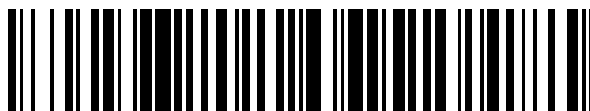


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 960**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2009 E 09706944 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.12.2014 EP 2245178**

54 Título: **Identificación de resistencia a antibióticos usando antibióticos marcados**

30 Prioridad:

01.02.2008 EP 08001949

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

06.04.2015

73 Titular/es:

**MIACOM DIAGNOSTICS GMBH (100.0%)
Merowingerplatz 1a
40225 Düsseldorf, DE**

72 Inventor/es:

**THRIPPLETON, IAN y
STEIN, WALTER**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 532 960 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

Identificación de resistencia a antibióticos usando antibióticos marcados

El objeto de la presente invención es un método para la detección de una resistencia a antibióticos en un microorganismo.

5 La caracterización de microorganismos en procedimientos de diagnóstico rutinarios engloba la determinación de la identidad de una especie y su sensibilidad frente a antibióticos. Con el fin de conseguir esto, es necesario tomar los microorganismos de su entorno y enriquecerlos en un entorno selectivo para la identificación separada (ID) y ensayo de sensibilidad a antibióticos (AST). Actualmente, la AST/ID de microorganismos se consigue identificando la presencia o ausencia de una matriz de características bioquímicas y la capacidad (o incapacidad) de crecer en presencia de antibióticos. Alternativamente, puede extraerse el ADN de una muestra y entonces se ensaya el ADN combinado para la presencia/ausencia de secuencias específicas utilizando técnicas de amplificación génica. Esto puede señalar la presencia de un organismo en la muestra. Igualmente, puede detectarse en la muestra la presencia de un gen que codifica resistencia a antibióticos. Por definición, la extracción de ADN directamente de una muestra da lugar a ADN combinado a partir de una mezcla desconocida de células. Sólo se pueden conseguir resultados inequívocos si el ADN se extrae de una colonia pura.

15 *Staphylococcus aureus* es una de las causas más comunes de infecciones nosocomiales o comunitarias, que dan lugar a enfermedades graves con altas proporciones de morbilidad y mortalidad. En los últimos años, el incremento en el número de cepas bacterianas que muestran resistencia a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) se ha convertido en un problema clínico y epidemiológico grave porque este antibiótico (o análogo) se considera la primera opción en el tratamiento de infecciones por staphylococci. La resistencia a este antibiótico implica resistencia a todos los antibióticos β -lactama. Por estas razones, tiene una importancia clave la exactitud y prontitud en la detección de resistencia a meticilina para asegurar un tratamiento con antibiótico correcto en pacientes infectados así como para controlar aislados de MRSA en entornos hospitalarios, para evitar su diseminación.

25 Las cepas de MRSA portan el gen *mecA*, que codifica una proteína PBP2 modificada (PBP2' o PBP2a) con baja afinidad para meticilina y todos los antibióticos β -lactama. La expresión fenotípica de resistencia a meticilina puede alterarse dependiendo de las condiciones de crecimiento para *S. aureus*, tales como temperatura u osmolaridad del medio, y esto puede afectar la exactitud de los métodos usados para detectar resistencia a meticilina (1). Las cepas bacterianas hetero-resistentes pueden evolucionar a cepas totalmente resistentes y, por lo tanto, pueden seleccionarse en aquellos pacientes que reciben antibióticos β -lactama, causando así un fracaso terapéutico. Desde un punto de vista clínico, deberían considerarse, por lo tanto, completamente resistentes.

30 Existen varios métodos para detectar resistencia a meticilina (1,9) incluyendo métodos clásicos para determinar una concentración inhibidora mínima MIC (difusión en disco, Etest, o dilución de caldo), técnicas de cribado con medio de cultivo sólido que contiene oxacilina, y métodos que detectan el gen *mecA* o su producto proteico (proteína PBP2') (3,4). La detección del gen *mecA* se considera como el método de referencia para determinar resistencia a meticilina (1). Sin embargo, muchos laboratorios a lo largo del mundo no tienen los fondos requeridos, la capacidad o el personal experimentado requerido para proporcionar ensayos moleculares para detectar aislados de MRSA. Por lo tanto, es esencial, que se incorporen otros métodos de cribado, más útiles, en la práctica clínica rutinaria. Además, la presencia de resistencia a antibióticos tiene su relevancia a varios niveles, todos los cuales tienen significancia clínica

1. Presencia de un gen que confiere resistencia, tal como *mecA*, *mef(E)*,
2. Presencia de un gen represor que inhibe la expresión fenotípica de dicho mecanismo de resistencia, por ejemplo, represor *MecA*
3. Mecanismos de resistencia múltiples; por ejemplo, resistencia a Macrólidos mediante la modificación del sitio de unión ribosomal y presencia de mecanismo(s) de eflujo.
4. Nivel de expresión de dicho mecanismo de resistencia regulado a través de la transcripción y traducción detectable como el fenotipo

45 Las técnicas de cultivo actuales requieren el aislamiento de una colonia discreta y la identificación posterior y ensayo de resistencia, asumiendo que una única colonia deriva de una única célula y, por lo tanto, se considera pura. En la realidad, sin embargo, la generación de una colonia pura a partir de una muestra clínica, en la que los patógenos viven frecuentemente en comunidades de bio-película, no puede garantizarse. Igualmente, usando tecnologías de amplificación, se extraen y se amplifican secuencias de ácido nucleico de múltiples células y, por lo tanto, pueden dar lugar a resultados positivos falsos. Sólo si la identificación y resistencia pueden llevarse a cabo y leerse en células individuales, es posible una visión verdadera del patógeno invasor.

Un amplio rango de antibióticos porta un grupo amino primario. Es muy conocido en la técnica que reactivos tales como Isotiocianato de fluoresceína (FITC), Fluoresceína-éster de N-hidroxisuccinimida reaccionarán fácilmente con dichas aminas primarias.

5 La diseminación creciente de resistencia a antibióticos tanto en sistemas comunitarios como sanitarios necesita la precisión y velocidad de la biología molecular. Sin embargo, la complejidad y coste de estos ensayos prohíbe la aplicación generalizada en un entorno de ensayo rutinario.

10 Teniendo en cuenta las dificultades en la identificación de un microorganismo y su resistencia potencial frente a un antibiótico en una muestra biológica, es deseable poder identificar rápidamente un patógeno directamente a partir de una muestra sin cultivo ni amplificación y, además, poder detectar o excluir la presencia de resistencia frente a un antibiótico elegido.

15 Es la intención de esta invención proporcionar una solución permitiendo de manera simultánea la identificación y ensayo de resistencia a nivel celular. Esto reduce la complejidad de los ensayos de manera que puede hacerse una asignación inequívoca de un fenotipo para células individuales. Los ensayos se diseñan para reducir el tiempo de manejo y de obtención de resultados para permitir programas de cribado tales como el cribado de todos los pacientes entrantes por ejemplo para MRSA.

Un primer objeto de la presente invención es así un método para la detección de una resistencia a antibióticos en un microorganismo particular en una muestra biológica, que comprende las etapas:

(a) proporcionar un antibiótico marcado,

20 (b) poner en contacto el antibiótico marcado con una muestra biológica que comprende el microorganismo en condiciones que permitan la unión del antibiótico marcado a su sitio de unión en el microorganismo,

(c) detectar el antibiótico marcado en el microorganismo e identificar este microorganismo en la misma muestra biológica, y

(d) determinar si la cantidad de marcador detectable está alterada respecto a la cantidad de marcador detectable en el microorganismo particular en su forma no resistente,

25 en el que los microorganismos en los que la cantidad de marcador detectable está alterada respecto a la cantidad de marcador detectable en el microorganismo particular en su forma no resistente son microorganismos resistentes frente al antibiótico.

30 El principio subyacente del método es que si un organismo es sensible o resistente a un antibiótico, se diferenciará claramente de su equivalente resistente o sensible. Los antibióticos pueden unirse a sus sitios de unión respectivos bien en el lumen celular, citoplasma, la pared celular o a proteínas secretadas tales como beta-lactamasas. Dependiendo del mecanismo de resistencia, los organismos resistentes pueden mostrar en la mayor parte de los casos bien afinidad reducida o ausencia de afinidad para el antibiótico debido a una afinidad reducida, por ejemplo, para ribosomas o proteínas de unión a penicilina. A la inversa, si el mecanismo de resistencia se debe a la ab/adsorción a la membrana celular externa, el organismo resistente presentará una fluorescencia muy aumentada.

35 La muestra biológica puede ser cualquier muestra de origen biológico, tal como una muestra clínica o alimentaria, que se sospecha que comprende un microorganismo resistente a antibiótico. El microorganismo puede seleccionarse del grupo que consiste en bacterias, levaduras y hongos, en particular de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

40 Preferiblemente, el microorganismo particular se selecciona del grupo que consiste en *Staphylococcus*, *Enterococcus*, y *Streptococcus*.

Más preferiblemente, el microorganismo particular se selecciona del grupo que consiste en *Staphylococcus* resistente a meticilina, *Staphylococcus* resistente a vancomicina, *Enterococcus* resistente a vancomicina, y *Enterococci* resistente a aminoglicósido de alto nivel.

45 El microorganismo se selecciona aún más preferiblemente del grupo que consiste en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina (VRSA), *Staphylococcus* resistente a vancomicina (VRS), Enterococci resistente a vancomicina (VRE), *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* resistente a fármaco (DRSP), y Enterococci resistente a aminoglicósido (HLAR).

50 El antibiótico que se va a proporcionar en la etapa (a) puede ser cualquier antibiótico. Preferiblemente, el antibiótico se selecciona del grupo que consiste en aminoglicósidos, carbacefemos, carbapenemos, cefalosporinas, glicopéptidos, macrólidos, monobactamas, antibióticos beta-lactama, quinolonas, bacitracina, sulfonamidas, tetraciclinas, estreptograminas, cloranfenicol, clindamicina, y lincosamida.

Más preferiblemente, los antibióticos se seleccionan de antibióticos beta-lactama, macrólidos, lincosamida, y estreptograminas.

Incluso más preferiblemente, el antibiótico se selecciona del grupo que consiste en Amicacina, Gentamicina, Kanamicina, Neomicina, Netilmicina, Estreptomina, Tobramicina, Loracarbef, Ertapenem, Imipenem, Cilastatina, Meropenem, Cefadroxil, Cefazolina, Cefalexina, Cefaclor, Cefamandol, Cefoxitina, Cefprozil, Cefuroxima, Cefixima, Cefdinir, Cefditoreno, Cefoperazona, Cefotaxima, Cefpodoxima, Ceftazidima, Ceftibuteno, Ceftizoxima, Ceftriaxona, Cefsulodina, Cefepima, Teicoplanina, Vancomicina, Azitromicina, Claritromicina, Diritromicina, Eritromicina, Roxitromicina, Troleandomicina, Aztreonam, Amoxicilina, Ampicilina, Azlocilina, Carbenicilina, Cloxacilina, Dicloxacilina, Flucloxacilina, Mezlocilina, Nafcilina, Penicilina, Piperacilina, Ticarcilina, Bacitracina, Colistina, Polimixina B, Ciprofloxacina, Enoxacina, Gatifloxacina, Levofloxacina, Lomefloxacina, Moxifloxacina, Norfloxacina, Ofloxacina, Trovafloxacina, Mafenida, Prontosil, Sulfacetamida, Sulfametizol, Sulfanilimida, Sulfasalazina, Sulfisoxazol, Trimetoprima, Trimetoprima sulfa, Sulfametoxazol, Co-trimoxazol, Demeclociclina, Doxiciclina, Minociclina, Oxitetraciclina, Tetraciclina, Cloranfenicol, Clindamicina, Etambutol, Fosfomicina, Furazolidona, Isoniazid, Linezolid, Metronidazol, Mupirocina, Nitrofurantoína, Platensimicina, Pirazinamida, Quinupristina/Dalfopristina, Rifampina, Espectinomicina, Amfotericina B, Fluconazol, Fluoropirimidinas, Gentamicina, y ácido clavulánico.

Lo más preferiblemente, el antibiótico se selecciona de Vancomicina, Meticilina, Clindamicina, Trimetoprima, Trimetoprima sulfa, Gentamicina, y ácido clavulánico.

Ball et al. (Biochem.Biophys.Res. 93(1), 74-81, 1980) describe el uso de tetraciclina como un antibiótico naturalmente fluorescente marcador de eflujo.

Sorprendentemente, una modificación de un antibiótico con un grupo marcador no dificulta la unión de un antibiótico a su sitio de unión en el microorganismo.

Preferiblemente, el antibiótico se marca con un grupo marcador luminiscente. Están disponibles muchos fluoróforos adecuados como grupos marcadores en la presente invención. El grupo marcador puede seleccionarse para ajustarse a los filtros presentes en el mercado. El antibiótico puede marcarse con cualquier grupo marcador adecuado que puede detectarse en un microorganismo. Preferiblemente, el grupo marcador es un grupo marcador fluorescente. Más preferiblemente, el grupo marcador se selecciona de Fluoresceína y Atto-495-NSI.

