-2,2'-ácido disulfónico. Las fracciones aceptor fluorescente representativas, que dependen de la fracción donador fluorescente utilizada, incluye LCTM-Red 640, LCTM-Red 705, Cy5, Cy5.5, Lisamina rodamina B sulfonil cloruro, isocianato tetrametil de rodamina, rodamina x isotiocianato, eritrosina isotiocianato, fluoresceína, pentaacetato de dietilentiamina u otros quelatos de iones Lantánidos (por ejemplo, Europio, o Terbio). Las fracciones donador y aceptor fluorescentes se pueden obtener, por ejemplo, de Sondas Moleculares (Junction City, OR) o Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Las fracciones donador y aceptor fluorescente se pueden unir a la apropiada sonda oligonucleótido vía un brazo de enlace. La longitud de cada brazo de enlace puede ser importante, según los brazos de enlaces afectarán la distancia entre las fracciones donador y aceptor fluorescentes. La longitud de un brazo de enlace para los propósitos de la presente invención es la distancia en Angstroms (Å) del nucleótido base a la fracción fluorescente. En general, un brazo de enlace es desde aproximadamente 10 a aproximadamente 25 Å. El brazo de enlace puede ser de la clase descrita en WO 84/03285. WO 84/03285 también revela los métodos para unir los brazos de enlaces a los nucleótidos base particulares, y también para unir las fracciones fluorescentes a un brazo de enlace.

Una fracción aceptor fluorescente tal como un LCTM-Red 640-NHS-éster se puede combinar con C6-fosforamiditas (disponible de ABI (Foster City, CA) o Glen Research (Sterling, VA)) para producir, por ejemplo, LCTM-Red 640-fosforamidita. Con frecuencia se utilizan conectores para acoplar una fracción donador fluorescente tal como fluoresceína a un oligonucleótido incluidos los conectores tiourea (FITC-derivado, por ejemplo, fluoresceína-CPG's de Glen Research o ChemGene (Ashland, MA)), amida-conectores (fluoresceína-NHS-éster-derivado, tales como fluoresceína-CPG de BioGenex (San Ramon, CA)), o 3'-amino-CPG's que requiere el acoplamiento de una fluoresceína-NHS-éster después de la síntesis del oligonucleótido.

Detección de enterococos resistentes a la vancomicina

En el laboratorio del hospital, el cultivo rutinario para la detección de *Enterococcus* resistente a la vancomicina de deposiciones o hisopos anales utilizando un medio selectivo es un método confiable pero puede requerir hasta 4 - 7 días para la identificación. Los métodos de cultivo también demandan tiempo y son costosos para los laboratorios que realizan un gran número de muestras. Para la recuperación de enterococos resistentes a la vancomicina en el laboratorio,

ES 2 269 890 T3

se utiliza, un medio selectivo que contiene vancomicina a una concentración de 8 µg/ml en agar. Este medio también contiene bilis esculina, que se hidroliza para dar un color negro-marrón a las colonias *Enterococcus*. La identificación de colonias sospechosas y pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se llevaron a cabo sobre *Enterococcus* spp., lo cual también puede tomar varios días para realizarse.

5

La invención proporciona los métodos para la detección de la presencia o ausencia de uno o más enterococos resistentes a la vancomicina en una muestra biológica de un individuo. Métodos suministrados por la invención evitan los problemas de contaminación de la muestra, falsos negativos y falsos positivos. Los métodos incluyen la realización de al menos una etapa de ciclado que incluye la amplificación y la hibridización. Una etapa de amplificación incluye el contacto de la muestra biológica con un par de cebadores *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2 /3* para producir un producto de amplificación, si las moléculas de ácido nucleico de uno o más enterococos resistentes a la vancomicina están presentes en la muestra. Cada uno de los cebadores *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2 /3* fijaciones a un blanco dentro o adyacente a una molécula de ácido nucleico *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2 /3*, respectivamente, tal que al menos una porción del producto de amplificación contiene la secuencia de ácido nucleico correspondiente al respectivo ácido nucleico de enterococos resistentes a la vancomicina, y, más apreciablemente, tal que el producto de amplificación contiene las secuencias de ácido nucleico que son complementarias a las sondas *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2 /3*. Una etapa de hibridización incluye el contacto de la muestra con un par de sondas *vanA*, *vanB*, y/o *vanB2/3*. Generalmente, los miembros del par de sondas *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2 /3* hibridizan al apropiado producto de amplificación dentro de no más de cinco nucleótidos del uno al otro. De acuerdo con la invención, una primera sonda *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2 /3* del par de sondas *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2 /3*, respectivamente, se marca con una fracción donador fluorescente y una segunda sonda *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2/3* del par de sondas *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2 /3*, respectivamente, se marca con una fracción aceptor fluorescente correspondiente. El método además incluye detección de la presencia o ausencia de FRET entre la fracción donador fluorescente de la primera sonda *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2 /3* y la fracción aceptor fluorescente correspondiente de la segunda sonda *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2 /3*. Múltiples etapas de ciclado pueden llevarse a cabo, preferiblemente en un termociclador. Los métodos descritos arriba para detección de *Enterococcus* resistente a la vancomicina en una muestra biológica utilizando cebadores y sondas dirigidos hacia *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2 /3* también puede llevarse a cabo utilizando otras sondas y cebadores de gen-específico de *Enterococcus* resistente a la vancomicina.

Como se utiliza en esta, “la amplificación” se refiere a los procesos de sintetización de moléculas de ácido nucleico que son complementarias a una o ambas cadenas de una plantilla de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico de *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2/3*). La amplificación de una molécula de ácido nucleico típicamente incluye desnaturalización de la plantilla de ácido nucleico, fijación de cebadores a la plantilla de ácido nucleico a una temperatura que está debajo de las temperaturas de fusión de los cebadores, y enzimáticamente la elongación de los cebadores para generar un producto de amplificación. Las etapas de desnaturalización, fijación y elongación cada una pueden llevarse a cabo una vez. Generalmente, sin embargo, las etapas desnaturalización, fijación y elongación se llevaron a cabo múltiples veces tal que la cantidad del producto de amplificación se incrementa, frecuentemente exponencialmente, a pesar de que la amplificación exponencial no se requiere mediante los métodos presentes. La amplificación típicamente requiere la presencia de deoxirribonucleótidos trifosfatos, una enzima polimerasa de ADN (por ejemplo, Platinum® Taq) y una solución reguladora apropiada y/o co-factores para actividad de la enzima polimerasa óptima (por ejemplo, MgCl₂ y/o KCl).

Si la amplificación del ácido nucleico de enterococos resistentes a la vancomicina ocurre y un producto de amplificación se produce, la etapa de hibridización resulta en una señal detectable basada en FRET entre los miembros del par de sondas. Como se utiliza en esta, “hibridización” se refiere a la fijación de sondas a un producto de amplificación. Las condiciones de hibridización típicamente incluyen una temperatura que está debajo de la temperatura de fusión de las sondas pero que evita la hibridización no-específica de las sondas.

Generalmente, la presencia de FRET indica la presencia de enterococos resistentes a la vancomicina en la muestra biológica, y la ausencia de FRET indica la ausencia de un enterococos resistentes a la vancomicina en la muestra biológica. La colección de la muestra inadecuada, retraso en el transporte, condiciones de transporte inapropiados, o el uso de cierta colección de hisopos (por ejemplo, alginato de calcio o un cubo de aluminio) son todas las condiciones que pueden afectar el éxito y/o exactitud del resultado de la prueba, sin embargo. Utilizando los métodos revelados en esta, la detección de FRET dentro de 45 etapas de ciclado es indicativo de uno o más enterococos resistentes a la vancomicina.

55

Muestras biológicas representativas que se pueden utilizar en la práctica de los métodos de la invención incluyen hisopos anales o perirrectal, muestras de deposiciones, sangre, o fluidos corporales. Los métodos de colección y almacenaje de muestra biológica se conocen por aquellos de habilidad en el oficio. Las muestras biológicas se pueden procesar (por ejemplo, por métodos estándar de extracción de ácido nucleico y/o el uso de kits comerciales) para liberar el ácido nucleico que codifica la resistencia a la vancomicina o, en algunos casos, la muestra biológica se contacta directamente con los componentes de la reacción PCR y los oligonucleótidos apropiados.

El análisis de la curva de fusión es una etapa adicional que puede ser incluida en un perfil de ciclado. El análisis de la curva de fusión se basa en el hecho de que el ADN se funde a una temperatura característica llamada la temperatura de fusión (T_m), que se define como la temperatura a la cual la mitad de los ADN duplex se han separado en cadenas sencillas. La temperatura de fusión de un ADN depende primariamente de su composición de nucleótido. De tal manera, las moléculas de ADN ricas en nucleótidos G y C tienen una T_m mayor que aquella que tiene una abundancia de los nucleótidos A y T. Mediante la detección de la temperatura a la cual, la señal se pierde, la temperatura de fusión

de sondas se puede determinar. De modo semejante, mediante la detección de la temperatura a la cual, la señal se genera, la temperatura de fijación de las sondas puede ser determinada. La(s) temperatura(s) de fusión(s) de las sondas *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2/3* del respectivo producto de amplificación, respectivamente, pueden confirmar la presencia de uno o más enterococos resistentes a la vancomicina en la muestra.

5 Dentro de cada corrida en el termociclador, muestras control también pueden ser cicladas. La plantilla de ácido nucleico control se puede amplificar a partir de una muestra control positiva (por ejemplo, plantilla diferente de *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2/3*) utilizando, por ejemplo, cebadores control y sondas control. Las muestras control positivas también se pueden utilizar para amplificar, por ejemplo, una construcción del plásmido que contiene una molécula de ácido nucleico de enterococos resistentes a la vancomicina. Tal plásmido control se puede amplificar internamente (por ejemplo, dentro de cada muestra biológica) o en corridas de muestras separadas lado a lado con las muestras de los pacientes. Cada corrida del termociclador también debería incluir un control negativo que, por ejemplo, carece de la plantilla de ácido nucleico de enterococos resistentes a la vancomicina. Tales controles son indicadores del éxito o la falla de la amplificación, hibridización, y/o reacción FRET. Por consiguiente, las reacciones control se pueden determinar con facilidad, por ejemplo, La capacidad de cebadores para fijación con la secuencia-especificidad e iniciar la elongación, así como la capacidad de las sondas para hibridizar con la secuencia-especificidad y para que FRET ocurra.

20 En una modalidad, los métodos de la invención incluyen etapas para evitar la contaminación. Por ejemplo, un método enzimático utilizando uracilo-ADN glicosilasa se describe en la Patente U.S. Nos. 5,035,996, 5,683,896 y 5,945,313 para reducir o eliminar la contaminación entre una corrida del termociclador y la siguiente. En adición, prácticas y procedimientos estándar de contención del laboratorio son deseables cuando se realizan los métodos de la invención. Las prácticas y procedimientos de contención incluyen, pero no limitan a, áreas de trabajo separadas para las diferentes etapas de un método, campana de contención, boquilla de pipeta como barrera filtro y pipetas dedicadas de desplazamiento de aire. Las prácticas y procedimientos de contención consistentes por el personal son deseables para la exactitud en la manipulación de muestras clínicas en un laboratorio de diagnóstico.

30 Los métodos PCR convencionales en conjunción con la tecnología FRET se pueden utilizar para practicar los métodos de la invención. En una modalidad, se utiliza un instrumento LightCycler™. Una descripción detallada del Sistema LightCycler™ y del tiempo real y en línea del monitoreo de PCR se puede encontrar en <http://biochem.roche.com/lightcycler>. Las siguientes aplicaciones de la patente describen un PCR a tiempo real como se utiliza en la tecnología LightCycler™: WO 97/46707, WO 97/46714 y WO 97/46712. El instrumento LightCycler™ es un termociclador rápido combinado con un fluorómetro de microvolumen utilizando ópticas de alta calidad. Esta técnica de termociclado rápido utiliza cubetas de vidrio delgado como recipientes de reacción. El calentamiento y enfriamiento de la cámara de reacción son controlados alternando el aire caliente y ambiente. Debido a la baja masa de aire y la alta relación del área superficial en el volumen de las cubetas, las tasas de intercambio de temperatura muy rápidas se pueden conseguir dentro de la cámara térmica del LightCycler™. La adición de tintes fluorescentes seleccionados para los componentes de reacción permite que el PCR sea monitoreado en tiempo real y en línea. Adicionalmente, las cubetas sirven como un elemento óptico para la colección de la señal (similar a fibra de vidrio ópticas), la concentración de la señal en la boquilla de las cubetas. El efecto es eficiente iluminación y monitoreo fluorescente de las muestras microvolumen.

45 El carrusel LightCycler™ que aloja las cubetas se puede retirar del instrumento. Por consiguiente, las muestras se pueden cargar fuera del instrumento (en un Recinto Limpio de PCR, por ejemplo). En adición, esta característica permite que el carrusel de la muestra se pueda limpiar y esterilizar fácilmente. El fluorómetro, como parte del equipo de LightCycler™, aloja la fuente de luz. La luz emitida se filtra y enfoca mediante unos lentes de epi-iluminación sobre la parte superior de las cubetas. La luz fluorescente emitida de la muestra luego se enfoca por los mismos lentes, pasados a través de un espejo dicroico, filtrada apropiadamente, y enfocada en recolección de datos fotohíbridos. La unidad óptica actualmente disponible en el instrumento LightCycler™ (Catálogo No. 2011 468) incluye tres filtros pasabanda (530 nm, 640 nm, y 710 nm), proporcionando una detección de tres-colores y varias opciones de adquisición de fluorescencia. Las opciones de colección de datos incluyen el monitoreo una vez por etapa de ciclado, adquisición de una sola-muestra completamente seguido por el análisis de la curva de fusión, seguido por el muestreo (en el cual la frecuencia de muestreo depende del número de muestra) y/o medida paso a paso de todas las muestras después de definido el intervalo de temperatura.

55 El LightCycler™ se puede operar utilizando un estación de trabajo PC y se utiliza un sistema operativo Windows NT. Las señales de las muestras se obtienen como las posiciones de la máquina de los vasos capilares secuencialmente sobre la unidad óptica. El software puede presentar las señales de fluorescencia en tiempo real inmediatamente después de cada medida. El tiempo de adquisición de fluorescencia es 10-100 msec. Después de cada etapa de ciclado, una pantalla de fluorescencia cuantitativa vs. El número de ciclo puede estar continuamente actualizado para todas las muestras. Los datos generados se pueden almacenar para un análisis posterior.

65 Un formato de tecnología FRET común utiliza dos sondas de hibridización. Cada sonda puede ser marcada con una fracción fluorescente diferente y las dos sondas generalmente se planean para hibridizar en proximidad cercana a cada una en una molécula de ADN blanco (por ejemplo, un producto de amplificación). A modo de ejemplo, una fracción donador fluorescente tal como fluoresceína se puede excitar a 470 nm por la fuente de luz del Instrumento LightCycler™. Durante FRET, la fluoresceína transfiere su energía a una fracción aceptor fluorescente tal como LightCycler™-Red 640 (LC™-Red 640) o LightCycler™-Red 705 (LC™-Red 705). La fracción aceptor fluorescente luego emite la luz de una longitud de onda mayor (por ejemplo, 640 nm o 705 nm, respectivamente), que se detecta

por el sistema de óptico del instrumento LightCycler™. Otras fracciones donador fluorescentes y aceptor correspondiente apropiadas para utilizar en la invención se describen arriba. Una eficiente FRET únicamente puede tomar lugar cuando las fracciones fluorescentes están en proximidad local directa (por ejemplo, dentro de 5 nucleótidos del uno al otro según se describe arriba) y cuando el espectro de emisión de la fracción donador fluorescente traslapa con el espectro de absorción de la fracción aceptor fluorescente. La intensidad de la señal emitida se puede correlacionar con el número de moléculas de ADN blanco original (por ejemplo, el número de enterococos resistentes a la vancomicina).

Artículos de producción

La invención proporciona además los artículos de producción para detectar los enterococos resistentes a la vancomicina. Un artículo de producción de acuerdo con la presente invención puede incluir cebadores y sondas utilizados para detectar los ácidos nucleicos a partir de los enterococos resistentes a la vancomicina, junto con el material de empaque apropiado. Cebadores y sondas representativos proporcionados en un kit para la detección de *Enterococcus* resistente a la vancomicina pueden ser complementarios a las moléculas de ácidos nucleicos *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2/3*. Los métodos de diseño de cebadores y sondas son revelados en esta, y se proporcionan ejemplos representativos de cebadores y sondas que amplifican e hibridizan a las moléculas de ácido nucleicos *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2/3*.

Los artículos de producción de la invención también pueden incluir uno o más fracciones fluorescentes para la marcación de sondas o, alternativamente, las sondas suministradas con el kit pueden ser marcadas. Por ejemplo, un artículo de producción de la invención puede además incluir una fracción donador fluorescente para la marcación de una de las sondas *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2/3* y una fracción aceptor fluorescente correspondiente para la marcación de la otra sonda *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2/3*, respectivamente. Ejemplos de fracciones fluorescentes donador FRET apropiadas y las correspondientes fracciones aceptor fluorescente se proporcionan en ésta.

Artículos de producción de la invención también pueden contener un inserto empacado que tiene las instrucciones en este para el uso de pares de cebadores *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2/3* y sondas *vanA*, *vanB*, y/o *vanB-2/3* para detectar el *Enterococcus* resistente a la vancomicina en una muestra biológica. Los artículos de producción adicionalmente puede incluir reactivos para realizar los métodos revelados en esta (por ejemplo, soluciones reguladoras, enzimas polimerasas, co-factores, o agentes para prevenir la contaminación). Tales reactivos pueden ser específicos para uno de los instrumentos disponibles comercialmente descritos en esta.

La invención adicionalmente será descrita en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrito en las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de la Muestra

Cien aislados clínicos de *Enterococcus* (*E. casseliflavus*/ff *lavescens* [n=10], *E. faecalis* [n=34], *E. faecium* [n=43], *E. avium* [n=1], *E. gallinarum* [n=11], y *E. raffinosus* [n=1]) se sembraron sobre placas con agar de sangre y se evaluaron para la presencia de genes *vanA*, *vanB*, y *vanB-2/3* utilizando un ensayo enterococos resistente a la vancomicina LightCycler™ rápido. El ensayo de enterococos resistente a la vancomicina LightCycler™ diferencia los tres genes *van* basados en el rango de temperatura sobre los cuales las sondas de hibridización se funden a partir del ADN blanco (por ejemplo, según se determina por una curva de fusión). Los resultados generaron el uso del ensayo LightCycler™ de enterococos resistente a la vancomicina se compararon con aquellos obtenidos del uso de un ensayo PCR-RFLP múltiple (Patel *et al.*, 1997, J. Clin. Microbiol., 35:703) y la prueba de susceptibilidad antimicrobiana de una dilución de agar siguiendo las líneas directivas corrientes del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS Documento M7-A3, 1993. 57 de los 100 aislados fueron negativos para genes *van* y 43 fueron positivos (11 *vanA*; 11 *vanB*; 21 *vanB-2/3*) por el ensayo LightCycler™ de enterococos resistente a la vancomicina y el ensayo PCR-RFLP (11 *vanA*; 32 *vanB*). Los valores MIC para los aislados positivos *vanA*, *vanB*, y *vanB-2/3* fueron todos resistentes a la vancomicina a $\geq 64 \mu\text{g/ml}$. Los valores MIC para todos los otros aislados fueron susceptibles a la vancomicina a $\leq 8 \mu\text{g/ml}$.

Para cada cultivo de la muestra, un tubo de tapa rosca de 2.0 ml se marcó, y 300 μl de agua se pipetearon dentro de cada tubo. Tres a cinco colonias a partir de la placa se retiraron con un asa estéril y se colocaron dentro de agua. El tubo se colocó en el vortex para mezclar. El tubo se colocó a 100°C por 10 min. y se centrifugó a 1000 xg por 1 min.

Se colectaron cuatrocientos noventa y siete hisopos anales a partir de pacientes hospitalizados, se evaluaron para la presencia de genes *vanA*, *vanB* y *vanB-2/3* mediante el ensayo LightCycler™ de enterococos resistentes a la vancomicina y por métodos de cultivo convencionales. 482 de las 497 muestras fueron negativas para los genes *van* y 12 fueron positivas (9 *vanA*; 0 *vanB*; 3 *vanB-2/3*) mediante el ensayo enterococos resistentes a la vancomicina LightCycler™ y la selección del cultivo convencional utilizando una placa EnterococoseL de 8 $\mu\text{g/ml}$. Los valores MIC para los aislados positivos *vanA* y *vanB* fueron todos resistentes a la vancomicina a $\geq 64 \mu\text{g/ml}$. Los valores MIC para todos los otros aislados fueron susceptibles a la vancomicina a $\leq 8 \mu\text{g/ml}$. Unas 21 muestras adicionales (4 *vanA*; 5 *vanB*; 12 *vanB-2/3*) fueron positivas mediante el ensayo enterococos resistentes a la vancomicina LightCycler™ pero fueron negativas por cultivo. Tres de estas muestras de pacientes se cultivaron positivos con una recolección

ES 2 269 890 T3

de hisopo repetida. Seis de las muestras positivas se separaron de muestras de los mismos pacientes. Debido al gran número de genotipos *vanB* fallados por el cultivo y recogidos con el ensayo enterococos resistentes a la vancomicina LightCycler™, la concentración de vancomicina en las placas EnterococoseL se disminuyó a 6 µg/ml, la cual, es la usual en el laboratorio estándar (Manual de Clinical Microbiology, 7th Ed., 1999).

Para cada muestra de paciente obtenida a partir de unos hisopos anales o deposiciones, se marcó un tubo de tapa rosca de 2.0 ml con una etiqueta de acceso. Se pipetearon 300 µl de agua dentro de cada tubo. 1 vial de 0.1 mm de cuentas de circonio (Daigger & Co., Inc.) se adicionó a cada tubo. El hisopo se enjuaga en el agua y las cuentas. Cualquier líquido remanente en el hisopo se expresa contra el lateral del tubo. Los tubos se colocaron dentro del equipo FastPrep y se procesaron a una velocidad de 6.0 por 30 seg. Luego los tubos se centrifugaron en una centrifuga de mesa a 20,800 xg por 1 min.