El grupo marcador puede acoplarse al antibiótico en un grupo funcional. Un amplio rango de antibióticos porta un grupo amino primario. Por ejemplo, un compuesto fluorescente tal como Isotiocianato de fluoresceína (FITC), Fluoresceína-éster de N-hidroxisuccinimida puede hacerse reaccionar con un grupo amino de un antibiótico, lo que resulta en un antibiótico marcado con Fluoresceína. Otros antibióticos tales como Clindamicina portan un grupo tiometilo que puede acoplarse a un grupo marcador. Se encontraron las condiciones para sustituir moderadamente el grupo metilo de Clindamicina con una molécula espaciadora formando un puente ditio.

El grupo marcador puede acoplarse al antibiótico mediante un espaciador. En la técnica se conocen muchos espaciadores y pueden aplicarse. Usando técnicas de química de proteínas muy conocidas en la técnica son factibles muchas maneras de unir un espaciador y posteriormente unir un fluoróforo. En una realización preferida se elige la cisteína ya que su grupo amino primario puede marcarse fácilmente con un fluoróforo. También pueden elegirse moléculas con núcleos de carbono más largos y otros grupos reactivos muy conocidos en la técnica como conector/espaciador entre cualquier fluoróforo y una sustancia antibiótica.

Una lista de antibióticos modificados con un fluoróforo con o sin un espaciador se recopilan en la Tabla 1. Se prefiere que los antibióticos (en particular de la Tabla 1) estén marcados con Fluoresceína o Atto-495-NSI.

Con el fin de combinar la identificación con el estado de resistencia, las condiciones que permiten la unión del antibiótico marcado a su sitio de unión en el microorganismo en la etapa (b) pueden referirse a un ensayo de unión que no se inhibe por el procedimiento de hibridación *in-situ*, lo que permite una determinación bien concomitante o posterior tanto de la identificación como del estado de resistencia en células individuales y poblaciones de células.

Un sitio de unión preferido es la proteína PBP2 (Proteína de Unión a Penicilina) en *Staphylococcus* codificada por el gen *mecA*. En *Staphylococcus* resistente frente a antibióticos beta-lactama, el gen *mecA* codifica una proteína PBP2 modificada (PBP2' o PBP2a) con baja afinidad para meticilina y todos los antibióticos β -lactama. Así, en una realización más preferida, el microorganismo es una cepa MRSA que porta el gen *mecA*, que codifica una proteína PBP2 modificada (PBP2' o PBP2a) con baja afinidad para meticilina y todos los antibióticos β -lactama, y el antibiótico es un antibiótico beta-lactama.

Una aplicación preferida adicional es para la determinación de resistencia debida a mutaciones puntuales en el ARN ribosomal 23s. Las mutaciones puntuales en diferentes posiciones inducen resistencia a una amplia matriz de antibióticos tales como Macrólidos, Ketólidos, Tetraciclina, Tiazolantibióticos, Lincosamina, Cloranfenicol, Estreptogramina, Amecitina, Animosicina, Esparsoicina y Puromicina. Los efectos detallados de mutaciones puntuales respectivas se listan en la Tabla 3. Las mutaciones puntuales en diferentes posiciones del ARNr 23S pueden generar un iso-fenotipo. Se requeriría una matriz de sondas de oligonucleótidos para abarcar todas las

posibilidades. Esta invención ofrece una manera rentable y eficiente de detectar resistencia a antibióticos independientemente de la posición de la mutación.

Otra aplicación preferida es la detección de la unión de Vancomicina a proteínas de superficie de *Staphylococcus aureus* que están ancladas al péptidoglicano de la pared celular. Los Staphylococci resistentes a Vancomicina unen el antibiótico en un grado tal que hacen que la Vancomicina sea inefectiva. La Vancomicina marcada, por lo tanto, se unirá preferiblemente a organismos resistentes.

En la presente invención, la cantidad de marcador detectable en el microorganismo corresponde a la señal del grupo marcador del antibiótico. La cantidad de marcador detectable puede ser directamente proporcional a la señal obtenida del grupo marcador.

El método de la presente invención puede comprender etapas para eliminar grupos marcadores que se han eliminado por escisión del antibiótico o/y para eliminar antibiótico marcado que no se une a un microorganismo. Dichas etapas pueden mejorar la proporción señal a ruido.

En la etapa (c) del método de la presente invención, el marcador puede detectarse por cualquier método adecuado conocido en la técnica. La lectura del ensayo puede requerir una resolución de hasta la célula individual. Preferiblemente, el marcador se detecta mediante microscopía de epifluorescencia, citometría de flujo, dispositivos de escaneo por láser, fluorimetría de tiempo resuelto, detección por luminiscencia, detección por isótopos, escáner de visualización hiper espectral, Resonancia de Plasmón Superficial o/y otra tecnología de lectura basada en evanescencia.

En la etapa (d) del método de la presente invención, la alteración de la cantidad de marcador detectable puede ser un incremento del marcador detectable o una disminución del marcador detectable. En el método de la presente invención, la resistencia a antibióticos que se va a detectar se predetermina por el suministro de un antibiótico marcado en la etapa (a). La Tabla 4 indica mecanismos de resistencia frente a antibióticos comúnmente conocidos en microorganismos clínicamente relevantes. A partir del mecanismo de resistencia de un microorganismo particular, tal como se indica en la Tabla 4, puede deducirse qué combinación de microorganismo/resistencia a antibióticos se espera que muestre una cantidad incrementada de marcador detectable en las células resistentes a antibiótico, y qué combinación muestra una cantidad disminuida de marcador detectable. Por ejemplo, una disminución de la cantidad de marcador detectable se espera en microorganismos resistentes frente a antibióticos β -lactama o macrólidos, tales como MSRA, ORSA, etc. Una cantidad incrementada de marcador detectable se espera en VRSA. Una disminución de marcador detectable se espera en Enterococci resistentes a Vancomicina, debido al diferente mecanismo de resistencia como en VRSA. En la Tabla 4 pueden encontrarse más detalles.

En la presente invención, el microorganismo particular en su forma no resistente puede emplearse como una referencia para determinar si la cantidad de marcador detectable está alterada (disminuida o incrementada). El microorganismo particular en su forma no resistente puede añadirse a la muestra, o puede presentarse en una preparación separada. El microorganismo particular en su forma no resistente puede portar al menos un marcador adicional. Puede emplearse cualquier marcador como se describe en la presente memoria, siempre que sea adecuado para discriminación del marcador del antibiótico o/y otros microorganismos presentes en el ensayo de la presente invención. La cantidad de marcador detectable en un microorganismo particular en su forma no resistente también puede proporcionarse en la forma de valores o intervalos específicos de la cantidad de marcador detectable para una o más combinaciones del microorganismo, un antibiótico y un grupo marcador, por ejemplo en la forma de una hoja de cálculo. En particular, un kit de la presente invención puede comprender dicho microorganismo particular en su forma no resistente o/y dicha hoja de cálculo.

El método de la presente invención también puede emplear el microorganismo particular en su forma resistente como un control adicional, o valores o intervalos específicos de la cantidad de marcador detectable en un microorganismo particular en su forma resistente para una o más combinaciones del microorganismo, un antibiótico y un grupo marcador, por ejemplo en la forma de una hoja de cálculo. El microorganismo particular en su forma resistente puede portar al menos un marcador adicional. Puede emplearse cualquier marcador como se describe en la presente memoria, siempre que sea adecuado para la discriminación del marcador del antibiótico o/y otros microorganismos presentes en el ensayo de la presente invención. En particular, un kit de la presente invención puede comprender dicho microorganismo particular en su forma resistente o/y dicha hoja de cálculo.

La disminución de la cantidad de marcador detectable puede ser al menos 5%, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, o al menos 90% respecto a la cantidad de marcador detectable en el microorganismo particular en su forma no resistente. En particular, un microorganismo que se va a identificar puede ser un microorganismo que esencialmente no porta el marcador.

El incremento de la cantidad de marcador detectable puede ser al menos 5%, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 100%, al menos 150%, o al menos 200% respecto a la cantidad de marcador detectable en el microorganismo particular en su forma no resistente.

En la etapa (c) del método de la presente invención, el método comprende la identificación del microorganismo en la muestra biológica. "Identificación" en el contexto de la presente invención se refiere a la identificación de células microbianas individuales como pertenecientes a una categoría taxonómica particular, tal como especie, género, familia, clase o/y orden, etc. La identificación puede llevarse a cabo tomando como base las clasificaciones morfológicas o/y bioquímicas.

Puede emplearse una sonda para identificar el microorganismo. Se prefiere identificar el microorganismo particular con un ácido nucleico marcado, en particular un oligonucleótido marcado, capaz de hibridar específicamente con un ácido nucleico en el microorganismo en condiciones in-situ. El oligonucleótido marcado puede tener una longitud de hasta 50 nucleótidos. Lo más preferido es la identificación del microorganismo por hibridación fluorescente in-situ (FISH). Estas realizaciones preferidas y más realizaciones preferidas permiten la detección del fenotipo de antibiótico a nivel molecular mientras se mantienen las condiciones de hibridación *in-situ* para permitir la identificación simultánea e inequívoca mediante hibridación in-situ y la detección de un fenotipo de resistencia a antibiótico en la misma célula - incluso si está en una población mixta.

Puede aplicarse un protocolo de hibridación in-situ como se describe en la solicitud de patente EP 06 021 267.7. La incubación con un antibiótico marcado puede llevarse a cabo a temperaturas por debajo de la T_m de la sonda hibridada. En una realización preferida la temperatura es entre aproximadamente 25 y aproximadamente 65°C, en una realización más preferida la temperatura es entre aproximadamente 35°C y aproximadamente 59°C. En una realización incluso más preferida, la temperatura es a aproximadamente 52°C. El tiempo de incubación es preferiblemente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 30 minutos. En una realización más preferida la incubación se hace durante aproximadamente 15 minutos. Después de la incubación el portaobjetos puede sumergirse en 50% etanol seguido de un baño en etanol puro. Ambas etapas pueden realizarse durante entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 minutos. La duración preferida de la incubación es entre aproximadamente 2 y aproximadamente 6 minutos. Es más preferido incubar aproximadamente 4 minutos. Los portaobjetos pueden secarse al aire (por ejemplo, en una placa caliente) y las células pueden incluirse en un medio de montaje salino equilibrado.

El microorganismo puede detectarse por cualquier método adecuado conocido en la técnica. La lectura del ensayo puede requerir una resolución de hasta la célula individual. En particular, el microorganismo se detecta mediante microscopía de epifluorescencia, citometría de flujo, dispositivos de escaneo con láser, fluorometría de tiempo resuelto, detección por luminiscencia, detección por isótopos, escáner de visualización hiper espectral, Resonancia de Plasmón Superficial o/y otra tecnología de lectura basada en evanescencia.

Preferiblemente, la hibridación in-situ se combina con la detección de resistencia a antibiótico. Más preferiblemente, FISH se combina con detección de resistencia a antibióticos.

Se prefiere que la identificación del microorganismo y la detección del antibiótico marcado en el microorganismo se realicen subsecuentemente.

En una realización preferida alternativa, la identificación del microorganismo y la detección del antibiótico marcado en el microorganismo se realizan concurrentemente. En esta realización, el antibiótico marcado puede añadirse al tampón de hibridación. Después de la incubación, se lleva a cabo el tratamiento adicional como se describe en la presente memoria para la detección del microorganismo. Lo más preferiblemente, la hibridación in-situ y FISH, respectivamente, y la detección de la resistencia a antibióticos se llevan a cabo simultáneamente.

Preferiblemente, puede emplearse el mismo método de detección, tal como microscopía de epifluorescencia, citometría de flujo, dispositivos de escaneo con láser u otro método descrito en la presente memoria, tanto para la identificación del microorganismo como la detección del antibiótico marcado en el microorganismo.

Los ensayos de hibridación in-situ y de enzima o receptor exigen convencionalmente entornos específicos para sus ensayos respectivos del estado de la técnica. Por lo tanto, fue sorprendente que fuera posible

1. preparar las células para hibridación in-situ con poros con un tamaño suficiente para permitir el paso de oligonucleótidos de hasta 50-mer
2. hacer que las proteínas de membrana sean accesibles para los antibióticos marcados
3. mantener la integridad tanto de dichas proteínas como de ribosomas para permitir la unión específica de antibióticos marcados con fluoróforos
4. Encontrar sitios de unión suficientes para generar una señal visible bajo un microscopio de epifluorescencia, en particular bajo condiciones uniformes.

Se prefiere usar en el método de la presente invención un oligonucleótido con un fluoróforo que emite en un intervalo de longitud de onda predeterminado junto con un antibiótico marcado con otro fluoróforo que emite en un intervalo de longitud de onda, de manera que los dos fluoróforos pueden discriminarse por detección de luminiscencia. Por

ejemplo, uno de los fluoróforos, tal como Fluoresceína, puede emitir una señal verde, y el otro fluoróforo puede emitir una señal roja. Una lista de antibióticos modificados con un fluoróforo se recopila en la Tabla I.

La muestra biológica que comprende los microorganismos particulares puede pretratarse con el fin de facilitar la unión del antibiótico marcado y opcionalmente la identificación del microorganismo.

- 5 La muestra biológica puede fijarse con calor en un portaobjetos según sus sondas designadas (antibiótico marcado y opcionalmente una sonda para detectar el microorganismo), por ejemplo a aproximadamente 45 a aproximadamente 65°C, preferiblemente a aproximadamente 50 a aproximadamente 55°C, más preferiblemente a aproximadamente 52°C.

- 10 Si el microorganismo es una bacteria Gram positiva, puede perforarse con un tampón adecuado. Las células Gram positivas pueden perforarse con una bacteriocina o/y un detergente. En una realización preferida se combina un antibiótico con un detergente biológico, y una realización especialmente preferida NISINA se combina con Saponina. Además, pueden aplicarse enzimas líticas tales como Lisozima y Lisostafina. Las enzimas líticas pueden estar equilibradas en la ecuación. Si la muestra se trata con etanol, la concentración de los ingredientes activos puede equilibrarse respecto a su tratamiento posterior en etanol. En una realización más preferida, la concentración de Lisozima, Lisostafina, Nisina y Saponina se equilibra para abarcar todos los organismos Gram positivos con la excepción de Mycobacteria.

Un ejemplo de un Tampón de Perforación de Gram Positivas más preferido se proporciona en la Tabla 2. Se contempla que variaciones de las cantidades y concentraciones, y temperaturas de aplicación y tiempos de incubación están en la experiencia de la técnica.

- 20 Si el microorganismo es una levadura o un hongo, puede perforarse con un tampón adecuado. Sorprendentemente, se encontró que las paredes celulares de levaduras y hongos no formaban poros reproducibles cuando se tratan según procedimientos muy conocidos en la técnica. Estos procedimientos dan lugar frecuentemente a resultados tanto positivos falsos como negativos falsos. Una solución fiable es un tampón preferido que comprende una combinación de un antibiótico peptídico, detergente, agente acomplejante, y agente reductor. Un tampón más preferido comprende la combinación de una sal monovalente que genera una presión osmótica específica, una bacteriocina, una combinación de detergentes biológicos y sintéticos, un agente acomplejante para cationes divalentes, y un agente capaz de reducir puentes disulfuro. Una mejora sorprendente adicional se consiguió añadiendo enzimas proteolíticas específicas para procariontes. En un tampón incluso más preferido, se combinaron Saponina, SDS, Nisina, EDTA, DTT con Lisozima y una sal, por ejemplo en una concentración de aproximadamente 150 a aproximadamente 250 mM, más preferiblemente aproximadamente 200 a aproximadamente 230 mM, lo más preferiblemente aproximadamente 215 mM.

Un ejemplo de un Tampón de Perforación de Levaduras más preferido se proporciona en la Tabla 2. Se contempla que variaciones de las cantidades y concentraciones, y temperaturas de aplicación e incubación están en la experiencia de la técnica.

- 35 En otra realización preferida más, el método de la presente invención es un método de diagnóstico.

La presente invención se ilustra adicionalmente con los ejemplos siguientes y las tablas siguientes.

La **Tabla 1** describe los antibióticos y ejemplos de marcaje adecuados en el método de la presente invención.

La **Tabla 2** describe la composición de tampones de perforación empleados en la presente invención.

Tabla 3: Resistencia a antibióticos debida a mutaciones en el ARNr 23S.

- 40 **Tabla 4:** Mecanismo de resistencia a antibióticos en microorganismos y alteración en la cantidad de antibióticos marcados en microorganismos resistentes.

Ejemplo 1

- 45 Los antibióticos de la Tabla I se marcaron con FITC y se purificaron como es muy conocido en la técnica. La Clindamicina se modificó sustituyendo el grupo metilo unido al X'-S con cisteína mediante un enlace S-S. La cisteína unida se marcó con Fluorescamina bien mediante un éster de N-hidroxi-succinimida o FITC y se purificó con métodos muy conocidos en la técnica.

Ejemplo 2

Una resistencia a antibióticos, tal como una resistencia frente a penicilina, puede detectarse en un protocolo que comprende las etapas:

- 50 1 Aplicar la muestra biológica a portaobjetos, por ejemplo, 10 µl
2 Secar, por ejemplo a 52°C

- 3 Añadir tampón de perforación, por ejemplo 10µl
- 4 Secar
- 5 Añadir mezcla de sonda reconstituida (por ejemplo, 9 µl)
- 6 Añadir antibiótico (por ejemplo, FITC-penicilina)
- 5 7 Incubar, por ejemplo durante 15 min a 52°C
- 8 EtOH/Mezcla de parada (por ejemplo, 50%:50%), por ejemplo durante 5 min a RT
- 9 Etanol, por ejemplo 99% etanol durante 5 min
- 10 Secar
- 11 Medio de Montaje Salino Equilibrado (por ejemplo, una gota pequeña)
- 10 12 Leer

Ejemplo 3

La Tabla 4 indica la alteración de la cantidad de antibióticos marcados detectables en microorganismos clínicamente relevantes en su forma resistente respecto a su forma no resistente. La cantidad se expresa en % de cambio de fluorescencia (disminución e incremento, respectivamente) de un antibiótico que porta un marcador fluorescente.

15 **Tabla 1**

Antibióticos		
Nombre Genérico	Ejemplos de agente marcador	
<u>Aminoglicósidos</u>		
<u>Amicacina</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Gentamicina</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Kanamicina</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Neomicina</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Netilmicina</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Estreptomina</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Tobramicina</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Carbacefem</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Loracarbef</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Carbapenemos</u>		
<u>Ertapenem</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Imipenem</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Cilastatina</u>	FITC	Atto-495-NSI

ES 2 532 960 T3

Antibióticos		
Nombre Genérico	Ejemplos de agente marcador	
<u>Meropenem</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Cefalosporinas Primera generación</u>		
<u>Cefadroxil</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Cefazolina</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Cefalexina</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Cefalosporinas Segunda generación</u>		
<u>Cefaclor</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Cefamandol</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Cefoxitina</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Cefprozil</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Cefuroxima</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Cefalosporinas Tercera generación</u>		
<u>Cefixima</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Cefdinir</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Cefditoreno</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Cefoperazona</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Cefotaxima</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Cefpodoxima</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Ceftazidima</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Ceftibuteno</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Ceftizoxima</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Ceftriaxona</u>	FITC	Atto-495-NSI
Cefsulodina	FITC	Atto-495-NSI
<u>Cefalosporinas Cuarta generación</u>		
<u>Cefepima</u>	FITC	Atto-495-NSI

Antibióticos		
Nombre Genérico	Ejemplos de agente marcador	
<u>Glicopéptidos</u>		
<u>Teicoplanina</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Vancomicina</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Macrólidos</u>		
<u>Azitromicina</u>	Acoplamiento de FITC con Eritromicilamina	Acoplamiento de Eritromicilamina con Atto-495-NSI
<u>Claritromicina</u>		
<u>Diritromicina</u>		
<u>Eritromicina</u>		
<u>Roxitromicina</u>		
<u>Troleandomicina</u>		
<u>Monobactama</u>		
<u>Aztreonam</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Penicilinas</u>		
<u>Amoxicilina</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Ampicilina</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Azlocilina</u>		
<u>Carbenicilina</u>		
<u>Cloxacilina</u>		
<u>Dicloxacilina</u>		
<u>Flucloxacilina</u>		
<u>Mezlocilina</u>		
<u>Nafcilina</u>		
<u>Penicilina</u>		
<u>Piperacilina</u>		
<u>Ticarcilina</u>		

Antibióticos		
Nombre Genérico	Ejemplos de agente marcador	
<u>Polipéptidos</u>		
<u>Bacitracina</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Colistina</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Polimixina B</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Quinolonas</u>		
<u>Ciprofloxacina</u>		
<u>Enoxacina</u>		
<u>Gatifloxacina</u>		
<u>Levofloxacina</u>		
<u>Lomefloxacina</u>		
<u>Moxifloxacina</u>		
<u>Norfloxacina</u>		
<u>Ofloxacina</u>		
<u>Trovafloxacina</u>		
<u>Sulfonamidas</u>		
<u>Mafenida</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Prontosil</u>	FITC	Atto-495-NSI
(arcaico)		
<u>Sulfacetamida</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Sulfametizol</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Sulfanilimida</u>	FITC	Atto-495-NSI
(arcaico)		
<u>Sulfasalazina</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Sulfisoxazol</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Trimetoprima sulfa</u>	FITC	Atto-495-NSI

Antibióticos		
Nombre Genérico	Ejemplos de agente marcador	
<u>Trimetoprima</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Sulfametoxazol</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Co-trimoxazol</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>TMP-SMX</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Tetraciclinas</u>		
<u>Demeclociclina</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Doxiciclina</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Minociclina</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Oxitetraciclina</u>	FITC	Atto-495-NSI
<u>Tetraciclina</u>	FITC	Atto-495-NSI
Otros		
<u>Cloranfenicol</u>		
<u>Clindamicina</u>	Cisteína+FITC	Cisteína + Atto-495-NSI
<u>Etambutol</u>		
<u>Fosfomicina</u>		
<u>Furazolidona</u>		
<u>Isoniazid</u>		
<u>Linezolid</u>		
<u>Metronidazol</u>		
<u>Mupirocina</u>		
<u>Nitrofurantoina</u>		
<u>Platensimicina</u>		
<u>Pirazinamida</u>		
<u>Quinupristina/ Dalfopristina</u>		

ES 2 532 960 T3

Antibióticos		
Nombre Genérico	Ejemplos de agente marcador	
<u>Rifampina</u>		
<u>Espectinomicina</u>		
Amfotericina B	FITC	Atto-495-NSI
Fluconazol		
Fluoropirimidinas		

Tabla 2

Tampón de Perforación de Gram-Positivas-	50	$\mu\text{g/ml}$	Saponina
	5	$\mu\text{g/ml}$	Nisina
	20	mM	Tris pH 8
	100	$\mu\text{g/m}$	Lisozima
	50	$\mu\text{g/ml}$	Lisostafina
			H ₂ O

	Disol. de trabajo		
Tampón de Perforación de Levaduras	500	$\mu\text{g/ml}$	Saponina
	10	$\mu\text{g/ml}$	Nisina
	50	mM	Tris pH 8,3
	215	mM	NaCl
	0,1	%	SDS
	5	mM	EDTA
	10	mM	DTT
	100	$\mu\text{g/ml}$	Lisozima
			H ₂ O

Tabla 3: Recopilación de resistencia a antibióticos debida a mutaciones en el ARNr 23S

Tipo de ARN	Posición	Alteración/ Alteraciones	Fenotipo	Organismo	Referencia
23S	2032	AG a GA	Clr/Azm/Ery-R	Helicobacter pylori	Hulten, K., A. Gibreel, O. Sköld, y L. Engstrand. 1997. Macrolide resistance in Helicobacter pylori: mechanism and stability in strains from clarithromycin-treated patients. Antimicrob. Agents Chemother. 41:2550-2553.
23S	2058	A a C	Clr-R	Helicobacter pylori	Stone, G. G., D. Shortridge, R. K. Flamm, J. Versalovic, J. Beyer, K. Ilder, L. Zulawinski, y S. K. Tanaka. 1996. Identification of a 23S rRNA gene mutation in clarithromycin-resistant Helicobacter pylori. Helicobacter. 1:227-228.
23S	2058	A a C	Mac-R, Lin-R	Helicobacter pylori	Occhialini, A., M. Urdaci, F. Doucet-Populaire, C. M. Bébear, H. Lamouliatte, y F. Mégrand. 1997. Macrolide resistance in Helicobacter pylori: rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes. Antimicrob. Agents Chemother. 41:227-228.
23S	2058	A a C	MLSB -R	Helicobacter pylori	Wang, G., y D. E. Taylor. 1998. Site-specific mutations in the 23S rRNA gene of Helicobacter pylori confer two types of resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. 42:1952-1958.
23S	2058	A a C	Cla-R	Helicobacter pylori	Debets-Ossenkopp, Y. J., A. B. Brinkman, E. J. Kuipers, C. M. Vandenbroucke-Grauls, y J. G. Kusters. 1998. Explaining the bias in the 23S rRNA gene mutations associated with clarithromycin resistance in clinical isolates of Helicobacter pylori. Antimi
23S	2058	A a G	Cla-R	Helicobacter pylori	Versalovic, J., D. Shortridge, K. Kibler, M. V. Griffy, J. Beyer, R. K. Flamm, S. K. Tanaka, D. Y. Graham, y M. F. Go. 1996. Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in Helicobacter pylori. Antimicrob. Agents Chemother. 40:4

Tipo de ARN	Posición	Alteración/ Alteraciones	Fenotipo	Organismo	Referencia
23S	2058	A a G	Mac-R, Lin-R	Helicobacter pylori	Occhialini, A., M. Urdaci, F. Doucet-Populaire, C. M. Bébéar, H. Lamoullaitte, y F. Mégraud. 1997. Macrolide resistance in Helicobacter pylori: rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes. Antimicrob. Agents Chemothe
23S	2058	A a G	MLSB -R	Helicobacter pylori	Wang, G., y D. E. Taylor. 1998. Site-specific mutations in the 23S rRNA gene of Helicobacter pylori confer two types of resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics. Antimicrob. Chemother. 42:1952-1958.
23S	2058	A a G	Cla-R	Helicobacter pylori	Debets-Ossenkopp, Y. J., A. B. Brinkman, E. J. Kuipers, C. M. Vandenbroucke-Grauls, y J. G. Kusters. 1998. Explaining the bias in the 23S rRNA gene mutations associated with clarithromycin resistance in clinical isolates of Helicobacter pylori. Antimi
23S	2058	A a U	MLSB -R	Helicobacter pylori	Wang, G., y D. E. Taylor. 1998. Site-specific mutations in the 23S rRNA gene of Helicobacter pylori confer two types of resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. 42:1952-1958.
23S	2058	A a U	Cla-R	Helicobacter pylori	Debets-Ossenkopp, Y. J., A. B. Brinkman, E. J. Kuipers, C. M. Vandenbroucke-Grauls, y J. G. Kusters. 1998. Explaining the bias in the 23S rRNA gene mutations associated with clarithromycin resistance in clinical isolates of Helicobacter pylori. Antimi
23S	2059	A a C	Mac-R, Lin-R, SB-S	Helicobacter pylori	Wang, G., y D. E. Taylor. 1998. Site-specific mutations in the 23S rRNA gene of Helicobacter pylori confer two types of resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. 42:1952-1958.