Para la extracción de ácido nucleico a partir de una muestra anal o de deposición, se adicionaron 100 µl de solución reguladora STAR (Citrato 0.2 M, EDTA 0.2 M y 0.5% de amonio lauril sulfato (pH 5.0)) a 100 µl de cada muestra Enterocóccico resistente a la vancomicina. El ácido nucleico luego se extrajo utilizando el MagNA Pure Extraction System (Roche Applied Sciences), High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Applied Science), o QIAamp ADN Stool Kit (Qiagen, Inc). Controles positivos y negativos en solución reguladora STAR (citrato 0.2 M, EDTA 0.2 M, 0.5% de amonio lauril sulfato, pH 5.0) se incluyeron con cada extracción de ácido nucleico.

Ejemplo 2

Cebadores y Sondas

Los cebadores y sondas dirigidos hacia *vanA*, *vanB*, y *vanB2/3* se designaron (Tabla 3). El producto de amplificación *vanA* fue 232 bp de longitud, el producto de amplificación *vanB* fue 167 bp de longitud, y el producto de amplificación *vanB-2/3* fue 166 bp de longitud.

TABLA 3

Secuencias de vanA, vanB, y vanB-2/3 cebadores y sondas

Cebadores	<i>vanA</i>	5'-CGA GGA CGG ATA CAG GA- 3'	1
		5'-CTT ATC ACC CCT TTA ACG C-3'	2
	<i>vanB/ 5</i> <i>vanB-2 /3 6</i>	5'-GAA GAT ACC GTG GCT CA- 3'	5
		5'-GTA CGG AAG AAC TTA ACG CT-3'	6
			SEQ ID NO:
Sondas	<i>vanA</i>	5'-CAA GAT AAC GGC CGC ATT GTA CTG AAC GA-3'	3
		5'-GTC AAT ACT CTG CCC GGT TTC AC-3'	4

ES 2 269 890 T3

5	<i>vanB/v anB-2</i>	5'-GAT CCA CTT CGC CGA CAA-3' 7	7
10	/3	5'-AAA TCA TCC TCG TTT CCC AT-3' 8	8

15

Los cebadores *vanA*, y *vanB/v anB-2 /3* se sintetizaron por el Mayo Core Facility sobre una escala de 0.2 nm, y se cuantificaron por absorción UV a 260 nm y se mezclaron juntos para hacer una solución que contiene 25 μ M de cada cebador.

20

Las sondas se sintetizaron por TIB Molbiol LLC (Adelphia, NJ), y se disolvieron en TE' (Tris 10 mM (pH 8.0), EDTA 0.1 mM) a una concentración final de 20 μ M (resuspendido de acuerdo con las instrucciones del fabricante). La concentración de los oligonucleótidos y el tinte se verificaron dos veces por absorción UV utilizando las siguientes ecuaciones (Biochemica 1: 5-8, 1999):

25

Ejemplo 3

Ensayos de Detección

30

Para la amplificación LightCycler™ para detectar el enterococos resistentes a la vancomicina en una muestra de deposición, se siguió el siguiente protocolo. El enterococos resistente a la vancomicina LightCycler™ Master Mix (Tabla 4a) se descongeló, se colocó en un vortex brevemente, y se centrifugó por 30 seg a 20,800 xg. Se minimizó el tiempo en el cual los reactivos se dejaron a temperatura ambiente. El carrusel LightCycler™ se cargó con una cubeta por muestra, dos cubetas para los controles positivos y el apropiado número de cubetas para los controles negativos en total 5-10% del número total de muestras. 15 μ l del enterococos resistentes a la vancomicina LightCycler™ Master Mix se adicionaron a cada cubeta. 5 μ l del ácido nucleico extraído se adicionaron a cada cubeta LightCycler™.

35

40

El enterococos resistente a la vancomicina LightCycler™ FastStart Master Mix (Tabla 4b) utilizando LightCycler™ Fast-Start ADN Hybridization primer kit también se probó y el resultado se comparó con el Master Mix que tiene los componentes mostrados en la Tabla 4a. La adición de una plantilla de recuperación en el FastStart Master Mix se utilizó para prevenir la mala interpretación de los resultados falso negativos causados por la inhibición de la amplificación. La plantilla de recuperación utilizada fue una molécula de ADN monocatenaria sintética con cebador uniendo sitios idénticos a la secuencia blanco *vanB* y una sonda única uniendo la región que permite la diferenciación de la plantilla de recuperación a partir del amplímero específico blanco. Las sondas plantilla de recuperación se marcaron con un tinte LC705 que se leyó en el canal F3.

45

50

(Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

ES 2 269 890 T3

TABLA 4a

LightCycler™ de enterococos resistentes a la vancomicina Master Mix

Ingrediente	Stock	Mix	μl
Agua			967
MgCl ₂	50 mM	2 mM	80
10X Solución reguladora	10X	1X	200
Cebadores- <i>vanA</i>	25 μM	0.5 μM	40
Cebadores- <i>vanB</i>	25 μM	0.7 μM	56
Platinum Taq	5 U/μl	0.03 U/μl	12
dNTP plus	10 mM	0.2 mM	40
BSA	2 %	0.025 %	25
Sonda- <i>vanA</i> -FL	20 μM	0.2 μM	20
Sonda- <i>vanA</i> -R640	20 μM	0.2 μM	20
Sonda- <i>vanB/vanB</i> -2 /3 -FL	20 μM	0.2 μM	20
Sonda- <i>vanB/vanB</i> -2 /3 -R640	20 μM	0.2 μM	20
Volumen Total →			1500

TABLA 4b

LightCycler™ enterococos resistentes a la vancomicina FastStart Master Mix

Ingrediente	Stock	Mix	μl
Agua			707.3
MgCl ₂	25 mM	2.5 mM	200.0
FAS 1 Reacción Mix*	10X	1X	200.0
Plantilla de Recuperación	10X	1X	200.0
Cebadores - <i>vanA</i>	25 μM	0.5 μM	40.0
Cebadores - <i>vanB</i>	25 μM	0.7 μM	56.0
RT Sondas - FL/Red	24 μM	0.2 μM	16.7
Sonda - <i>vanA</i> -FL	20 μM	0.2 μM	20.0
Sonda - <i>vanA</i> -R640	20 μM	0.2 μM	20.0
Sonda - <i>vanB/vanB</i> -2/3-FL	20 μM	0.2 μM	20.0
Sonda - <i>vanB/vanB</i> -2/3-R640	20 μM	0.2 μM	20.0
Volumen Total →			1500

*Mezcla de reacción FAS contiene MgCl₂ 1mM

ES 2 269 890 T3

El carrusel que contiene las muestras se centrifugó en la centrifuga carrusel LightCycler™. El carrusel se colocó en el termociclador LightCycler™ y se corrió el programa enterococos resistentes a la vancomicina LightCycler™ utilizando el Master Mix mostrado en la Tabla 4a (Tabla 5a). La Tabla 5b muestra el perfil corrido utilizado con el FastStart Master Mix. Las etapas de ciclado se completaron en aproximadamente una hora. Después de la terminación del ciclado, las cubetas se retiraron a partir del carrusel con la cubeta extractor. El carrusel se descontaminó en 10% de lejía por 10 min., se enjuago bien con agua desionizada, y se secó. Las ganancias se colocaron en 1, 5, y 15 para los canales F1, F2, y F3, respectivamente. Las ganancias se colocaron en 1,5, y 30 para los canales F1, F2, y F3, respectivamente.

Los datos se analizaron utilizando el Software LightCycler™. Un análisis de fusión PCR se utilizó para diferenciar *vanA*, *vanB*, y *vanB-2 /3* basado en el Tm de las sondas FRET. Las sondas dirigidas al gen *vanA* fundido a $67 \pm 2.5^\circ\text{C}$, mientras las sondas se dirigen a *vanB* y el gen *vanB-2 /3* funde a 60 ± 2.0 , y $56 \pm 2.0^\circ\text{C}$, respectivamente.

TABLA 5a

Condiciones de ciclado PCR para el ensayo de enterococos resistentes a la vancomicina LightCycler™ con la Tabla 4ª Master Mix

Nombre de programa/ Modo de Análisis	Modo de Análisis	Ciclos	Temp (°C)	Tiempo (seg)	Temp Transición Rata (°C/seg)	Señal de Adquisición
Inicial		1	95	120	20	Ninguno
PCR	Quant.	40	95	0	20	Ninguno
			55	12	20	Sencilla
			72	12	20	Ninguno
Análisis de Fusión	Fusión	1	95	0	20	Ninguno
			45	60	20	Ninguno
			80	0	0.2	Continuo
Frio Cool	Ninguno	1	35	0	20	Ninguno

ES 2 269 890 T3

TABLA 5b

Condiciones de ciclado PCR para el ensayo de enterococos resistentes a la vancomicina LightCycler™ con FastStart Master Mix

Nombre de programa/ Modo de Análisis	Modo de Análisis	Ciclos	Temp (°C)	Tiempo (seg)	Temp Transición Rata (°C/seg)	Señal de Adquisición
Inicial	Ninguno	1	95	600	20	Ninguno
PCR	Quant.	45	95	10	20	Ninguno
			55	10	20	Sencilla
			72	12	20	Ninguno
Análisis de Fusión	Fusión	1	95	0	20	Ninguno
			59	20	20	Ninguno
			45	20	0.2	Ninguno
			80	0	0.2	Continuo
Frio	Ninguno	1	40	30	20	Ninguno

Una muestra con un pico de fusión en la misma localización como el control positivo se interpretó como positivo. Las muestras positivas se reportaron como positivas para la presencia de una o más secuencias blanco de enterococos resistentes a la vancomicina. Una muestra en la que la curva de fusión no esta arriba de la línea base fue negativa para la presencia de ADN enterococos resistente a la vancomicina. Un resultado negativo necesariamente no niega la presencia del organismo o enfermedad activa.

Ejemplo 4

Resultados, Validación de Ensayos, y Control de Calidad

Experimentos control se llevaron a cabo para determinar si los cebadores y sondas descritos en esta para la detección de enterococos resistentes a la vancomicina reaccionan entrecruzados con ADN a partir de organismos similares o a partir de organismos comúnmente encontrados en las muestras. Para los paneles de reactividad en cruz, la presencia de ADN de microorganismo inicialmente se confirmó mediante la amplificación de 16S rARN y la separación electroforética del producto de amplificación (Johnson, 1994, *Methods for General and Molecular Bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington D.C.).