Tipo de ARN	Posición	Alteración/ Alteraciones	Fenotipo	Organismo	Referencia
23S	2059	A a C	Cl-R	Helicobacter pylori	Debets-Ossenkopp, Y. J., A. B. Brinkman, E. J. Kuipers, C. M. Vandenbroucke-Grauls, y J. G. Kusters. 1998. Explaining the bias in the 23S rRNA gene mutations associated with clarithromycin resistance in clinical isolates of Helicobacter pylori. Antimi
23S	2059	A a G	Cl-R	Helicobacter pylori	Versalovic, J., D. Shortridge, K. Kibler, M. V. Griffy, J. Beyer, R. K. Flamm, S. K. Tanaka, D. Y. Graham, y M. F. Go. 1996. Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in Helicobacter pylori. Antimicrob. Agents Chemother. 40:4
23S	2059	A a G	Mac-R, Lin-R	Helicobacter pylori	Occhialini, A., M. Urdaci, F. Doucet-Populaire, C. M. Bébéar, H. Lamouliatte, y F. Mégraud. 1997. Macrolide resistance in Helicobacter pylori: rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes. Antimicrob. Agents Chemothe
23S	2059	A a G	Mac-R, Lin-R, SB-S	Helicobacter pylori	Wang, G., y D. E. Taylor. 1998. Site-specific mutations in the 23S rRNA gene of Helicobacter pylori confer two types of resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin B antibióticos. Antimicrob. Agents Chemother. 42:1952-1958.
23S	2059	A a G	Cl-R	Helicobacter pylori	Debets-Ossenkopp, Y. J., A. B. Brinkman, E. J. Kuipers, C. M. Vandenbroucke-Grauls, y J. G. Kusters. 1998. Explaining the bias in the 23S rRNA gene mutations associated with clarithromycin resistance in clinical isolates of Helicobacter pylori. Antimi
23S	754	"U a A"	Resistente a bajas concentraciones de quetólido HMR3647; resistente a eritromicina b.	E. coli	Xiong L, Shah S, Mauvais P, Mankin AS. 1999. A ketolide resistance mutation in domain II of 23S rRNA reveals the proximity of hairpin 35 to the peptidyl transferase center. Molecular Microbiology 31 (2): 633-639.

Tipo de ARN	Posición	Alteración/ Alteraciones	Fenotipo	Organismo	Referencia
23S	754	"U a A"	Confiere resistente a macrólido y quetólido.	E. coli	Hansen L.H., Mauvais P, Douthwaite S. 1999. The macrolide-ketolide antibiotic binding site is formed by structures in domain II y V of 23S ribosomal RNA. Molecular Microbiology 31 (2): 623-631.
23S	754	U a A	Ery-LR, Tel-LR	Escherichia coli	Xiong, L., S. Shah, P. Mauvais, y A. S. Mankin. 1999. A ketolide resistance mutation in domain II of 23S rRNA reveals the proximity of hairpin 35 to the peptidyl transferase centre. Mol. Microbiol. 31:633-639.
23S	1005	C a G	Crecimiento lento bajo el promotor natural; (con 2058G y eritromicina) retraso grave en el crecimiento. A	E. coli	1) Rosendahl, G. y Douthwaite, S. (1995) Nucleic Acids Res. 23, 2396-2403. 2) Rosendahl, G., Hansen, L.H., y Douthwaite, S. (1995) J. Mol. Biol. 249, 59-68.
23S	1005	C a G	Crecimiento lento bajo el promotor pL; (con 2058G y eritromicina) Erys. a Doble mutante (C-1005G/C-1006U)	E. coli	1) Rosendahl, G. y Douthwaite, S. (1995) Nucleic Acids Res. 23, 2396-2403. 2) Rosendahl, G., Hansen, L.H., y Douthwaite, S. (1995) J. Mol. Biol. 249, 59-68.
23S	1006	C a U	Crecimiento lento bajo el promotor pL; (con 2058G y eritromicina) Erys. a Doble mutante (C-1005G/C-1006U)	E. coli	1) Rosendahl, G. y Douthwaite, S. (1995) Nucleic Acids Res. 23, 2396-2403. 2) Rosendahl, G., Hansen, L.H., y Douthwaite, S. (1995) J. Mol. Biol. 249, 59-68.
23S	1006	C a U	Letal bajo el promotor natural; bajo el promotor pL; (con 2058G y eritromicina) Erys. A	E. coli	1) Rosendahl, G. y Douthwaite, S. (1995) Nucleic Acids Res. 23, 2396-2403. 2) Rosendahl, G., Hansen, L.H., y Douthwaite, S. (1995) J. Mol. Biol. 249, 59-68.
23S	1056	G a A	La unión tanto de L11 y tiosstreptona se debilita en fragmentos de ARN. B	E. coli	Ryan, P.C. y Draper, D.E. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 6308-6312.
23S	1056	G a A	Unión estequiométrica de L11.b (con 2058G y eritromicina) Velocidad de crecimiento reducida. a	E. coli	1) Douthwaite, S y Aagaard, C. (1993) J. Mol. Biol. 232, 725-731. 2) Rosendahl, G. y Douthwaite, S. (1995) Nucleic Acids Res. 23, 2396-2403.
23S	1056	G a C	La unión de tiosstreptona se debilita en fragmentos de ARN. B	E. coli	Ryan, P.C. y Draper, D.E. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 6308-6312.

Tipo de ARN	Posición	Alteración/ Alteraciones	Fenotipo	Organismo	Referencia
23S	1064	C a U	Unión estequiométrica de L11.b (con 2058G y eritromicina) Velocidad de crecimiento reducida. a	E. coli	1) Douthwaite, S. and Aagaard, C. (1993) J. Mol. Biol. 232, 725-731. 2) Rosendahl, G. y Douthwaite, S. (1995) Nucleic Acids Res. 23, 2396-2403.
23S	1067	A a U	Crecimiento normal	E. coli	1) Spahn, C., Remme, J., Schafer, M. y 1) Remme, Schafer, Nierhaus, K. (1996). J. Biol. Chem. 271: 32849-32856. 2) Spahn, C., Remme, J., Schafer, M. y Nierhaus, K. (1996). J. Biol. Chem. 271: 32857-32862.
23S	1067	A a G	Resistencia a tiosstreptona en Halobacterium sp.	Halobacterium	Hummel, H., y A. Bock. (1987) Biochimie 69:857-861.
23S	1067	A a U	Resistencia a tiosstreptona en Halobacterium sp.	Halobacterium	Hummel, H., y A. Bock. (1987) Biochimie 69:857-861.
23S	1067	A a U	A a C o U confiere nivel alto de resistencia a tiosstreptona, mientras A a G confiere nivel intermedio de resistencia; la afinidad de unión a fármacos se reduce de manera similar. a, b La expresión por la ARN polimerasa del huésped resulta en la formación de subunidades ribosomales activas in vivo. A	E. coli	1) Thompson, J. y Cundliffe, E. (1991) Biochimie 73: 1131-1135. 2) Thompson, J., Cundliffe, E. y Dahlberg, A.E. (1988) J. Mol. Biol. 203: 457-465. 3) Lewicki, B.T.U., Margus, T., Remme, J. y Nierhaus, K.H. (1993) J. Mol. Biol. 231, 581-593. 4) LAST
23S	1067	A a C	A a C o U confiere nivel alto de resistencia a tiosstreptona, mientras A a G confiere nivel intermedio de resistencia; la afinidad de unión a fármacos se reduce de manera similar. a, b La expresión por la ARN polimerasa del huésped resulta en la formación de subunidades ribosomales activas in vivo. A	E. coli	1) Thompson, J. y Cundliffe, E. (1991) Biochimie 73: 1131-1135. 2) Thompson, J., Cundliffe, E. y Dahlberg, A.E. (1988) J. Mol. Biol. 203: 457-465. 3) Lewicki, B.T.U., Margus, T., Remme, J. y Nierhaus, K.H. (1993) J. Mol. Biol. 231, 581-593. 4) LAST

Tipo de ARN	Posición	Alteración/ Alteraciones	Fenotipo	Organismo	Referencia
23S	1067	A a G	A a C o U confiere nivel alto de resistencia a tiosstreptona, mientras A a G confiere nivel intermedio de resistencia; la afinidad de unión a fármacos se reduce de manera similar. a, b La expresión por la ARN polimerasa del huésped resulta en la formación de subunidades ribosomales activas in vivo. A	E. coli	1) Thompson, J. y Cundliffe, E. (1991) Biochimie 73:1131-1135. 2) Thompson, J., Cundliffe, E. y Dahlberg, A.E. (1988) J. Mol. Biol. 203: 457-465. 3) Lewicki, B.T.U., Margus, T., Remme, J. y Nierhaus, K.H. (1993) J. Mol. Biol. 231, 581-593. 4) LAST
23S	1067	"A a U"	El 30% constituido del combinado total de ARNr 23S en los ribosomas, presentó 30% de resistencia a tiosstreptona en traducción poli (U) b.	E. coli	Liiv A, Remme J. 1998. Base-pairing of 23S rRNA ends is essential for ribosomal large subunit assembly. J. Mol. Biol. 285: 965-975.
23S	1068	G a A	Unión reducida de L11. b (con 2058G) Letal cuando se expresa a partir del promotor rrnB o pL en presencia de eritromicina. A	E. coli	1) Rosendahl, G. y Douthwaite, S. (1995) Nucleic Acids Res. 23, 2396-2403. 2) Douthwaite, S y Aagaard, C. (1993) J. Mol. Biol. 232: 725-731.
23S	1068	G a A	Supresión de 1068A; letalidad sólo en ausencia de eritromicina. a Doble mutante (G1068A/G1099A)	E. coli	Rosendahl, G. y Douthwaite, S. (1995) Nucleic Acids Res. 23, 2396-2403.
23S	1072	C a U	Letal cuando se expresa a partir del promotor rrnB o pL en presencia de eritromicina. a	E. coli	Rosendahl, G. y Douthwaite, S. (1995) Nucleic Acids Res. 23, 2396-2403.
23S	1137	G a A	Con 2058G y eritromicina, letal cuando se expresa a partir del promotor rrnB.	E. coli	Rosendahl, G., Hansen, L.H., y Douthwaite, S. (1995) J. Mol. Biol. 249, 59-68.
23S	1137	G a A	Restaura el crecimiento normal bajo el promotor pL; (Con 2058G y eritromicina) Eyr. Doble mutante (G1137A/C1006U)	E. coli	Rosendahl, G., Hansen, L.H., y Douthwaite, S. (1995) J. Mol. Biol. 249, 59-68.
23S	1137	G a A	Con 2058G y eritromicina, letal cuando se expresa a partir del promotor rrnB. Doble mutante (G1137A/G1138C)	E. coli	Rosendahl, G., Hansen, L.H., y Douthwaite, S. (1995) J. Mol. Biol. 249, 59-68.

Tipo de ARN	Posición	Alteración/ Alteraciones	Fenotipo	Organismo	Referencia
23S	1138	G a C	Con 2058G y eritromicina, letal cuando se expresa a partir del promotor rrmB.	E. coli	Rosendahl, G., Hansen, L.H., y Douthwaite, S. (1995) J. Mol. Biol. 249, 59-68.
23S	1138	G a C	Con 2058G y eritromicina, letal cuando se expresa a partir del promotor rrmB. Doble mutante (G1138C/G1137A)	E. coli	Rosendahl, G., Hansen, L.H., y Douthwaite, S. (1995) J. Mol. Biol. 249, 59-68.
23S	1207	C a U	Resistente a eritromicina. a Doble mutante (C1207U/C1243U)	E. coli	Dam, M., Douthwaite, S., Tenson, T. y Mankin, A.S. (1996) J. Mol. Biol. 259, 1-6.
23S	1208	C a U	Resistente a eritromicina. a Doble mutante (C1208U/C1243U)	E. coli	Dam, M., Douthwaite, S., Tenson, T. y Mankin, A.S. (1996) J. Mol. Biol. 259, 1-6.
23S	1211	C a U	Sensible a eritromicina. a Doble mutante (C1211U/C1208U)	E. coli	Dam, M., Douthwaite, S., Tenson, T. y Mankin, A.S. (1996) J. Mol. Biol. 259, 1-6.
23S	1220	G a A	Resistente a eritromicina. a Doble mutante (G1220A/G1239A)	E. coli	Dam, M., Douthwaite, S., Tenson, T. y Mankin, A.S. (1996) J. Mol. Biol. 259, 1-6.
23S	1221	C a U	Resistente a eritromicina. a Doble mutante (C1221U/C1229U)	E. coli	Dam, M., Douthwaite, S., Tenson, T. y Mankin, A.S. (1996) J. Mol. Biol. 259, 1-6.
23S	1221	C a U	Resistente a eritromicina. a Doble mutante (C1221U/C1233U)	E. coli	Dam, M., Douthwaite, S., Tenson, T. y Mankin, A.S. (1996) J. Mol. Biol. 259, 1-6.
23S	1230	1230	Sensible a eritromicina. a Doble delección (1230/1231)	E. coli	Douthwaite, S., Powers, T., Lee, J.Y., y Noller, H.F. (1989) J. Mol. Biol. 209, 655-665.
23S	1231	1231	Sensible a eritromicina. a Doble delección (1231/1230)	E. coli	Douthwaite, S., Powers, T., Lee, J.Y., y Noller, H.F. (1989) J. Mol. Biol. 209, 655-665.
23S	1232	G a A	Sensible a eritromicina. a Doble mutante (G1232A/G1238A)	E. coli	Dam, M., Douthwaite, S., Tenson, T. y Mankin, A.S. (1996) J. Mol. Biol. 259, 1-6.

Tipo de ARN	Posición	Alteración/ Alteraciones	Fenotipo	Organismo	Referencia
23S	1233	C a U	Sensible a eritromicina. a	E. coli	Dam, M., Douthwaite, S., Tenson, T. y Mankin, A.S. (1996) J. Mol. Biol. 259, 1-6.
23S	1234	"del1234/del1235"	Sensible a eritromicina. a Doble mutante (U1234C/del1235)	E. coli	Douthwaite, S., Powers, T., Lee, J.Y., y Noller, H.F. (1989) J. Mol. Biol. 209, 655-665.
23S	1234	U a C	Sensible a eritromicina. a	E. coli	Douthwaite, S., Powers, T., Lee, J.Y., y Noller, H.F. (1989) J. Mol. Biol. 209, 655-665.
23S	1243	C a U	Resistente a eritromicina. a Doble mutante (C1243U/C1208U)	E. coli	Douthwaite, S., Powers, T., Lee, J.Y., y Noller, H.F. (1989) J. Mol. Biol. 209, 655-665.
23S	1243	C a U	Resistente a eritromicina. a Doble mutante (C1243U/C1221U)	E. coli	Douthwaite, S., Powers, T., Lee, J.Y., y Noller, H.F. (1989) J. Mol. Biol. 209, 655-665.
23S	1243	"C a U"	Resistente a eritromicina. a Doble mutante (C1243U/C1207).	E. coli	Douthwaite, S., Powers, T., Lee, J.Y., Douthwaite, T., y Noller, H.F. (1989) J. Mol. Biol. 209, 655-665.
23S	1262	A a G	Con eritromicina; letal	E. coli	Aagaard, C., y Douthwaite, S. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2989-2993.
23S	1262	A a C	Con eritromicina; letal	E. coli	Aagaard, C., y Douthwaite, S. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2989-2993.
23S	1262	A a U	Con eritromicina; velocidad de crecimiento reducida	E. coli	Aagaard, C., y Douthwaite, S. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2989-2993.
23S	1262	A a C	Con eritromicina; velocidad de crecimiento reducida Doble mutante (A1262C/U2017G)	E. coli	Aagaard, C., y Douthwaite, S. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2989-2993.
23S	1262	A a G	Supresión de los efectos en el crecimiento; Crecimiento de tipo salvaje en eritromicina Doble mutante (A1262G/U2017C)	E. coli	Aagaard, C., y Douthwaite, S. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2989-2993.

Tipo de ARN	Posición	Alteración/ Alteraciones	Fenotipo	Organismo	Referencia
23S	1262	A a U	Supresión de los efectos en el crecimiento; Crecimiento de tipo salvaje en eritromicina Doble mutante (A1262U/U2017A)	E. coli	Aagaard, C., y Douthwaite, S. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2989-2993.
23S	1262	A a U	Con eritromicina; velocidad de crecimiento reducida Doble mutante (A1262U/U2017G)	E. coli	Aagaard, C., y Douthwaite, S. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2989-2993.
23S	1423	G a A	Requerimiento suprimido para ARNr 4.5S en la traducción de ARNm naturales por extractos celulares c	E. coli	O'Connor, M., Brunelli, C. A., Firpo, M.A., Gregory, S.T., Lieberman, K.R., Lodmell, J.S., Moine, H., Van Ryk, D.I. y Dahlberg, A.E. (1995) Biochem. Cell Biology 73, 859-868.
23S	1698	A a G	Suprime 2555 mutaciones	E. coli	O'Connor y Dahlberg, no publicado
23S	2017	"U a G"	Velocidad de crecimiento reducida en eritromicina.	E. coli	Aagaard, C. y Douthwaite, S. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2989-2993.
23S	2017	"U a C"	Velocidad de crecimiento reducida en eritromicina.	E. coli	Aagaard, C. y Douthwaite, S. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2989-2993.
23S	2017	"U a A"	Velocidad de crecimiento reducida en eritromicina.	E. coli	Aagaard, C. y Douthwaite, S. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2989-2993.
23S	2017	"U a C"	Velocidad de crecimiento reducida en eritromicina. Doble mutación (U2017C/A1262G)	E. coli	Aagaard, C. y Douthwaite, S. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2989-2993.
23S	2017	"U a G"	Velocidad de crecimiento reducida en eritromicina. Doble mutación (U2017G/A1262C)	E. coli	Aagaard, C. y Douthwaite, S. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2989-2993.
23S	2017	"U a G"	Velocidad de crecimiento reducida en eritromicina. Doble mutación (U2017G/A1262U)	E. coli	Aagaard, C. y Douthwaite, S. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2989-2993.

Tipo de ARN	Posición	Alteración/ Alteraciones	Fenotipo	Organismo	Referencia
23S	2032	"G a A"	Resistencia a lincomicina.	Cloroplastos de tabaco	Cseplö, A., Etzold, T., Schell, J., y Schreier, P.H. (1988) Mol. Genet. 214, 295-299.
23S	2032	"G a A"	EryS, Cds, Cms. Double mutation (G2032A/A2058G)	E. coli	1. Douthwaite, S. (1992) J. Bacteriol. 174, 1333-1338. 2. Aagaard, C. y Douthwaite, S. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2989-2993. 3. Vester, B., Hansen, L.H., y Douthwaite, S. (1995) RNA 1, 501-509.
23S	2032	"G a A"	Eryhs, Cds, Cms. Doble mutación (G2032A/A2058U)	E. coli	1. Douthwaite, S. (1992) J. Bacteriol. 174, 1333-1338. 2. Aagaard, C. y Douthwaite, S. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2989-2993. 3. Vester, B., Hansen, L.H., y Douthwaite, S. (1995) RNA 1, 501-509.
23S	2032	"G a A"	Eryr, Cdr, Cmr. Doble mutación (G2032A/G2057A)	E. coli	1. Douthwaite, S. (1992) J. Bacteriol. 174, 1333-1338. 2. Aagaard, C. y Douthwaite, S. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2989-2993. 3. Vester, B., Hansen, L.H., y Douthwaite, S. (1995) RNA 1, 501-509.
23S	2032	AG a GA	Clr/Azm/Ery-R	Helicobacter pylori	Hülten, K., A. Gibreei, O. Sköld, y L. Engstrand. 1997. Macrolide resistance in Helicobacter pylori: mechanism and stability in strains from clarithromycin-treated patients. Antimicrob. Agents Chemother. 41:2550-2553.
23S	2051	"del A"	Previene la metilación de ErmE. c	E. coli	Vester B, Nielsen AK, Hansen LH, Douthwaite S. 1998. ErmE Methyltransferase Recognition Elements in RNA Substrates. J. Mol. Biol. 282: 255-264.
23S	2052	"A a C"	Previene la metilación de ErmE. c	E. coli	Vester B, Nielsen AK, Hansen LH, Douthwaite S. 1998. ErmE Methyltransferase Recognition Elements in RNA Substrates. J. Mol. Biol. 282: 255-264.
23S	2052	"A a G"	Como A2052C c	E. coli	Vester B, Nielsen AK, Hansen LH, Douthwaite S. 1998. ErmE Methyltransferase Recognition Elements in RNA Substrates. J. Mol. Biol. 282: 255-264.

Tipo de ARN	Posición	Alteración/ Alteraciones	Fenotipo	Organismo	Referencia
23S	2052	"A a U"	Como A2052C. c	E. coli	Vester B, Nielsen AK, Hansen LH, Douthwaite S. 1998. ErmE Methyltransferase Recognition Elements in RNA Substrates. J. Mol. Biol. 282: 255-264.
23S	2057	"G a A"	Eyr, Clindamicina (Cd)s, Cloranfemicol (Cm)r; reduce la metilación de ARNr 23S por ErmE.	E. coli	1. Ettayebi, M., Prasad, S.M., y Morgan, E.A. (1985) J. Bacteriol. 162, 551-557 2. Aagaard, C. y Douthwaite, S. (1994) Pro. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2989-2993. 3. Vester, B., Hansen, L.H., y Douthwaite, S. (1995) RNA 1, 501-509.
23S	2057	"G a A"	Eyrr.	Chlamydomonas reinhardtii	Harris, E.H., Burkhardt, B.D., Gilham, N.W., y Boynton, J.E. (1989) Genetics 123, 281-292.
23S	2057	"G a A"	Ligeramente Eyr; metilación reducida. Doble mutación (G2057A/C2661U)	E. coli	Vester, B., Hansen, L.H., y Douthwaite, S. (1995) RNA 1, 501-509.
23S	2057	"G a A"	Eyr, Cdr, Cmr. Doble mutación (G2057A/G2032A)	E. coli	1. Douthwaite, S. (1992) J. Bacteriol. 174, 1333-1338. 2. Aagaard, C. y Douthwaite, S. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2989-2993. 3. Vester, B., Hansen, L.H., y Douthwaite, S. (1995) RNA 1, 501-509.
23S	2057	G a A	Ery-R, Lin-S	Chlamydomonas reinhardtii chl.	Harris, E. H., B.D. Burkhardt, N. W. Gilham, y J. E. Boynton. 1989. Antibiotic resistance mutations in the chloroplast 16S and 23S rRNA genes of Chlamydomonas reinhardtii: correlation of genetic and physical maps of the chloroplast genome. Genetics.
23S	2057	G a A	Ery-R, M16-S, Lin-S, SB-S	Escherichia coli	Ettayebi, M., S. M. Prasad, y E. A. Morgan. 1985. Chloramphenicol-erythromycin resistance mutations in a 23S rRNA gene of Escherichia coli. J. Bacteriol. 162:551-557.
23S	2057	G a A	Ery-LR, M16-S	Propionibacterias	Ross, J. I., E. A. Eady, J. H. Cove, C. E. Jones, A. H. Ratyal, y W. Miller, S. Vyakrnam, y W. J. Cunliffe. 1997. Clinical resistance to erythromycin and clindamycin in cutaneous propionibacteria isolated from acne patients is associated with mutatio

Tipo de ARN	Posición	Alteración/ Alteraciones	Fenotipo	Organismo	Referencia
23S	2057	GG a AA	Ery-R, Lin-R	Escherichia coli	Douthwaite, S. 1992. Functional interactions within 23S rRNA involving the peptidyltransferase center. J. Bacteriol. 174:1333-1338.
23S	2058	"A a G"	Eryr, resistencia a clindamicina y a lincomicina.	Chlamydomonas reinhardtii	Harris, E.H., Burkhardt, B.D., Gilham, N.W., y Boynton, J.E. (1989) Genetics 123, 281-292.
23S	2058	"A a G"	Resistencia a claritromicina	Helicobacter pylori	Versalovic, J., Shortridge, D., Kibler, K., Griffy, M.V., Beyer, J., Flamm, R.K., Tenaka, S.K., Graham, D.Y., y Go, M.F. (1996) Antimicrob. Agents Chemother. 40, 477-480.
23S	2058	"A a G"	Eryr, Cdr, Cms; suprime metilación de ARNr 23S por ErmE.	E.coli	1. Vester, B. y Garrett, R.A. (1988) EMBO J. 7, 3577-3587. 2. Aagaard, C. y Douthwaite, S. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2989-2993. 3. Vester, B., Hansen, L.H., y Douthwaite, S. (1995) RNA 1, 501-509.
23S	2058	"A a G"	Resistencia a eritromicina.	Mitocondrias de levadura	Sor, F. y Fukuhara, H. (1982) Nucleic Acids Res. 10, 6571-6577.
23S	2058	"A a G"	Resistencia a lincomicina.	Solanum nigrum	Kavanagh, T.A., O'Driscoll, K.M., McCabe, P.F., y Dix, P.J. (1994) Mol. Gen. Genet. : 242, 675-680.
23S	2058	"A a G"	Resistencia a lincomicina.	Citroplastos de tabaco	Cseplö, A., Etzold, T., Schell, J., y Schreier, P.H. (1988) Mol. Genet. 214, 295-299.
23S	2058	"A a G"	EryS, Cds, Cms. Doble mutación (A2058G/G2032A)	E. coli	1. Douthwaite, S. (1992) J. Bacteriol. 174, 1333-1338. 2. Aagaard, C. y Douthwaite" S. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2989-2993. 3. Vester, B., Hansen, L.H., y Douthwaite, S. (1995) RNA 1, 501-509.
23S	2058	"A a U"	Eryhs, Cds, Cms. Doble mutación (A2058U/G2032A)	E. coli	1. Douthwaite, S. (1992) J. Bacteriol. 174, 1333-1338. 2. Aagaard, C. y Douthwaite, S. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2989-2993. 3. Vester, B., Hansen, L.H., y Douthwaite, S. (1995) RNA 1, 501-509.