ES 2 269 890 T3

Panel de Especificidad de Deposiciones

ID#	Organismo	Fuente	LC VRE
SP1	<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC25285	negativo
SP2	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	ATCC25559	negativo
SP3	<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC13124	negativo
SP4	<i>Bacteroides distasonis</i>	ATCC8503	negativo
SP5	<i>Eubacterium lentum</i>	ATCC43055	negativo
SP6	<i>Bacteroides thetaiotaomicrons</i>	ATCC29741	negativo
SP7	<i>Bacteroides vulgatus</i>	ATCC29327	negativo
SP8	<i>Echerichia vulneris</i>	Aislado Lab.	negativo
SP9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC700603	negativo
SP10	<i>Streptococcus viridans</i>	Cepa QC	negativo
SP11	<i>Escherichia hermanii</i>	Aislado Lab.	negativo
SP12	<i>Actinomyces pyogenes</i>	Aislado Lab.	negativo
SP13	<i>Proteus mirabilis</i>	Cepa QC	negativo
SP14	<i>Pleisomonas shigelloides</i>	Aislado Lab.	negativo
SP15	<i>Salmonella Group B</i>	CAP-D-1-69	negativo
SP16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC27853	negativo
SP17	<i>Escherichia coli</i>	ATCC25922	negativo
SP18	<i>Aeromonas hydrophila</i>	CAP-D-1-82	negativo
SP19	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC25923	negativo
SP20	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Aislado Lab.	negativo
SP21	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MK214	negativo
SP22	<i>Shigella flexnerii</i>	Aislado Lab.	negativo
SP23	<i>Citrobacter freundii</i>	Aislado Lab.	negativo
SP24	<i>Salmonella especies</i>	Aislado Lab.	negativo
SP31	<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	CDC:V297	negativo
SP32	<i>Escherichia coli O157:H7</i>	ATCC35150	negativo
SP33	<i>Shigella dysenteriae</i>	CDC82-002-72	negativo
SP34	<i>Shigella sonnei</i>	ATCC25931	negativo
SP35	<i>Escherichia coli O142:K86(B):H6</i>	ATCC23985	negativo
SP36	<i>Escherichia coli O70:K:H42</i>	ATCC23533	negativo
SP37	<i>Escherichia coli O7:K1(L):NM</i>	ATCC23503	negativo
SP38	<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC13047	negativo

ES 2 269 890 T3

Panel de Aislados a partir de deposiciones que son Resistentes a la Vancomicina

ID#	Organismo	Fuente	LC VRE
5 SP25	<i>Streptococcus bovis</i>	CAP-D-16-83	negativo
10 SP26	<i>Pediococcus especies</i>	Aislado Lab.	negativo
15 SP27	<i>Lactobacillus especies</i>	Cepa QC	negativo
20 SP28	<i>Leuconostoc especies</i>	Aislado Lab.	negativo
25 SP29	<i>Streptococcus bovis</i>	Aislado Lab.	negativo
30 SP30	<i>Lactobacillus especies</i>	Aislado Lab.	negativo
35 SP39	<i>Streptococcus bovis</i>	Aislado Lab.	negativo
40 SP40	<i>Streptococcus bovis</i>	Aislado Lab.	negativo
45 SP41	<i>Leuconostoc especies</i>	Aislado Lab.	negativo
50 SP42	<i>Pediococcus especies</i>	Aislado Lab.	negativo
55 SP43	<i>Leuconostoc especies</i>	Aislado Lab.	negativo
60 SP44	<i>Lactobacillus especies</i>	Aislado Lab.	negativo
65 SP45	<i>Lactobacillus especies</i>	Aislado Lab.	negativo
SP46	<i>Leuconostoc especies</i>	Aislado Lab.	negativo
SP47	<i>Streptococcus bovis</i>	Aislado Lab.	negativo
SP48	<i>Streptococcus bovis</i>	Aislado Lab.	negativo

ES 2 269 890 T3

Panel de Especificidad de *Enterococcus*

ID#	Organismo	Fuente	Resultado RFLP	LightCycler™
E1	<i>Enterococcus gallinarum</i>	Aislado Lab.	<i>vanC-1</i>	negativo
E2	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Aislado Lab.	<i>vanC-2/3</i>	negativo
E3	<i>Enterococcus faecalis</i>	Aislado Lab.	negativo	negativo
E4	<i>Enterococcus gallinarum</i>	Aislado Lab.	<i>vanC-1</i>	negativo
E5	<i>Enterococcus gallinarum</i>	Aislado Lab.	<i>vanA</i> y <i>C-1</i>	negativo
E6	<i>Enterococcus faecium</i>	Aislado Lab.	negativo	negativo
E7	<i>Enterococcus gallinarum</i>	Aislado Lab.	<i>vanC-1</i>	negativo
E8	<i>Enterococcus gallinarum</i>	Aislado Lab.	<i>vanC-1</i>	negativo
E9	<i>Enterococcus raffinosus</i>	Aislado Lab.	negativo	negativo
E10	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Aislado Lab.	<i>vanC-2/3</i>	negativo
E11	<i>Enterococcus gallinarum</i>	Aislado Lab.	<i>vanC-1</i>	negativo
E12	<i>Enterococcus faecalis</i>	Aislado Lab.	negativo	negativo
E13	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Aislado Lab.	negativo	negativo
E14	<i>Enterococcus faecium</i>	Aislado Lab.	negativo	negativo
E15	<i>Enterococcus faecalis</i>	Aislado Lab.	negativo	negativo
E16	<i>Enterococcus faecium</i>	Aislado Lab.	<i>vanC-1</i>	negativo
E17	<i>Enterococcus gallinarum</i>	Aislado Lab.	<i>vanC-1</i>	negativo
E18	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Aislado Lab.	<i>vanC-2/3</i>	negativo
E19	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Aislado Lab.	<i>vanC-2 /3</i>	negativo

ES 2 269 890 T3

Los cebadores y sondas *vanA*, *vanB*, o *vanB-2 /3* descritos en esta no reaccionaron en cruz con ninguno de los *Enterococcus* spp. indicados arriba o deposiciones aisladas analizadas.

5 En adición, experimentos control se llevaron a cabo para determinar si la amplificación LightCycler™ de las muestras clínicas producen un solo producto de amplificación. La amplificación de productos se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 2%. En muestras clínicas positivas, la amplificación utilizando el protocolo LightCycler™ generó una sola banda en el tamaño esperado.

10 Experimentos control adicionales se llevaron a cabo utilizando diluciones de plásmido control positivo para determinar la sensibilidad del ensayo LightCycler™. Las diluciones del plásmido fluctúan desde 0.2/μl hasta 2.0 x 10⁵/μl. Las reacciones se llevaron a cabo como se describió arriba. Los datos se registraron como el nivel de fluorescencia detectado relativo al número de ciclos para cada calor de dilución. El alcance de la curva estándar fue -3.236 con un valor r = -1.00. Utilizando las formulas de Amplificación Exponencial = 10^(-1/pendiente), y Eficiencia = (10^(-1/pendiente))-1, la eficiencia de la reacción se determinó para ser 1.037152. La sensibilidad de la reacción LightCycler™ fue menos de 50 copias del blanco por 5 μl de la muestra con la mezcla PCR.

20 Los experimentos control además se llevaron a cabo para determinar la sensibilidad y especificidad del ensayo LightCycler™ comparado con un método PCR-RFLP (polimorfismo restricción de la longitud del fragmento). 60 aislados clínicos de enterococos previamente examinados para la presencia de un gen resistente a la vancomicina por PCR-RFLP se probó utilizando el ensayo LightCycler™ descrito en esta. Los aislados se sembraron sobre placas de agar sangre a 37°C durante la noche. Las células de colonias de enterococos fueron lisadas por la suspensión de la colonia en 500 μl de agua estéril y la ebullición de la muestra a 100°C por 10 minutos. Luego el tubo se centrifugó por 1 minuto a 20,800 xg, y se analizaron 5 μl del sobrenadante por el ensayo LightCycler™ descrito en esta.

25 El ensayo LightCycler™ descrito en esta se correlaciona 100% con los resultados del ensayo PCR-RFLP (27 muestras fueron positivas para enterococos resistentes a la vancomicina; 33 muestras fueron negativas para enterococos resistentes a la vancomicina). Notar que los genotipos *vanC* se detectan con el ensayo PCR-RFLP, a pesar de que el ensayo corriente LightCycler™ no detecta genotipos que son negativos para el fenotipo resistente a la vancomicina.

#	PCR-RFLP	LightCycler™	Organismo
1	<i>vanA</i>	<i>vanA</i>	<i>E. faecium</i>
2	<i>vanA</i>	<i>vanA</i>	<i>E. faecium</i>
4	<i>vanA</i>	<i>vanA</i>	<i>E. faecium</i>
5	<i>vanB</i>	<i>vanB</i>	<i>E. faecium</i>
6	negativo	negativo	<i>E. faecalis</i>
7	negativo	negativo	<i>E. faecalis</i>
9	negativo	negativo	<i>E. faecalis</i>
10	<i>vanB</i>	<i>vanB-2 /3</i>	<i>E. faecium</i>
11	<i>vanA</i>	<i>vanA</i>	<i>E. faecium</i>
13	<i>vanA</i>	<i>vanA</i>	<i>E. faecium</i>
15	<i>vanB</i>	<i>vanB-2 /3</i>	<i>E. faecium</i>

ES 2 269 890 T3

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

16	<i>vanB</i>	<i>vanB</i>	<i>E. faecium</i>
17	<i>vanB</i>	<i>vanB</i>	<i>E. faecium</i>
19	negativo	negativo	<i>E. faecalis</i>
20	negativo	negativo	<i>E. faecalis</i>
21	vanC-2 /3	negativo	<i>E. casseliflavus</i>
23	negativo	negativo	<i>E. avium</i>
25	negativo	negativo	<i>E. faecalis</i>
28	<i>vanB</i>	<i>vanB</i>	<i>E. faecium</i>
29	negativo	negativo	<i>E. faecalis</i>
30	negativo	negativo	<i>E. faecalis</i>
31	<i>vanB</i>	<i>vanB</i>	<i>E. faecium</i>
32	vanC-2 /3	negativo	<i>E. casseliflavus</i>
33	<i>vanB</i>	<i>vanB-2/3</i>	<i>E. faecium</i>
34	<i>vanB</i>	<i>vanB-2/3</i>	<i>E. faecium</i>
35	<i>vanB</i>	<i>vanB</i>	<i>E. faecalis</i>
36	negativo	negativo	<i>E. faecium</i>
38	<i>vanB</i>	<i>vanB-2/3</i>	<i>E. faecium</i>
39	negativo	negativo	<i>E. faecalis</i>
40	negativo	negativo	<i>E. faecalis</i>
41	vanC	negativo	<i>E. faecalis</i>
42	vanC-1	negativo	<i>E. gallinarum</i>
44	vanC-2 /3	negativo	<i>E. casseliflavus</i>
45	<i>vanB</i>	<i>vanB-2 /3</i>	<i>E. faecalis</i>
46	<i>vanB</i>	<i>vanB-2 /3</i>	<i>E. faecium</i>
47	<i>vanB</i>	<i>vanB-2/3</i>	<i>E. faecium</i>
48	negativo	negativo	<i>E. faecalis</i>
49	negativo	negativo	<i>E. faecalis</i>
50	negativo	negativo	<i>E. faecalis</i>

ES 2 269 890 T3

51	<i>vanB</i>	<i>vanB</i>	<i>E. faecium</i>
54	<i>vanB</i>	<i>vanB-2 /3</i>	<i>E. faecium</i>
55	<i>vanB</i>	<i>vanB-2 /3</i>	<i>E. faecium</i>
56	<i>vanB</i>	<i>vanB</i>	<i>E. faecalis</i>
57	negativo	negativo	<i>E. faecalis</i>
58	negativo	negativo	<i>E. faecium</i>
59	negativo	negativo	<i>E. faecalis</i>
60	negativo	negativo	<i>E. faecalis</i>
61	<i>vanA</i>	<i>vanA</i>	<i>E. faecium</i>
62	<i>vanB-v</i>	<i>vanB-2 /3</i>	<i>E. faecium</i>
63	<i>vanA</i>	<i>vanA</i>	<i>E. faecium</i>
64	negativo	negativo	<i>E. faecalis</i>
65	negativo	negativo	<i>E. casseliflavus</i>
66	<i>vanC-1</i>	negativo	<i>E. gallinarum</i>
67	<i>vanB</i>	<i>vanB-2 /3</i>	<i>E. faecium</i>
68	<i>vanC-1</i>	negativo	<i>E. gallinarum</i>
69	negativo	negativo	<i>E. faecalis</i>
70	negativo	negativo	<i>E. faecalis</i>
71	negativo	negativo	<i>E. faecalis</i>
72	<i>vanC-2 /3</i>	negativo	<i>E. casseliflavus</i>
74	negativo	negativo	<i>E. faecium</i>

Un adicional de 56 muestras obtenidas de los hisopos anales se analizaron utilizando el ensayo LightCycler™ y se compararon con un método de cultivo utilizando un medio de selección VRE. Los hisopos anales se prepararon por amplificación según lo descrito arriba. El ensayo LightCycler™ detectó más muestras positivas que el cultivo, y es por consiguiente más sensible que el cultivo. Una rata alta de resultados falso negativo a partir del cultivo de hisopo rectal ha sido previamente confirmada en la literatura (Clin. Infect. Dis., 2002, 34:167-172).