Tipo de ARN	Posición	Alteración/ Alteraciones	Fenotipo	Organismo	Referencia
23S	2058	"A a C"	Confiere resistencia a los fármacos MLS y cloranfenicol.	E. coli	Hansen LH, Mauvais P, Douthwaite S. 1999. The macrolide-ketolide antibiotic binding site is formed by structures in domains II and V of 23S ribosomal RNA. <i>Molecular Microbiology</i> 31 (2): 623-631.
23S	2058	"A a G"	Como A2058C	E. coli	Hansen LH, Mauvais P, Douthwaite S. 1999. The macrolide-ketolide antibiotic binding site is formed by structures in domains II and V of 23S ribosomal RNA. <i>Molecular Microbiology</i> 31 (2): 623-631.
23S	2058	"A a U"	Como A2058C	E. coli	Hansen LH, Mauvais P, Douthwaite S. 1999. The macrolide-ketolide antibiotic binding site is formed by structures in domains II and V of 23S ribosomal RNA. <i>Molecular Microbiology</i> 31 (2): 623-631.
23S	2058	A a G/U	Ery-R, Tyl-R, Lin-R	Brachyspira hyodysenteriae	Karlsson, M., C. Fellstrom, M. U. Heldtander, K. E. Johansson, y A. Franklin. 1999. Genetic basis of macrolide and lincosamide resistance in <i>Brachyspira</i> (Serpulina) hyodysenteriae. <i>FEMS Microbiol. Lett.</i> 172:255-260.
23S	2058	A a G	Ery-R, Lin-R	Chlamydomonas reinhardtii chl.	Harris, E. H., B. D. Burkhardt, N. W. Gillham, y J. E. Boynton. 1989. Antibiotic resistance mutations in the chloroplast 16S and 23S rRNA genes of <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> : correlation of genetic and physical maps of the chloroplast genome. <i>Genetics</i>
23S	2058	A a G	Ery-R, Lin-R	Escherichia coli	Douthwaite, S. 1992. Functional interactions within 23S rRNA involving the peptidyltransferase center. <i>J. Bacteriol.</i> 174:1333-1338. Vester, B., y R. A. Garrett. 1987. A plasmid-coded and site-directed mutation in <i>Escherichia coli</i> 23S RNA that confers
23S	2058	A a U	MLSB-R	Escherichia coli	Sigmund, C. D., M. Ettayebi, y E. A. Morgan. 1984. Antibiotic resistance mutations in 16S and 23S ribosomal RNA genes of <i>Escherichia coli</i> . <i>Nucl Acids Res.</i> 12:4653-4663.

Tipo de ARN	Posición	Alteración/ Alteraciones	Fenotipo	Organismo	Referencia
23S	2058	A a C	Cla-R	Helicobacter pylori	Stone, G. G., D. Shortridge, R. K. Flamm, J. Versalovic, J. Beyer, K. Idler, L. Zulawinski, y S. K. Tanaka. 1996. Identification of a 23S rRNA gene mutation in clarithromycin-resistant Helicobacter pylori. Helicobacter. 1:227-228.
23S	2058	A a C	Mac-R, Lin-R	Helicobacter pylori	Occhialini, A., M. Urdaci, F. Doucet-Populaire, C. M. Bébéar, H. Lamouliatte, y F. Mégraud. 1997. Macrolide resistance in Helicobacter pylori: rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes. Antimicrob. Agents Chemothe
23S	2058	A a C	MLSB-R	Helicobacter pylori	Wang, G., y D. E. Taylor. 1998. Site-specific mutations in the 23S rRNA gene of Helicobacter pylori confer two types of resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics. Antimicrob. Agents Chemothe. 42:1952-1958.
23S	2058	A a C	Cla-R	Helicobacter pylori	Debets-Ossenkopp, Y. J., A. B. Brinkman, E. J. Kuipers, C. M. Vandenbroucke-Grauls, y J. G. Kusters. 1998. Explaining the bias in the 23S rRNA gene mutations associated with clarithromycin resistance in clinical isolates of Helicobacter pylori. Antimi
23S	2058	A a G	Cla-R	Helicobacter pylori	Versalovic, J., D. Shortridge, K. Kibler, M. V. Griffy, J. Beyer, R. K. Flamm, S. K. Tanaka, D. Y. Graham, y M. F. Go. 1996. Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in Helicobacter pylori. Antimicrob. Agents Chemothe. 40:4
23S	2058	A a G	Mac-R, Lin-R	Helicobacter pylori	Occhialini, A., M. Urdaci, F. Doucet-Populaire, C. M. Bébéar, H. Lamouliatte, y F. Mégraud. 1997. Macrolide resistance in Helicobacter pylori: rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes. Antimicrob. Agents Chemothe

Tipo de ARN	Posición	Alteración/ Alteraciones	Fenotipo	Organismo	Referencia
23S	2058	A a G	MLS ^B -R	Helicobacter pylori	Wang, G., y D. E. Taylor. 1998. Site-specific mutations in the 23S rRNA gene of Helicobacter pylori confer two types of resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. 42:1952-1958.
23S	2058	A a G	Cla-R	Helicobacter pylori	Debets-Ossenkopp, Y. J., A. B. Brinkman, E. J. Kuipers, C. M. Vandenbroucke-Grauls, y J. G. Kusters. 1998. Explaining the bias in the 23S rRNA gene mutations associated with clarithromycin resistance in clinical isolates of Helicobacter pylori. Antimi
23S	2058	A a U	MLS ^B -R	Helicobacter pylori	Wang, G., y D. E. Taylor. 1998. Site-specific mutations in the 23S rRNA gene of Helicobacter pylori confer two types of resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. 42:1952-1958.
23S	2058	A a U	Cla-R	Helicobacter pylori	Debets-Ossenkopp, Y. J., A. B. Brinkman, E. J. Kuipers, C. M. Vandenbroucke-Grauls, y J. G. Kusters. 1998. Explaining the bias in the 23S rRNA gene mutations associated with clarithromycin resistance in clinical isolates of Helicobacter pylori. Antimi
23S	2058	A a G	Cla-R	Mycobacterium abscessus	Wallace, R. J., Jr., A. Meier, B. A. Brown, Y. Zhang, P. Sander, G. O. Onyi, y E. C. Böttger. 1996. Genetic basis for clarithromycin resistance among isolates of Mycobacterium chelonae and Mycobacterium abscessus. Antimicrob. Agents Chemother. 40:1676
23S	2058	A a C/G/U	Cla-R	Mycobacterium avium	Nash, K. A., y C. B. Inderlied. 1995. Genetic basis of macrolide resistance in Mycobacterium avium isolated from patients with disseminated disease. Antimicrob. Agents Chemother. 39:2625-2630.
23S	2058	A a C/G/U	Cla-R	Mycobacterium avium	Nash, K. A., y C. B. Inderlied. 1995. Genetic basis of macrolide resistance in Mycobacterium avium isolated from patients with disseminated disease. Antimicrob. Agents Chemother. 39:2625-

Tipo de ARN	Posición	Alteración/ Alteraciones	Fenotipo	Organismo	Referencia
					2630.
23S	2058	A a C/G	Clr-R	Mycobacterium chelonae	Wallace, R. J., Jr., A. Meier, B. A. Brown, Y. Zhang, P. Sander, G. O. Onyi, y E. C. Böttger. 1996. Genetic basis for clarithromycin resistance among isolates of Mycobacterium chelonae and Mycobacterium abscessus. Antimicrob. Agents Chemother. 40:1676
23S	2058	A a C/G/U	Clr-R	Mycobacterium intracellulare	Meier, A., P. Kirschner, B. Springer, V. A. Steingrube, B. A. Brown, R. J. Wallace, Jr., y E. C. Böttger. 1994. Identification of mutations in 23S rRNA gene of clarithromycin-resistant Mycobacterium intracellulare. Antimicrob. Agents Chemother. 38:38
23S	2058	A a U	Clr-R	Mycobacterium kansasii	Burman, W. J., B. L. Stone, B. A. Brown, R. J. Wallace, Jr., y E. C. Böttger. 1998. AIDS-related Mycobacterium kansasii infection with initial resistance to clarithromycin. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 31:369-371.
23S	2058	A a G	Clr-R	Mycobacterium smegmatis	Sander, P., T. Prammananan, A. Meier, K. Frischkorn, y E. C. Böttger. 1997. The role of ribosomal RNAs in macrolide resistance. Mol. Microbiol. 26:469-480.
23S	2058	A a G	Ery-HR, Spi-MR, Tyl-S, Lin-HR	Mycoplasma pneumoniae	Lucier, T. S., K. Heitzman, S. K. Liu, y P. C. Hu. 1995. Transition mutations in the 23S rRNA of erythromycin-resistant isolates of Mycoplasma pneumoniae. Antimicrob. Agents Chemother. 39:2770-2773.
23S	2058	A a G	MLSB -R	Propionibacteria	Ross, J. I., E. A. Eady, J. H. Cove, C. E. Jones, A. H. Ratyal, Y. W. Miller, S. Vyakarnam, y W. J. Cunliffe. 1997. Clinical resistance to erythromycin and clindamycin in cutaneous propionibacteria isolated from acne patients is associated with mutatio

Tipo de ARN	Posición	Alteración/ Alteraciones	Fenotipo	Organismo	Referencia
23S	2058	A a G	MLSB -R	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Tait-Kamradt, A., T. Davies, M. Cronan, M. R. Jacobs, P. C. Appelbaum, y J. Sutcliffe. 2000. Mutations in 23S rRNA and L4 ribosomal protein account for resistance in Pneumococcal strains selected in vitro by macrolide passage. <i>Antimicrobial Agents and</i>
23S	2058	A a G	MLSB -R	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	Pernodet, J. L., F. Boccard, M. T. Alegre, M. H. Blondelet-Rouault, y M. Guérineau. 1988. Resistance to macrolides, lincosamides and streptogramin type B antibiotics due to a mutation in an rRNA operon of <i>Streptomyces ambofaciens</i> . <i>EMBO J.</i> 7:277-282.
23S	2058	A a G	Ery-R	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> mit.	Sor, F., y H. Fukuhara. 1982. Identification of two erythromycin resistance mutations in the mitochondrial gene coding for the large ribosomal RNA in yeast. <i>Nucleic Acids Res.</i> 10:6571-6577.
23S	2058	A a G	Ery-R	<i>Treponema pallidum</i>	Stamm, L. V., y H. L. Bergen. 2000. A point mutation associated with bacterial macrolide resistance is present in both 23S rRNA genes of an erythromycin-resistant <i>Treponema pallidum</i> clinical isolate [carta]. <i>Antimicrob Agents Chemother.</i> 44:806-807.
23S	2059	"A a G"	Resistencia a claritomicina.	<i>Helicobacter pylori</i>	Versalovic, J., Shortridge, D., Kibler, K., Griffy, M.V., Beyer, J., Flamm, R.K., Tanaka, S.K., Graham, D.Y., y Go, M.F. (1996) <i>Antimicrob. Agents and Chemother.</i> 40, 477-480.
23S	2059	"A a G"	Resistencia a lincomicina.	Cloroplastos de tabaco	Csepló, A., Etzold, T., Schell, J., y Schreier, P.H. (1988) <i>Mol. Genet.</i> 214, 295-299.
23S	2059	"A a C"	Resistencia conferida a los fármacos MLS y cloranfenicol.	<i>E. coli</i>	Hansen LH, Mauvais P, Douthwaite S. 1999. The macrolide-kelotide antibiotic binding site is formed by structures in domains II and V of 23S ribosomal RNA. <i>Molecular Microbiology</i> 31 (2): 623-631.

Tipo de ARN	Posición	Alteración/ Alteraciones	Fenotipo	Organismo	Referencia
23S	2059	"A a G"	Como A2059C	E. coli	Hansen LH, Mauvais P, Douthwaite S. 1999. The macrolide-ketolide antibiotic binding site is formed by structures in domains II and V of 23S ribosomal RNA. <i>Molecular Microbiology</i> 31 (2): 623-631.
23S	2059	"A a U"	Como A2059C	E. coli	Hansen LH, Mauvais P, Douthwaite S. 1999. The macrolide-ketolide antibiotic binding site is formed by structures in domains II and V of 23S ribosomal RNA. <i>Molecular Microbiology</i> 31 (2): 623-631.
23S	2059	A a C	Mac-R, Lin-R, SB-S	Helicobacter pylori	Wang, G., y D. E. Taylor. 1998. Site-specific mutations in the 23S rRNA gene of Helicobacter pylori confer two types of resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics. <i>Antimicrob. Agents Chemother.</i> 42:1952-1958.
23S	2059	A a C	Clr-R	Helicobacter pylori	Debets-Ossenkopp, Y. J., A. B. Brinkman, E. J. Kuipers, C. M. Vandenbroucke-Grauls, y J. G. Kusters. 1998. Explaining the bias in the 23S rRNA gene mutations associated with clarithromycin resistance in clinical isolates of Helicobacter pylori. <i>Antimi</i>
23S	2059	A a G	Clr-R	Helicobacter pylori	Versalovic, J., D. Shortridge, K. Kibler, M. V. Griffy, J. Beyer, R. K. Flamm, S. K. Tanaka, D. Y. Graham, y M. F. Go. 1996. Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in Helicobacter pylori. <i>Antimicrob. Agents Chemother.</i> 40:4
23S	2059	A a G	Mac-R, Lin-R	Helicobacter pylori	Occhialini, A., M. Urdaci, F. Doucet-Populaire, C. M. Bébéar, H. Lamouillat, y F. Mégraud. 1997. Macrolide resistance in Helicobacter pylori: rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes. <i>Antimicrob. Agents Chemother.</i>

Tipo de ARN	Posición	Alteración/ Alteraciones	Fenotipo	Organismo	Referencia
23S	2059	A a G	Mac-R, Lin-R, SB-S	Helicobacter pylori	Wang, G., y D. E. Taylor. 1998. Site-specific mutations in the 23S rRNA gene of Helicobacter pylori confer two types of resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. 42:1952-1958.
23S	2059	A a G	Cla-R	Helicobacter pylori	Debets-Ossenkopp, Y. J., A. B. Brinkman, E. J. Kuipers, C. M. Vandenbroucke-Grauls, y J. G. Kusters. 1998. Explaining the bias in the 23S rRNA gene mutations associated with clarithromycin resistance in clinical isolates of Helicobacter pylori. Antimi
23S	2059	A a C/G	Cla-R	Mycobacterium abscessus	Wallace, R. J., Jr., A. Meier, B. A. Brown, Y. Zhang, P. Sander, G. O. Onyi, y E. C. Böttger. 1996. Genetic basis for clarithromycin resistance among isolates of Mycobacterium chelonae y Mycobacterium abscessus. Antimicrob. Agents Chemother. 40:1676
23S	2059	A a G	Cla-R	Mycobacterium chelonae	Wallace, R. J., Jr., A. Meier, B. A. Brown, Y. Zhang, P. Sander, G. O. Onyi, y E. C. Böttger. 1996. Genetic basis for clarithromycin resistance among isolates of Mycobacterium chelonae y Mycobacterium abscessus. Antimicrob. Agents Chemother. 40:1676
23S	2059	A a C	Cla/Azm-R	Mycobacterium intracellulare	Meier, A., P. Kirschner, B. Springer, V. A. Steingrube, B. A. Brown, R. J. Wallace, Jr., y E. C. Böttger. 1994. Identification of mutations in 23S rRNA gene of clarithromycin-resistant Mycobacterium intracellulare. Antimicrob. Agents Chemother. 38:38
23S	2059	A a C	Cla/Azm-R	Mycobacterium avium	Meier, A., P. Kirschner, B. Springer, V. A. Steingrube, B. A. Brown, R. J. Wallace, Jr., y E. C. Böttger. 1994. Identification of mutations in 23S rRNA gene of clarithromycin-resistant Mycobacterium intracellulare. Antimicrob. Agents Chemother. 38:38

Tipo de ARN	Posición	Alteración/ Alteraciones	Fenotipo	Organismo	Referencia
23S	2059	A a G	Clr-R	Mycobacterium smegmatis	Sander, P., T. Prammananan, A. Meier, K. Frischkorn, y E. C. Böttger. 1997. The role of ribosomal RNAs in macrolide resistance. Mol. Microbiol. 26:469-480.
23S	2059	A a G	Ery-MR, Spi-HR, Tyl-LR, Lin-MR	Mycoplasma pneumoniae	Lucier, T. S., K. Heitzman, S. K. Liu, y P. C. Hu. 1995. Transition mutations in the 23S rRNA of erythromycin-resistant isolates of Mycoplasma pneumoniae. Antimicrob. Agents Chemother. 39:2770-2773.
23S	2059	A a G	Mac-R	Streptococcus pneumoniae	Tait-Kamradt, A., T. Davies, M. Cronan, M. R. Jacobs, P. C. Appelbaum, y J. Sutcliffe. 2000. Mutations in 23S rRNA and L4 ribosomal protein account for resistance in Pneumococcal strains selected in vitro by macrolide passage. Antimicrobial Agents and
23S	2059	A a G	Mac-HR, Lin-LR	Propionibacteria	Ross, J. I., E. A. Eady, J. H. Cove, C. E. Jones, A. H. Ratyal, Y. W. Miller, S. Vyaknam, y W. J. Cunliffe. 1997. Clinical resistance to erythromycin y clindamycin in cutaneous propionibacteria isolated from acne patients is associated with mutatio
23S	2060	"A a C"		E. coli	Vester, B. y Garrett, R.A. (1988) EMBO J. 7, 3577-3587.
23S	2061	"G a A"	Resistencia a cloranfenicol	Mitochondrias de rata	Vester, B. y Garrett, R.A. (1988) EMBO J. 7, 3577-3587.
23S	2062	"A a C"	Resistencia a cloranfenicol.	Halobacterium halobium	Mankin, A.S. y Garrett, R.A. (1991) J. Bacteriol. 173, 3559-3563. i
23S	2251	"G a A"	Letal dominante; Suprimida tanto la unión de ARNt como la actividad peptidil transferasa.	E. coli	Green, R., Samaha, R., y Noller, H. (1997). J. Mol. Biol. 266, 40-50.
23S	2251	"G a A"	Letal dominante; defecto de asociación de subunidades.	E. coli	Gregory, S.T. y Dahlberg, A.E. (no publicado).

Tipo de ARN	Posición	Alteración/ Alteraciones	Fenotipo	Organismo	Referencia
23S	2251	"G a C"	Letal dominante; defecto de asociación de subunidades.	E. coli	Gregory, S.T. y Dahlberg, A.E. (no publicado).
23S	2251	"G a U"	Letal dominante; defecto de asociación de subunidades.	E. coli	Gregory, S.T. y Dahlberg, A.E. (no publicado).
23S	2251	"G a U"	Letal dominante; Suprimida tanto la unión de ARNt como la actividad peptidil transferasa.	E. coli	Green, R., Samaha, R., y Noller, H. (1997). J. Mol. Biol. 266, 40-50.
23S	2251	"G a A"	Letal dominante; altera la actividad peptidil transferasa; induce reactividad DMS; induce reactividad quetoxal en G2238, G2409, G2410, G2529, y G2532; aumenta la reactividad CMCT en G2238; induce reactividad quetoxal y CMCT en G2269 y G2271; induce reactividad CMCT en U2272 y U2408; aumenta la reactividad quetoxal en G2253.	E. coli	Gregory ST, Dahlberg AE, 1999. Mutations, in the Conserved P Loop Perturb the Conformation of Two Structural Elements in the Peptidyl Transferase Center of 23 S Ribosomal RNA. J. Mol. Biol. 285: 1475-1483.
23S	2252	"G a A"	Menos de 5% del nivel control de actividad peptidil transferasa.	E. coli	Porse, B.T., Thi-Ngoc, H.P., y Garrett, R.A. (1996) J. Mol. Biol. 264: 472-486.
23S	2252	"G a C"	Menos de 5% del nivel control de actividad peptidil transferasa.	E. coli	Porse, B.T., Thi-Ngoc, H.P., y Garrett, R.A. (1996) J. Mol. Biol. 264: 472-486.
23S	2252	"G a U"	Menos de 5% del nivel control de actividad peptidil transferasa.	E. coli	Porse, B.T., Thi-Ngoc, H.P., y Garrett, R.A. (1996) J. Mol. Biol. 264: 472-486.
23S	2252	"G a C"	Velocidad reducida de formación de enlaces por la peptidil transferasa in vitro; perjuicio grave para el crecimiento celular. Doble mutación (G2252C/G2253C).	E. coli	1. Lieberman, K.R. y Dahlberg, A.E. (1994) J. Biol. Chem. 269, 16163-16169. 2. Samaha, R.R., Green R., y Noller, H.F. (1995) Nature 377, 309-314. 3.O'Connor, M., Brunelli, C.A., Firpo, M.A., Gregory, S.T., Lieberman, K.R., Lodmell, J.S., Moine, H., Van Ryk, D.I., y Dahlberg, A.E. (1995) Cell Biol. 73, 859-868.
23S	2252	"G a A"	Perjuicio grave para el crecimiento celular; estimulación de desplazamiento de marco y	E. coli	1. Gregory, S.T., Lieberman, K.R., y Dahlberg, A.E. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 279-284. 2. Lieberman, K.R. y Dahlberg,

Tipo de ARN	Posición	Alteración/ Alteraciones	Fenotipo	Organismo	Referencia
			lectura de codones sin sentido.		A.E. (1994) J. Biol. Chem. 269, 16163-16169.
23S	2252	"G a C"	Perjuicio grave para el crecimiento celular; estimulación de desplazamiento de marco y lectura de codones sin sentido.	E. coli	1. Gregory, S.T., Lieberman, K.R., y Dahlberg, A.E. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 279-284. 2. Lieberman, K.R. y Dahlberg, A.E. (1994) J. Biol. Chem. 269, 16163-16169.
23S	2252	"G a U"	Perjuicio grave para el crecimiento celular; estimulación de desplazamiento de marco y lectura de codones sin sentido.	E. coli	1. Gregory, S.T., Lieberman, K.R., y Dahlberg, A.E. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 279-284. 2. Lieberman, K.R. y Dahlberg, A.E. (1994) J. Biol. Chem. 269, 16163-16169.
23S	2252	"G a A"	Letal dominante; altera la actividad peptidil transferasa; induce reactividad DMS; induce reactividad quetoxal en G2238, G2409, G2410, G2529, y G2532; aumenta la reactividad CMCT en G2238; induce reactividad quetoxal y CMCT en G2269 y G2271; induce reactividad CMCT en U2272 y U2408; aumenta reactividad quetoxal en G2253.	E. coli	Gregory ST, Dahlberg AE, 1999. Mutations in the Conserved P Loop Perturb the Conformation of Two Structural Elements in the Peptidyl Transferase Center of 23 S Ribosomal RNA. J. Mol. Biol. 285: 1475-1483.
23S	2252	"G a A"	Interfiere con la acumulación de peptidil-ARNt en el sitio P de la subunidad 50S.	E. coli	Bocchetta M, Xiong L, Mankin AS. 1998. 23S rRNA positions essential for tRNA binding in ribosomal functional sites. Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 3525-3530.
23S	2252	"G a C"	Interfiere con la unión de peptidil-ARNt en el sitio P de la subunidad 50S	E. coli	Bocchetta M, Xiong L, Mankin AS. 1998. 23S rRNA positions essential for tRNA binding in ribosomal functional sites. Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 3525-3530.
23S	2252	"G a U"	Interfiere con la unión de peptidil-ARNt en el sitio P de la subunidad 50S	E. coli	Bocchetta M, Xiong L, Mankin AS. 1998. 23S rRNA positions essential for tRNA binding in ribosomal functional sites. Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 3525-3530.
23S	2252	"G a U"	Letal dominante; suprimida la formación de AcPhe-Phe; suprimida la formación de enlaces peptídicos. c	E. coli	Nitta I, Ueda T, Watanabe K. 1998. Possible involvement of Escherichia coli 23S ribosomal RNA in peptide bond formation. RNA 4: 257-267.