ES 2 269 890 T3

		cultivo (Gold Standard)		
LightCycler™ VRE Assay		VRE Positivo	VRE Negativo	TOTAL
	VRE Positivo 7		5	12
	VRE Negativo	0	44	44
	TOTAL	7	49	56

#	Resultados ^a Cultivo	Resultados ^b Susceptibilidad	Resultados LightCycler™
52	Enterococcus	Amp, Pen, Gent=S; Van=I	VanA
129	NG		VanB
235	Enterococcus	Amp, Van, Pen, Gent=R	VanA
244	Enterococcus	Amp, Van, Pen=R; Gent=S	VanA
279	Enterococcus	Amp, Pen =R; Van, Gent=S	VanB-2/3
280	NG		Negativo
281	NG		Negativo
282	NG		Negativo
286	Enterococcus	Amp, Van, Pen, Gent=S	VanB-2/3 (weak)
287	NG		Negativo
296	Enterococcus	Amp, Van, Pen, Gent=S	Negativo
298	NG		Negativo
299	NG		Negativo
300	NG		Negativo
301	NG		Negativo
302	NG		Negativo
303	NG		Negativo
304	Enterococcus	Amp, Pen, Gent=S; Van=I	Negativo

ES 2 269 890 T3

305	NG		Negativo
306	NG		Negativo
307	NG		VanB-2/3
308	NG		Negativo
309	NG		Negativo
310	NG	muestra positiva de seguimiento	VanB-2/3
311	NG		Negativo
319	NG		Negativo
338	NG		Negativo
348	NG		Negativo
419	Enterococcus	Amp, Van, Pen = R; Gent=I	VanA
420	NG		Negativo
421	NG		Negativo
422	NG		Negativo
423	NG		Negativo
424	NG		Negativo
425	Enterococcus	Amp, Pen, Gent=S; Van=I	Negativo
426	NG		Negativo
448	NG		Negativo
449	NG		VanB-2/3 (weak)
450	NG		Negativo
451	NG		Negativo
452	NG		Negativo
453	NG		VanB
454	NG		Negativo
455	NG		Negativo
469	NG		Negativo
470	NG		Negativo
471	NG		Negativo
472	NG		Negativo

ES 2 269 890 T3

5	473	NG		VanB-2/3
	474	NG		Negativo
	475	NG		Negativo
	476	NG		Negativo
10	525	NG		Negativo
	526	NG		Negativo
15	527	NG		VanB-2/3
	528	NG		Negativo
20	<p>a NG, No crecimiento,</p> <p>b Amp, Ampicilina; Pen, Penicilina; Gent, Gentamicina; Van, Vancomicina.</p> <p>b R, Resistente; S, Susceptible; I, Intermedio.</p>			
25				

Los experimentos control también se llevaron a cabo para determinar la precisión (por ejemplo, precisión en la corrida, en el día, y entre días) del ensayo LightCycler™. La precisión en la corrida del ensayo LightCycler™ se evaluó por análisis de 5 µl de una dilución del control positivo 20 veces dentro del mismo experimento de amplificación. La precisión en el día del ensayo Light-Cycler™ se evaluó por análisis de 5 µl de una dilución del control positivo 20 veces durante un solo día. La precisión entre días del ensayo LightCycler™ se evaluó por análisis de 5 µl de una dilución del control positivo 20 veces durante un periodo de tres días.

El número de ciclos promedio en el que FRET se detectó en los ensayos entre-corrida fue 30.82 0.293; el número de ciclos promedio al cual FRET se detectó en los ensayos en el-día fue 30.610.190; y el número de ciclos promedio al cual FRET se detectó en la precisión entre-días fue 30.610.190 (día 1), 30.170.154 (día 2), y 29.410.143 (día 3). La precisión de la medida del punto de cruce promedio y la desviación estándar de los 20 puntos fue excelente.

Los experimentos control se llevaron a cabo para determinar si el ensayo LightCycler™ produce los mismos resultados utilizando 2, 5 o 10 µl de la muestra de ácido nucleico extraída de una muestra de paciente. Las mezclas se prepararon para diferentes volúmenes blanco esencialmente según lo descrito arriba, y un set de 2 muestras positivas (*vanA* y *vanB-2 /3*) se probó en cada volumen. Resultados similares se obtuvieron a partir de la muestra de pacientes cuando 5 o 10 µl de la muestra se utilizó en el ensayo. Los puntos de cruce están dentro de un ciclo. Una diferencia de 2-3 ciclos se observó cuando se utilizaron 2 µl de muestra.

REIVINDICACIONES

5 1. Un método para la detección la presencia o ausencia de una o más enterococos resistentes a la vancomicina en una muestra biológica de un individuo, dicho método comprende:

10 Realizar al menos una etapa de ciclado, en donde una etapa de ciclado comprende una etapa de amplificación y una etapa de hibridización, en donde dicha etapa de amplificación comprende el contacto de dicha muestra con un par de cebadores *vanA* para producir un producto de amplificación si una molécula de ácido nucleico *vanA* está presente en dicha muestra, en donde dicha etapa de hibridización comprende el contacto de dicha muestra con un par de sondas *vanA*, en donde los miembros de dicho par de sondas *vanA* hibridiza a dicho producto de amplificación entre no más de cinco nucleótidos del uno al otro, en donde una primera sonda *vanA* de dicho par de sondas *vanA* se marca con a fracción donador fluorescente y en donde a segunda sonda *vanA* de dicho par de sondas *vanA* se marca con una fracción aceptor fluorescente correspondiente; y

15 detección de la presencia o ausencia de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) entre dicha fracción donador fluorescente de dicha primera sonda *vanA* y dicha fracción aceptor fluorescente de dicha segunda sonda *vanA*,

20 en donde la presencia de FRET es indicativo de la presencia de uno o más enterococos resistentes a la vancomicina en dicha muestra biológica, en donde la ausencia de FRET es indicativo de la ausencia de un enterococos resistentes a la vancomicina en dicha muestra biológica, en donde dicho par de cebadores *vanA* comprende un primer cebador *vanA* y un segundo cebador *vanA*, en donde dicho primer cebador *vanA* comprende la secuencia

25 5'-CGA GGA CGG ATA CAG GA-3' (SEQ ID NO: 1), y en donde dicho segundo cebador *vanA* comprende la secuencia

30 5'-CTT ATC ACC CCT TTA ACG C-3' (SEQ ID NO: 2), y en donde dicha primera sonda *vanA* comprende la secuencia

5'-CAA GAT AAC GGC CGC ATT GTA CTG AAC GA-3' (SEQ ID NO: 3), y en donde dicha segunda sonda *vanA* comprende la secuencia

35 5'-GTC AAT ACT CTG CCC GGT TTC Arc-3' (SEQ ID NO: 4).

2. El método de la reivindicación 1, en donde los miembros de dicho par de sondas *vanA* hibridiza dentro de no más de dos nucleótidos del uno al otro.

40 3. El método de la reivindicación 1, en donde los miembros de dicho par de sondas *vanA* hibridizan dentro de no más de un nucleótido del uno al otro.

4. El método de la reivindicación 1, en donde dicha fracción donador fluorescente es fluoresceína.

45 5. El método de la reivindicación 1, en donde dicha fracción aceptor fluorescente se selecciona del grupo que consiste de LC-Red 640, LC-Red 705, Cy5, y Cy5.5.

50 6. El método de la reivindicación 1, en donde dicha etapa de detección comprende la excitación de dicha muestra biológica a una longitud de onda absorbida por la dicha fracción donador fluorescente y la visualización y/o medida de la longitud de onda emitida por dicha fracción aceptor fluorescente.

7. El método de la reivindicación 1, en donde dicha detección comprende la cuantificación de dicho FRET.

8. El método de la reivindicación 1, en donde dicha etapa de detección se realiza después de cada etapa de ciclado.

55 9. El método de la reivindicación 1, en donde dicha etapa de detección se realiza en tiempo real.

60 10. El método de la reivindicación 1, que comprende además la determinación de la temperatura de fusión entre uno o dos de la(s) dicha(s) sonda(s) *vanA*(s) y dicho producto de amplificación, en donde dicha temperatura de fusión confirma dicha presencia o dicha ausencia de dicho enterococos resistente a la vancomicina.

11. El método de la reivindicación 1, en donde la presencia de dicho FRET durante 50 ciclos es indicativo de la presencia de uno o más enterococos resistentes a la vancomicina en dicho individuo.

65 12. El método de la reivindicación 1, en donde la presencia de dicho FRET durante 40 ciclos es indicativo de la presencia de uno o más enterococos resistentes a la vancomicina en dicho individuo.

ES 2 269 890 T3

13. El método de la reivindicación 1, en donde la presencia de dicho FRET durante 30 ciclos es indicativo de la presencia de uno o más enterococos resistentes a la vancomicina en dicho individuo.

5 14. El método de la reivindicación 1, que comprende además: la prevención de la amplificación de un ácido nucleico contaminante.

15. El método de la reivindicación 14, en donde la dicha prevención comprende la realización de dicha etapa de amplificación en la presencia de uracilo.

10 16. El método de la reivindicación 15, en donde la dicha prevención adicionalmente comprende el tratamiento de dicha muestra biológica con uracilo-ADN glicosilasa antes de una primera etapa de amplificación.

15 17. El método de la reivindicación 1, en donde dicha muestra biológica se selecciona del grupo que consiste de muestras de deposiciones, hisopos anal o perirrectal, sangre, y fluidos corporales.

18. El método de la reivindicación 1, en donde dicha etapa de ciclado se realiza sobre una muestra control.

20 19. El método de la reivindicación 18, en donde dicha muestra control comprende dicha molécula de ácido nucleico *vanA*.

25 20. El método de la reivindicación 1, en donde dicha etapa de ciclado utiliza un par de cebadores control y un par de sondas control, en donde dichos cebadores control y dichas sondas control son otros que dichos cebadores *vanA* y dichas sondas *vanA*, respectivamente, en donde un producto de amplificación control se produce si una plantilla control se presenta en dicha muestra, en donde dichas sondas control se hibridizan a dicho producto de amplificación control.

21. Un kit, que comprende:

30 un par de cebadores *vanA*, en donde dicho par de cebadores *vanA* comprende un primer cebador *vanA* y un segundo cebador *vanA*, en donde dicho primer cebador *vanA* comprende la secuencia

5'-CGA GGA CGG ATA CAG GA-3' (SEQ ID NO: 1), y en donde dicho segundo cebador *vanA* comprende la secuencia

35 5'-CTT ATC ACC CCT TTA ACG C-3' (SEQ ID NO: 2);

un par de sondas *vanA*, en donde dicho par de sondas *vanA* comprende una primera sonda *vanA* y una segunda sonda *vanA*, en donde dicha primera sonda *vanA* comprende la secuencia

40 5'-CAA GAT AAC GGC CGC ATT GTA CTG AAC GA-3' (SEQ ID NO: 3), y en donde dicha segunda sonda *vanA* comprende la secuencia

5'-GTC AAT ACT CTG CCC GGT TTC AC-3' (SEQ ID NO: 4); y

45 una fracción donador fluorescente y una fracción aceptor fluorescente correspondiente.

22. El kit de la reivindicación 21, en donde dicho par de sondas *vanA* comprende una primera sonda *vanA* marcada con dicha fracción donador fluorescente y una segunda sonda *vanA* marcada con dicho fracción aceptor fluorescente correspondiente.

50 23. El kit de la reivindicación 21, que comprende además una etiqueta embalada o un inserto empacado que tienen las instrucciones en estos para el uso de dicho par de cebadores *vanA* y dicho par de sondas *vanA* para detectar la presencia o ausencia de uno o más enterococos resistentes a la vancomicina en una muestra biológica.

55 24. Un método para la detección de la presencia o ausencia de uno o más enterococos resistentes a la vancomicina en una muestra biológica de un individuo, dicho método que comprende:

la realización de al menos una etapa de ciclado, en donde una etapa de ciclado comprende una etapa de amplificación y una etapa de hibridización, en donde dicha etapa de amplificación comprende el contacto de dicha muestra con un par de cebadores *vanB* para producir un producto de amplificación *vanB* si una molécula de ácido nucleico *vanB* está presente en dicha muestra, en donde dicha etapa de hibridización comprende el contacto de dicha muestra con un par de sondas *vanB*, en donde los miembros de dicho par de sondas *vanB* hibridizan a dicho producto de amplificación dentro de no más de cinco nucleótidos del uno al otro, en donde un primera sonda *vanB* de dicho par de sondas *vanB* se marca con una fracción donador fluorescente y en donde una segunda sonda *vanB* de dicho par de sondas *vanB* se marca con una fracción aceptor fluorescente correspondiente; y la detección de la presencia o ausencia de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) entre dicha fracción donador fluorescente de dicha primera sonda *vanB* y dicha fracción aceptor fluorescente de dicha segunda sonda *vanB*,

ES 2 269 890 T3

en donde la presencia de FRET es indicativo de la presencia de uno o más enterococos resistentes a la vancomicina en dicha muestra biológica, y en donde la ausencia de FRET es indicativo de la ausencia de un enterococos resistente a la vancomicina en dicha muestra biológica, en donde dicho par de cebadores *vanB* comprende un primer cebador *vanB* y un segundo cebador *vanB*, en donde dicho primer cebador *vanB* comprende la secuencia

5 5'-GAA GAT ACC GTG GCT CA-3' (SEQ ID NO: 5), y en donde dicho segundo cebador *vanB* comprende la secuencia

10 5'-GTA CGG AAG AAC TTA ACG CT-3' (SEQ ID NO: 6) y en donde dicha primera sonda *vanB* comprende la secuencia

5'-GAT CCA CTT CGC CGA CAA-3' (SEQ ID NO: 7), y en donde dicha segunda sonda *vanB* comprende la secuencia

15 5'-AAA TCA TCC TCG TTT CCC AT-3' (SEQ ID NO: 8).

25. El método de la reivindicación 1, que comprende además:

20 la realización de al menos una etapa de ciclado, en donde la etapa de ciclado comprende una etapa de amplificación y una etapa de hibridización, en donde dicha etapa de amplificación comprende el contacto de dicha muestra con un par de cebadores *vanB* para producir un producto de amplificación *vanB* si una molécula de ácido nucleico *vanB* está presente en dicha muestra, en donde dicha etapa de hibridización comprende el contacto de dicha muestra con un par de sondas *vanB*, en donde los miembros de dicho par de sondas *vanB* hibridiza a dicho producto de amplificación dentro de no más de cinco nucleótidos del uno al otro, en donde una primera sonda *vanB* de dicho par de sondas *vanB* se marca con una fracción donador fluorescente y en donde una segunda sonda *vanB* de dicho par de sondas *vanB* se marca con una fracción aceptor fluorescente correspondiente; y la detección de la presencia o ausencia de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) entre dicha fracción donador fluorescente de dicha primera sonda *vanB* y dicha fracción aceptor fluorescente de dicha segunda sonda *vanB*,

30 en donde la presencia de FRET es indicativo de la presencia de uno o más enterococos resistentes a la vancomicina en dicha muestra biológica, y en donde la ausencia de FRET es indicativo de la ausencia de un enterococos resistente a la vancomicina en dicha muestra biológica.

35 26. Un kit, que comprende:

un par de cebadores *vanB*, en donde dicho par de cebadores *vanB* comprende un primer cebador *vanB* y un segundo cebador *vanB*, en donde dicho primer cebador *vanB* comprende la secuencia

40 5'-GAA GAT ACC GTG GCT CA-3' (SEQ ID NO: 5), y en donde dicho segundo cebador *vanB* comprende la secuencia

5'-GTA CGG AAG AAC TTA ACG CT-3' (SEQ ID NO: 6),

45 un par de sondas *vanB*, en donde dicho par de sondas *vanB* comprende una primera sonda *vanB* y una segunda sonda *vanB*, en donde dicha primera sonda *vanB* comprende la secuencia

5'-GAT CCA CTT CGC CGA CAA-3' (SEQ ID NO: 7), y en donde dicha segunda sonda *vanB* comprende la secuencia

50 5'-AAA TCA TCC TCG TTT CCC AT-3' (SEQ ID NO: 8); y

una fracción donador fluorescente y una fracción aceptor fluorescente correspondiente.

55 27. El kit de la reivindicación 26, en donde dicho par de sondas *vanB* comprende una primera sonda *vanB* marcada con dicha fracción donador fluorescente y una segunda sonda *vanB* marcada con dicha fracción aceptor fluorescente correspondiente.

60 28. El kit de la reivindicación 26, que comprende además una etiqueta embalada o un inserto empacado que tiene las instrucciones en estos para el uso de dicho par de cebadores *vanB* y dicho par de sondas *vanB* para detectar la presencia o ausencia de enterococos resistentes a la vancomicina en una muestra biológica.

65

ES 2 269 890 T3

```

#601      GCACGGATTA CTTGTTAAAA AGAACCATGA ATATGAAATC AACCATGTTG
>Van A    #275      -----
>X56895   #651      -----
>M97297   #651      -----
#651      ATGTAGCATT TTCAGCTTTG CATGGCAAGT CAGGTGAAGA TGGATCCATA
.....
>Van A    #325      -----
>X56895   #701      -----
>M97297   #701      -----
#701      CAAGGTCTGT TTGAATTGTC CGGTATCCCT TTTGTAGGCT GCGATATTCA
.....
>Van A    #375      -----
>X56895   #751      -----
>M97297   #751      -----
#751      AAGCTCAGCA ATTTGTATGG ACAAATCGT  GACATACATC GTTGCGAAAA
.....
>Van A    #425      -----
>X56895   #801      -----
>M97297   #801      -----
#801      ATGCTGGGAT AGCTACTCCC GCCTTTTGGG TTATTAATAA AGATGATAGG
.....
>Van A    #475      -----
>X56895   #851      -----
>M97297   #851      -----
#851      CCGGTGGCAG CTACGTTTAC CTATCCTGTT TTTGTTAAGC CGGCGCGTTC
.....
>Van A    #525      -----
>X56895   #901      -----
>M97297   #901      -----
#901      AGGCTCATCC TTCGGTGTGA AAAAAGTCAA TAGCGCGGAC GAATTGGACT
.....
>Van A    #575      -----
>X56895   #951      -----
>M97297   #951      -----
#951      ACGCAATTGA ATCGGCAAGA CAATATGACA GCAAAATCTT AATTGAGCAG
.....
>Van A    #625      -----
>X56895   #1001     -----
>M97297   #1001     -----
#1001     GCTGTTTCGG GCTGTGAGGT CGGTGTGCG  GTATTGGGAA ACAGTGCCGC
.....
>Van A    #675      -----
>X56895   #1051     -----
>M97297   #1051     -----
#1051     GTTAGTTGTT GGCGAGGTGG ACCAAATCAG GCTGCAGTAC GGAATCTTTC
.....
>Van A    #725      -----
>X56895   #1101     -----
>M97297   #1101     -----
#1101     GTATTCATCA GGAAGTCGAG CCGGAAAAAG GCTCTGAAAA CGCAGTATA
.....
>Van A    #775      -----
>X56895   #1151     -----
>M97297   #1151     -----
#1151     ACCGTTCCCG CAGACCTTTC AGCAGAGGAG CGAGGACGGA TACAGGAAAC

```

Figura 1-2

ES 2 269 890 T3

```

>Van A      #825      -----
>X56895    #1201     -----
>M97297    #1201     -----
                #1201     GGCACAAAAA ATATATAAAG CGCTCGGCTG TAGAGGTCTA GCCCGTGTGG
                #875      -----
>Van A      #1251     -----
>X56895    #1251     -----
>M97297    #1251     -----
                #1251     ATATGTTTTT ACAAGATAAC GGCCGCATTG TACTGAACGA AGTCAATACT
                #925      -----
>Van A      #1301     -----
>X56895    #1301     -----
>M97297    #1301     -----
                #1301     CTGCCCGGTT TCACGTCATA CAGTCGTTAT CCCCCTATGA TGGCCGCTGC
                #975      -----
>Van A      #1351     -----
>X56895    #1351     -----
>M97297    #1351     -----
                #1351     AGGTATTGCA CTTCCCGAAC TGATTGACCG CTTGATCGTA TTAGCGTTAA
                #1025     -----
>Van A      #1401     -----
>X56895    #1401     -----
>M97297    #1401     -----
                #1401     AGGGGTGATA AGCATGAAA TAGGATTAC TTTTITAGAT GAAATAGTAC
                ++
                #1451     -----
>X56895    #1451     -----
>M97297    #1451     -----
                #1451     ACGGTGTTTCG TTGGGACGCT AAATATGCCA CTTGGGATAA TTTCACCGGA
                #1501     -----
>X56895    #1501     -----
>M97297    #1501     -----
                #1501     AAACCGGTTG ACGGTTATGA AGTAAATCGC ATTGTAGGGA CATACGAGTT
                #1551     -----
>X56895    #1551     -----
>M97297    #1551     -----
                #1551     GGCTGAATCG CTTTGAAGG CAAAAGAACT GGCTGCTACC CAAGGGTACG
                #1601     -----
>X56895    #1601     -----
>M97297    #1601     -----
                #1601     GATTGCTTCT ATGGGACGGT TACCGTCCTA AGCGTGCTGT AAAGTGTGTTT
                #1651     -----
>X56895    #1651     -----
>M97297    #1651     -----
                #1651     ATGCAATGGG CTGCACAGCC GGAAAATAAC CTGACAAAGG AAAGTTATTA
                #1701     -----
>X56895    #1701     -----
>M97297    #1701     -----
                #1701     TCCCAATATT GACCGAACTG AGATGATTC AAAAGGATAC GTGGCTTCAA
                #1751     -----
>X56895    #1751     -----
>M97297    #1751     -----
                #1751     AATCAAGCCA TAGCCGCG (SEQ ID NO:10)
                (SEQ ID NO:11)
                (SEQ ID NO:10)

```

Figura 1-3

ES 2 269 890 T3

```

<gi|8100655:28.#1
>EFU94528 >#1>
>EFU94529 >#1>
>EFU94526 >#1>
>EFU94530 >#1>
>EFU94527 >#1>
<ENEVANB >#1>
<EFU72704 >#1>
<ENEVANB2A >#1>

#1
ACCAGGCAGG GTATTGACCT CATTTAGAAC GATGCCGCCA TCCTCCTGCA

<gi|8100655:28.#51
>EFU94528 #3
>EFU94529 #3
>EFU94526 #3
>EFU94530 #3
>EFU94527 #3
<ENEVANB #3
<EFU72704 #3
<ENEVANB2A #3

#51
AAAAAAGATC AACACGGGCA AGCCCTCTGC ATCCAAGCAC CCGATATACT
*
*
*

<gi|8100655:28.#101
>EFU94528 #53
>EFU94529 #53
>EFU94526 #53
>EFU94530 #53
>EFU94527 #53
<ENEVANB #53
<EFU72704 #53
<ENEVANB2A #53

#101
TTCTTTGCCG TTTCCTGCAC CCGATTCHT TCCTCGACCG GAATGTCTGC
*
*
*

<gi|8100655:28.#151
>EFU94528 #103
>EFU94529 #103
>EFU94526 #103
>EFU94530 #103
>EFU94527 #103
<ENEVANB #103
<EFU72704 #103
<ENEVANB2A #103

#151
GGGAAGTGA ATCATCGCAT TTCTGAGCC TTTTCCGGC FCGTTTCTCT
* ** * *

<gi|8100655:28.#201
>EFU94528 #153
>EFU94529 #153
>EFU94526 #153
>EFU94530 #153
>EFU94527 #153
<ENEVANB #153
<EFU72704 #153
<ENEVANB2A #153

#201
GATGGATGCG GAAGATACCG TGGCTCAGCC GGATTTGATC CACTTCGCCG
* *

<gi|8100655:28.#251
>EFU94528 #203
>EFU94529 #203
>EFU94526 #203
>EFU94530 #203
>EFU94527 #203

#251
T-----G-G-----

```

Figura 2-1

ES 2 269 890 T3

```

<ENEVANB #203 ----- T----- --G-G-----
<EFU72704 #203 ----- A----- G-----
<ENEVANB2A #203 -----
#251 ACAATCAAAT CATCCTCGTT CCCCATGACC GCACACCCGA CTCACAGCC
          *           *           *           *
          Red640 Probe BB-R       W099/01571

<gi|8100655:28.#301 -----
>EFU94528 #253 -----
>EFU94529 #253 -----
>EFU94526 #253 -----
>EFU94530 #253 -----
>EFU94527 #253 -----
<ENEVANB #253 -----
<EFU72704 #253 -----
<ENEVANB2A #253 -----
#301 CGAAATCGCT TGCTCAATTA AGATTTTTC ATCATATTGT CCTGCCGCTT
          *           *           *           *

<gi|8100655:28.#351 -----
>EFU94528 #303 -----
>EFU94529 #303 -----
>EFU94526 #303 -----
>EFU94530 #303 -----
>EFU94527 #303 -----
<ENEVANB #303 -----
<EFU72704 #303 -----
<ENEVANB2A #303 -----
#351 CTATCGCAGC GTTAAGTTCT TCCGTACCGT TTACTTTGGT TACGCCAAAG
          *           *           *           *

<gi|8100655:28.#401 -----
>EFU94528 #353 -----
>EFU94529 #353 -----
>EFU94526 #353 -----
>EFU94530 #353 -----
>EFU94527 #353 -----
<ENEVANB #353 -----
<EFU72704 #353 -----
<ENEVANB2A #353 -----
#401 GACGAACCTG ACCGTGCCGG CTCACAAAG ACAGGGTAGG TAAGCGCACC
          *           *           *           *

<gi|8100655:28.#451 -----
>EFU94528 #403 -----
>EFU94529 #403 -----
>EFU94526 #403 -----
>EFU94530 #403 -----
>EFU94527 #403 -----
<ENEVANB #403 -----
<EFU72704 #403 -----
<ENEVANB2A #403 -----
#451 CGCCTCCGGC TTGTCACCTT TATCAATCAT TTGAAATTCG GGAACGGCGA
          *           *           *           *

<gi|8100655:28.#501 -----
>EFU94528 #453 -----
>EFU94529 #453 -----
>EFU94526 #453 -----
>EFU94530 #453 -----
>EFU94527 #453 -----
<ENEVANB #453 -----
<EFU72704 #453 -----
<ENEVANB2A #453 -----
#501 TGCCCGCATT TTTTGTAAGA ATGTAGGCCA GTGATTTCG CATGCAAGCT

```

Figura 2-2

ES 2 269 890 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Cockerill, Franklin R. III Sloan, Lynne M.	
5	<120> Detection de Vancomycin-Resistant <i>Enterococcus</i> spp.	
	<130> 07039-426001	
	<140> 10/254,260	
10	<141> 2002-09-25	
	<160> 20	
	<170> FastSEQ para Windows Version 4.0	
	<210> 1	
15	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Oligonucléotido	
	<400> 1	
25	cgaggacgga tacagga	17
	<210> 2	
	<211> 19	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucléotido	
35	<400> 2	
	cttatcacc ctttaacgc	19
40	<210> 3	
	<211> 29	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucléotido	
	<400> 3	
50	caagataacg gccgcattgt actgaacga	29
	<210> 4	
55	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucléotido	
	<400> 4	
65	gtcaatactc tgcccgttt cac	23
	<210> 5	
	<211> 17	

ES 2 269 890 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucléotido	
	<400> 5	
	gaagataccg tggetca	17
10	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucléotido	
20	<400> 6	
	gtacggaaga acttaacgct	20
25	<210> 7	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucléotido	
	<400> 7	
35	gatccacttc gccgacaa	18
	<210> 8	
	<211> 20	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
45	<223> Oligonucléotido	
	<400> 8	
	aaatcatcct cgttcccat	20
50	<210> 9	
	<211> 1034	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Enterococcus faecium</i>	
	<220>	
	<221> variación	
	<222> 1033, 1034	
60	<223> n = a, t, c o g; secuencia vanA	
65		

ES 2 269 890 T3

<400> 9

	atgaatagaa	taaaagtgc	aatactgtt	gggggttgc	cagaggagca	tgacgtatcg	60
	gtaaaatctg	caatagagat	agccgctaac	attaataaag	aaaaatcga	gccgttatac	120
5	attggaatca	cgaaatctgg	tgtatggaaa	atgtgcgaaa	aaccttgccg	ggaatgggaa	180
	aacgacaatt	gctattcagc	tgtactctcg	ccggataaaa	aaatgcacgg	attacttgtt	240
	aaaaagaacc	atgaatatga	aatcaacat	gttgatgtag	cattttcagc	tttgcattggc	300
	aagtcagggtg	aagatggatc	catacaaggt	ctgtttgaat	tgtccgggtat	cccttttcta	360
	ggctgcgata	ttcaaaagctc	agcaatttgt	atggacaaa	cgttgacata	catcgttgctg	420
	aaaaatgctg	ggatagctac	tcccgccttt	tgggttatta	ataaagatga	tagggcgggtg	480
10	gcagctacgt	ttacctatcc	tgtttttgtt	aagccggcgc	gttcaggctc	atccttcgggt	540
	gtgaaaaaag	tcaatagcgc	ggacgaattg	gactacgcaa	ttgaatcggc	aagacaatat	600
	gacagcaaaa	tcttaattga	gcaggctggt	tccggctgtg	aggtcgggtg	tgccggtattg	660
	ggaaacagtg	ccgcgttagt	tgttggcag	gtggacaaa	tcaggctgca	gtacggaaatc	720
	tttcgtatcc	atcaggaagt	cgagccggaa	aaaggctctg	aaaacgcagt	tataaccggtt	780
15	cccgcagacc	tttcagcaga	ggagccgagga	cggatcacgg	aaacggcaaa	aaaaatata	840
	aaagcctcgc	gctgtagagg	tctagcccgt	gtggatattg	ttttacaaga	taaccggccgc	900
	attgtactga	acgaagtcaa	tactctgccc	ggtttcagct	catacagtcg	ttatccccgt	960
	atgatggccg	ctgcagggtat	tgcacttccc	gaactgattg	accgcttgat	cgattattagc	1020
	ctaaaggggt	gann					1034

20

<210> 10

<211> 1768

<212> ADN

25

<213> *Enterococcus faecium*

<220>

<223> secuencia vanA

30

<400> 10

	gatategta	cgcttcatgt	gcccgtcaat	acggatcacg	actatattat	cagccacgaa	60
	caaatacaga	gaatgaagca	aggagcattt	cttatcaata	ctgggcccgg	tccacttgta	120
	gatacctatg	agttgggtaa	agcattagaa	aacgggaaac	tgggcccgtg	cgcatgggat	180
35	gtattggaag	gagaggaaga	gtttttctac	tctgattgca	cccaaaaacc	aattgataat	240
	caatttttac	ttaaacttca	aagaatgcct	aacgtgataa	tcacaccgca	tacggcctat	300
	tataccgagc	aagcgttgcg	tgataccggt	gaaaaaacca	ttaaaaactg	tttggatttt	360
	gaaaggagac	aggagcatga	atagaataaa	agttgcaata	ctgtttgggg	gttgcctaga	420
	ggagcatgac	gtatcggtaa	aatctgcaat	agagatagcc	gctaacatta	ataaagaaaa	480
	ataccgagccg	ttatacatg	gaattacgaa	atctggtgta	tggaaaatgt	gcgaaaaacc	540
40	ttgcgcggaa	tgggaaaacg	acaattgcta	ttcagctgta	ctctgccgg	ataaaaaaat	600
	gcacggatta	cttgtaaaa	agaaccatga	atatgaaatc	aaccatggtg	atgtagcatt	660
	ttcagctttg	catggcaagt	cagggtgaaga	tggatccata	caaggctctg	ttgaattgtc	720
	cggtatccct	tttgtaggct	gcgatattca	aagctcagca	atltgtatgg	acaaactcgt	780
45	gacatacatc	gttgcgaaaa	atgctgggat	agctactccc	gccttttggg	ttattaataa	840
	agatgatagg	ccggtggcag	ctacgtttac	ctatcctggt	tttgttaagc	cgggcggttc	900
	aggctcatcc	ttcgggtgta	aaaaagtcaa	tagccgggac	gaattggact	acgcaattga	960
	atcggcaaga	caatatgaca	gcaaaatcct	aattgagcag	gctgtttcgg	gctgtgaggt	1020
	cggttctgctg	gtattgggaa	acagtgccgc	gttagttggt	ggcggaggtg	accaaactcag	1080
	gctgcagtac	ggaatccttc	gtattcatca	ggaagtcgag	ccggaaaaag	gctctgaaaa	1140
50	cgcgattata	accgttcccg	cagaccttcc	agcagaggag	cgaggacgga	tacaggaaac	1200
	ggcaaaaaaa	atatataaag	cgctcggctg	tagagggtcta	gcccgtgtgg	atatgttttt	1260
	acaagataac	ggccgcattg	tactgaacga	agtcaatact	ctgcccggtt	tcacgtcata	1320
	cagtcggtat	ccccgatga	tggccgctgc	aggatattgca	cttcccgaac	tgattgaccg	1380
	cttgatcgta	ttagcgttaa	aggggtgata	agcatggaaa	taggatttac	tttttttagat	1440
55	gaaatagtac	acggtgttcg	ttgggacgct	aaatatgcca	cttgggataa	tttcaccgga	1500
	aaaccgggtg	acggttatga	agtaaatcgc	attgtagggg	catacaggtt	ggctgaatcg	1560
	cttttgaaag	caaaagaact	ggctgctacc	caagggtacg	gattgcttct	atgggacgggt	1620
	taccgtccta	agcgtgctgt	aaactgtttt	atgcaatggg	ctgcacagcc	ggaaaaaac	1680
	ctgacaaaag	aaagtatta	tcccaatatt	gaccgaaactg	agatgatttc	aaaaggatac	1740
60	gtggcttcaa	aatcaagcca	tagccgctg				1768

65

<210> 11

<211> 1768

<212> ADN

<213> *Enterococcus faecium*

<220>

ES 2 269 890 T3

<223> secuencia vanB

<400> 13

5	caaaaaaaga tcaacaacggg caagccctct gcatccaagc acccgatata ctttctttgc	60
	cgtttcctgc acccgatttc gttcctcgac cggaatgtct gcggaactg taatcatcgc	120
	atthttctgag cctttttccg gctcgttttc ctgatggatg cggaagatac cgtggctcag	180
	ccggatttga tccacttgcg cgacaatcaa atcatcctcg ttcccatga cgcacacccc	240
	gacctcacag cccgaaatcg cttgctcaat taagatthttt ccatcatatt gtcctgcccgc	300
	ttctatcgca gcgtaagtt cttccgtacc gtttactttg gttacgcaa aggacgaacc	360
10	tgaccgtgcc ggcttcacaa agacagggta ggtaagcgca cccgcctccg gcttgtcacc	420
	tttatcaata atttgaaatt cgggaacggc gatgcccgca ttttttghaa gaatgtaggc	480
	cagtgatttg tccatgcaag ctgcccagct ttgaatatca cagcccacat aggggatacc	540
	agacaataca aacagc	556

15 <210> 14

<211> 556

<212> ADN

20 <213> *Enterococcus faecium*

<220>

<223> secuencia vanB

<400> 14

25	caaaaaaaga tcaacaacggg caagccctct gcatccaagc acccgatata ctttctttgc	60
	cgtttcctgc acccgatttc gttcctcgac cggaatgtct gcggaactg taatcatcgc	120
	atthttctgag cctttttccg gctcgttttc ctgatggatg cggaagatac cgtggctcag	180
	ccggatttga tccacttgcg cgacaatcaa atcatcctcg ttcccatga cgcacacccc	240
30	gacctcacag cccgaaatcg cttgctcaat taagatthttt ccatcatatt gtcctgcccgc	300
	ttctatcgca gcgtaagtt cttccgtacc gtttactttg gttacgcaa aggacgaacc	360
	tgaccgtgcc ggcttcacaa agacagggta ggtaagcgca cccgcctccg gcttgtcacc	420
	tttatcaata atttgaaatt cgggaacggc gatgcccgca ttttttghaa gaatgtaggc	480
	cagtgatttg tccatgcaag ctgcccagct ttgaatatca cagcccacat aggggatacc	540
35	agacaataca aacagc	556

<210> 15

<211> 556

40 <212> ADN

<213> *Enterococcus faecium*

<220>

<223> secuencia vanB

45 <400> 15

50	caaaaaaaga tcaacaacggg caagccctct gcatccaagc acccgatata ctttctttgc	60
	cgtttcctgc acccgatttc gttcctcgac cggaatgtct gcggaactg taatcatcgc	120
	atthttctgag cctttttccg gctcgttttc ctgatggatg cggaagatac cgtggctcag	180
	ccggatttga tccacttgcg cgacaatcaa atcatcctcg ttcccatga cgcacacccc	240
	gacctcacag cccgaaatcg cttgctcaat taagatthttt ccatcatatt gtcctgcccgc	300
	ttctatcgca gcgtaagtt cttccgtacc gtttactttg gttacgcaa aggacgaacc	360
	tgaccgtgcc ggcttcacaa agacagggta ggtaagcgca cccgcctccg gcttgtcacc	420
	tttatcaata atttgaaatt cgggaacggc gatgcccgca ttttttghaa gaatgtaggc	480
55	cagtgatttg tccatgcaag ctgcccagct ttgaatatca cagcccacat aggggatacc	540
	agacaataca aacagc	556

<210> 16

<211> 556

60 <212> ADN

<213> *Enterococcus faecium*

<220>

65 <223> secuencia vanB

ES 2 269 890 T3

	<400> 16						
		caaaaaaaga tcaacacggg caagccctct gcatccaagc acccgatata ctttctttgc					60
		cgtttcttgc acccgatttc gttcctcgac cggaatgtct gctggaactg taatcatcgc					120
5		attctctgag ctttttccg gctcgttttc ctgatggatg cgggaagatac cgtggctcag					180
		ccggatttga tccacttcgc cgacaatcaa atcatcctcg tttcccatga ccgcacacc					240
		gacctcacag cccgaaatcg cttgctcaat taagattttt ccatcatatt gtccctgccc					300
10		ttctatcgca gcgttaagtt cttecgtaac gtttactttg gttacgccaaggacgaacc					360
		tgaccgtgcc ggcttcacaa agacagggta ggtaaagcga cccgcctccg gcttgtcacc					420
		tttatcaata atttgaatt cgggaacggc gatgcccga tttttgtaa gaatgtagc					480
		cagtgatttg tccatgcaag ctgcccagct ttgaatatca cagccacat aggggatacc					540
		agacaatata aacagc					556
15	<210> 17						
	<211> 556						
	<212> ADN						
20	<213> <i>Enterococcus faecium</i>						
	<220>						
	<223> secuencia vanB						
25	<400> 17						
		caaaaaaaga tcaacacgag caagccctct gcatccaagc acccgatata ctttctttgc					60
		cgtttcttgc acccgatttc gttcctcgac cggaatgtct gctggaactg taatcatcgc					120
		attctctgag ctttttccg gctcgttttc ctgatggatg cgggaagatac cgtggctcaa					180
		ccggatttga tccacttcgc cgacaatcaa atcatcctcg tttcccatga ccgcgcagcc					240
30		gacctcacag cccgaaatcg cttgctcaat taagattttt ccatcatatt gtccctgctgc					300
		ttctatcgca gcgtttagtt cttecgtaac gtttactttg gttacgccaaggacgaacc					360
		tgaccgtgcc ggcttcacaa agacagggta ggtaaagcga cccgcctccg gtttgtcacc					420
		tttttcaatc atttgaatt cggggacggc gatgcccga tttttgtaa gaatgtagc					480
		cagtgatttg tccatgcaag ctgcccagct ttgaatatcg cagccacat aggggatacc					540
35		agacaattca aacaga					556
40	<210> 18						
	<211> 556						
	<212> ADN						
	<213> <i>Enterococcus faecalis</i>						
	<220>						
	<223> secuencia vanB						
45	<400> 18						
		caaaaaaaga tcaacacgag caagccctct gcatccaagc acccgatata ctttctttgc					60
		cgtttcttgc acccgatttc gttcctcgac cggaatgtct gctggaactg taatcatcgc					120
		attctctgag ctttttccg gctcgttttc ctgatggatg cgggaagatac cgtggctcaa					180
50		ccggatttga tccacttcgc cgacaatcaa atcatcctcg tttcccatga ccgcgcagcc					240
		gacctcacag cccgaaatcg cttgctcaat taagattttt ccatcatatt gtccctgctgc					300
		ttctatcgca gcgtttagtt cttecgtaac gtttactttg gttacgccaaggacgaacc					360
		tgaccgtgcc ggcttcacaa agacagggta ggtaaagcga cccgcctccg gtttgtcacc					420
		tttttcaatc atttgaatt cggggacggc gatgcccga tttttgtaa gaatgtagc					480
55		cagtgatttg tccatgcaag ctgcccagct ttgaatatcg cagccacat aggggatacc					540
		agacaattca aacaga					556
60	<210> 19						
	<211> 556						
	<212> ADN						
	<213> <i>Enterococcus faecalis</i>						
	<220>						
65	<223> secuencia vanB						

ES 2 269 890 T3

<400> 19

	caaaaaaaga	tcaaacacggg	caagccctct	gcatccaagc	gcccgatata	ctttctttgc	60
	cgtttctcgc	acccgatttc	gttcccgac	tgggatgtct	gcaggaacgg	taatcatcgc	120
5	attctctgat	cctttttccg	gctcgttttc	ctgatggatg	cggaagatac	catggctcag	180
	ccggatttga	tccacttcgc	cgacaatcaa	atcatcctcg	ttcccataa	ccgcacagcc	240
	gacctcacag	cccgaaatcg	cttgcctcaat	taagattttt	ccatcatatt	gtcctgccgc	300
	ttctatcgca	gcgttaagtt	cttcogtacc	gtttactttg	gttaagccaa	aggacgaacc	360
	tgaccgtgcc	ggcttcacaa	agacagggta	ggtaagcgca	cccgtctccg	gcttgtcacc	420
10	tttatcaatc	atttgaat	cgggaaacggc	gatgcccgca	ttttttgtaa	gaatgtaggc	480
	cagtgatttg	tccatgcaag	ctgcccagct	ttgaatatcg	cagcccacat	aggggatgcc	540
	agacaattca	aataaa					556

<210> 20

15 <211> 556

<212> ADN

<213> *Enterococcus faecalis*

20 <220>

<223> secuencia vanB

<400> 20

25	caaaaaaaga	tcaaacacggg	caagccctct	gcatccaagc	accgatata	ctttctttgc	60
	cgtttctcgc	acccgatttc	gttccctcgac	cggaatgtct	gcgggaactg	taatcatcgc	120
	atctcttgag	cctttttccg	gctcgttttc	ctgatggatg	cggaagatac	cgtggctcag	180
	ccggatttga	tccacttcgc	cgacaatcaa	atcatcctcg	ttcccataa	ccgcacaccc	240
	gacctcacag	cccgaaatcg	cttgcctcaat	taagattttt	ccatcatatt	gtcctgccgc	300
	ttctatcgca	gcgttaagtt	cttcogtacc	gtttactttg	gttacgcaaa	aggacgaacc	360
30	tgaccgtgcc	ggcttcacaa	agacagggta	ggtaagcgca	cccgcctccg	gcttgtcacc	420
	tttatcaatc	atttgaat	cgggaaacggc	gatgcccgca	ttttttgtaa	gaatgtaggc	480
	cagtgatttg	tccatgcaag	ctgcccagct	ttgaatatca	cagcccacat	aggggatacc	540
	agacaattca	aacagt					556

35

40

45

50

55

60

65