Tipo de ARN	Posición	Alteración/ Alteraciones	Fenotipo	Organismo	Referencia
23S	2253	"G a C"	42% del nivel control de actividad peptidil transferasa.	E. coli	Porse, B.T., Thi-Ngoc, H.P., y Garrett, R.A. (1996) J. Mol. Biol. 264: 472-486.
23S	2253	"G a C"	Velocidad de crecimiento lenta.	E. coli	Gregory, S.T., Lieberman, K.R., y Dahlberg, A.E. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 279-284.
23S	2253	"G a C"	Estimulación de desplazamiento de marco y lectura de codones sin sentido.	E. coli	1. Lieberman, K.R. y Dahlberg, A.E. (1994) J. Biol. Chem. 269, 16163-16169. 2. Samaha, R.R., Green R., y Noller, H.F. (1995) Nature 377, 309-314. 3. O'Connor, M., Brunelli, C.A., Firpo, M.A., Gregory, S.T., Lieberman, K.R., Lodmell, J.S., Moine, H., Van Ryk, D.I., y Dahlberg, A.E. (1995) Cell Biol. 73, 859-868.
23S	2253	"G a A"	Estimulación de desplazamiento de marco y lectura de codones sin sentido.	E. coli	1. Lieberman, K.R. y Dahlberg, A.E. (1994) J. Biol. Chem. 269, 16163-16169. 2. Samaha, R.R., Green R., y Noller, H.F. (1995) Nature 377, 309-314. 3. O'Connor, M., Brunelli, C.A., Firpo, M.A., Gregory, S.T., Lieberman, K.R., Lodmell, J.S., Moine, H., Van Ryk, D.I., y Dahlberg, A.E. (1995) Cell Biol. 73, 859-868.
23S	2253	"G a U"	Estimulación de desplazamiento de marco y lectura de codones sin sentido.	E. coli	1. Lieberman, K.R. y Dahlberg, A.E. (1994) J. Biol. Chem. 269, 16163-16169. 2. Samaha, R.R., Green R., y Noller, H.F. (1995) Nature 377, 309-314. 3. O'Connor, M., Brunelli, C.A., Firpo, M.A., Gregory, S.T., Lieberman, K.R., Lodmell, J.S., Moine, H., Van Ryk, D.I., y Dahlberg, A.E. (1995) Cell Biol. 73, 859-868.
23S	2253	"G a A"	19% del nivel control de actividad peptidil transferasa.	E. coli	Porse, B.T., Thi-Ngoc, H.P., y Garrett, R.A. (1996) J. Mol. Biol. 264: 472-486.
23S	2253	"G a C"	Perjuicio grave para el crecimiento celular; velocidad reducida de la formación de enlaces peptídicos in vitro. Dobles mutaciones (C2253C/2252C).	E. coli	1. Lieberman, K.R. y Dahlberg, A.E. (1994) J. Biol. Chem. 269, 16163-16169. 2. Samaha, R.R., Green R., y Noller, H.F. (1995) Nature 377, 309-314. 3. O'Connor, M., Brunelli, C.A., Firpo, M.A., Gregory, S.T., Lieberman, K.R., Lodmell, J.S., Moine, H., Van Ryk, D.I., y Dahlberg, A.E. (1995) Cell Biol. 73, 859-868.
23S	2253	"G a U"	Menos de 5% del nivel control de actividad peptidil transferasa.	E. coli	Porse, B.T., Thi-Ngoc, H.P., y Garrett, R.A. (1996) J. Mol. Biol. 264: 472-486.

Tipo de ARN	Posición	Alteración/ Alteraciones	Fenotipo	Organismo	Referencia
23S	2253	"G a A"	Reactividad DMS inducida; reactividad CMCT aumentada en G2238; reactividad quetoxal y CMCT inducida en G2269 y G2271; reactividad CMCT inducida en U2272; reactividad quetoxal inducida en G2409 y G2410.	E. coli	Gregory ST, Dahlberg AE, 1999. Mutations in the Conserved P Loop Perturb the Conformation of Two Structural Elements in the Peptidyl Transferase Center of 23 S Ribosomal RNA. J. Mol. Biol. 285: 1475- 1483.
23S	2253	"G a C"	Reactividad DMS inducida; reactividad CMCT aumentada en G2238; reactividad quetoxal y CMCT inducida en G2269 y G2271; reactividad CMCT inducida en U2272; reactividad quetoxal inducida en G2409 y G2410.	E. coli	Gregory ST, Dahlberg AE, 1999. Mutations in the Conserved P Loop Perturb the Conformation of Two Structural Elements in the Peptidyl Transferase Center of 23 S Ribosomal RNA. J. Mol. Biol. 285: 1475- 1483.
23S	2438	"U a A"	Resistencia a ampicetina y velocidad de crecimiento reducida.	Halobacterium halobium	Leviev, I.G., Rodriguez-Fonseca, C., Phan, H., Garrett, R.A., Heliek, G., Noller, H.F., y Mankin, A.S (1994) EMBO J. 13, 1682-1686.
23S	2438	"U a C"	Resistencia a ampicetina.	Halobacterium halobium	Leviev, I.G., Rodriguez-Fonseca, C., Phan, H., Garrett, R.A., Heliek, G., Noller, H.F., y Mankin, A.S (1994) EMBO J. 13, 1682-1686.
23S	2438	"U a G"	Inestable en presencia o ausencia de ampicetina	Halobacterium halobium	Leviev, I.G., Rodriguez-Fonseca, C., Phan, H., Garrett, R.A., Heliek, G., Noller, H.F., y Mankin, A.S (1994) EMBO J. 13, 11682-1686.
23S	2447	"G a A"	Resistencia a cloranfenicol.	Mitocondrias de levadura	Dujon, B. (1980) Cell 20, 185-197.
23S	2447	"G a C"	Resistencia a anisomicina.	Halobacterium halobium	Hummel, H. y Bock, A. (1987) Biochimie 69, 857-861.
23S	2450	"A a C"	Letal.	E. coli	Vester, B. y Garrett, R.A. (1988) EMBO J. 7, 3577-3587.
23S	2451	"A a U"	Resistencia a cloranfenicol.	Mitocondrias de ratón	Kearsey, S.E. y Craig, I.W. (1981) Nature (Londres) 290: 607-608.

Tipo de ARN	Posición	Alteración/ Alteraciones	Fenotipo	Organismo	Referencia
23S	2451	"A a G"	Como A2451G	E. coli	Bocchetta M, Xiong L, Mankin AS. 1998. 23S rRNA positions essential for tRNA binding in ribosomal functional sites. Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 3525-3530.
23S	2451	"A a C"	Como A2451G	E. coli	Bocchetta M, Xiong L, Mankin AS. 1998. 23S rRNA positions essential for tRNA binding in ribosomal functional sites. Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 3525-3530.
23S	2452	"C a A"	Resistencia a cloranfenicol.	Mitocondrias humanas	Blanc, H., Wright C.T., Bibb M.J., Wallace D.C., y Clayton D.A. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3789-3793.
23S	2452	"C a U"	Resistencia a animosicina.	Halobacterium	Hummel, H. y Bock, A. (1987) Biochimie 69, 857-861.
23S	2452	"C a U"	Resistencia a animosicina	Tetrahymena thermophila	Sweeney, R., Yao, C.H., y Yao, M.C. (1991) Genetics 127: 327-334.
23S	2452	"C a U"	Resistencia a cloranfenicol.	Halobacterium halobium	Mankin, A.S. y Garrett, R.A. (1991) J. Bacteriol. 173: 3559-3563.
23S	2452	"C a U"	Resistencia a cloranfenicol	Mitocondrias de ratón	Slott, E.F., Shade R.O., y Lansman, R.A. (1983) Mol. Cell. Biol. 3, 1694-1702.
23S	2452	"C a U"	Nivel bajo de resistencia a esparsomicina	Halobacterium halobium	Tan, G.T., DeBlasio, A., y Mankin, A.S. (1996) J. Mol. Biol. 261, 222-230.
23S	2452	C a U	Cbm-R, Lin-R	Sulfolobus acidocaldarius	Aagaard, C., H. Phan, S. Trevisanato, y R. A. Garrett. 1994. A spontaneous point mutation in the single 23S rRNA gene of the thermophilic archaeon Sulfolobus confers multiple drug resistance. J. Bacteriol. 176:7744-7747.
23S	2453	"A a C"	Resistencia a animosicina	Halobacterium halobium	Hummel, H. y Bock, A. (1987) Biochimie 69, 857-861.
23S	2492	"U a A"	Supresores de desplazamiento de marco.	E. coli	O'Connor, M. y Dahlberg, A.E. (1996) Nucleic Acids Res. 24, 2701-2705.

Tipo de ARN	Posición	Alteración/ Alteraciones	Fenotipo	Organismo	Referencia
23S	2492	"U a C"	Supresores de desplazamiento de marco.	E. coli	O'Connor, M. y Dahlberg, A.E. (1996) Nucleic Acids Res. 24, 2701-2705.
23S	2493	"del U"	(Con A2058G y eritromicina) Efectos letales en el crecimiento. Supresores de desplazamiento de marco.	E. coli	O'Connor, M. y Dahlberg, A.E. (1996) Nucleic Acids Res. 24, 2701-2705.
23S	2493	"U a A"	(Con A2058G y eritromicina) Efectos letales en el crecimiento. Supresores de desplazamiento de marco	E. coli	1. Porse, B.T. y Garrett, R.A. (1995) J. Mol. Biol. 249, 1-10. 2. O'Connor, M., Brunelli, C.A., Firpo, M.A., Gregory, S.T., Lieberman, K.R., Lodmell, J.S., Moine, H., Van Ryk, D.I., y Dahlberg, A.E. (1995) Biochem. Cell Biology 73, 859-868.
23S	2493	"U a C"	(Con A2058G y eritromicina) Efectos letales en el crecimiento. Supresores de desplazamiento de marco	E. coli	1. Porse, B.T. y Garrett, R.A. (1995) J. Mol. Biol. 249, 1-10. 2. O'Connor, M., Brunelli, C.A., Firpo, M.A., Gregory, S.T., Lieberman, K.R., Lodmell, J.S., Moine, H., Van Ryk, D.I., y Dahlberg, A.E. (1995) Biochem. Cell Biology 73, 859-868. 13. O'Connor, M. y Dahlberg, A.E. (1996) Nucleic Acids Res. 24, 2701-2705
23S	2493	"U a C"	(Con A2058G y eritromicina) Efectos letales en el crecimiento. Supresores de desplazamiento de marco	E. coli	O'Connor, M. y Dahlberg, A.E. (1996) Nucleic Acids Res. 24, 2701-2705
23S	2493	"U a G"	(Con A2058G y eritromicina) Efectos letales en el crecimiento. Supresores de desplazamiento de marco	E. coli	O'Connor, M. y Dahlberg, A.E. (1996) Nucleic Acids Res. 24, 2701-2705
23S	2493	"U a A"	(Con A2058G y eritromicina) Efectos letales en el crecimiento. Supresores de desplazamiento de marco	E. coli	O'Connor, M. y Dahlberg, A.E. (1996) Nucleic Acids Res. 24, 2701-2705
23S	2493	"U a C"	Lectura errónea incrementada. Doble mutación (U2493C/G2458A)	E. coli	O'Connor, M. y Dahlberg, A.E. (1996) Nucleic Acids Res. 24, 2701-2705
23S	2493	"U a C"	Lectura errónea incrementada. Doble mutación (U2493C/G2458C)	E. coli	O'Connor, M. y Dahlberg, A.E. (1996) Nucleic Acids Res. 24, 2701-2705

Tipo de ARN	Posición	Alteración/ Alteraciones	Fenotipo	Organismo	Referencia
23S	2497	"A a G"	(Con A2058G y eritromicina) Velocidad de crecimiento reducida.	E. coli	Porse, B.T. y Garrett, R.A. (1995) J. Mol. Biol. 249, 1-10.
23S	2499	"C a U"	Resistencia a esparsomicina	Halobacterium halobium	Tan, G.T., DeBlasio, A. y Mankin, A.S. (1996) J. Mol. Biol. 261, 222-230
23S	2500	U2500A/C2501A	Inhibe la unión de 1A estreptogramina B, antibiótico pristinamicina 1A en el bucle peptidil transferasa causando la inhibición de la elongación peptídica. c	E. coli	Porse BT, Garrett RA. 1999. Sites of Interaction of Streptogramin A and B Antibiotics in the Peptidyl Transferase Loop of 23 S rRNA and the Synergism of their Inhibitory Mechanisms. J. Mol. Biol. 286: 375-387.
23S	2500	U2500A/C2501G	Como U2500A/C2501A. c	E. coli	Porse BT, Garrett RA. 1999. Sites of Interaction of Streptogramin A and B Antibiotics in the Peptidyl Transferase Loop of 23 S rRNA and the Synergism of their Inhibitory Mechanisms. J. Mol. Biol. 286: 375-387.
23S	2500	U2500A/C2501U	Como U2500A/C2501A. c	E. coli	Porse BT, Garrett RA. 1999. Sites of Interaction of Streptogramin A and B Antibiotics in the Peptidyl Transferase Loop of 23 S rRNA and the Synergism of their Inhibitory Mechanisms. J. Mol. Biol. 286: 375-387.
23S	2500	U2500A/C2501A	Como U2500A/C2501A. c	E. coli	Porse BT, Garrett RA. 1999. Sites of Interaction of Streptogramin A and B Antibiotics in the Peptidyl Transferase Loop of 23 S rRNA and the Synergism of their Inhibitory Mechanisms. J. Mol. Biol. 286: 375-387.
23S	2500	U2500G/C2501G	Como U2500A/C2501A. c	E. coli	Porse BT, Garrett RA. 1999. Sites of Interaction of Streptogramin A and B Antibiotics in the Peptidyl Transferase Loop of 23 S rRNA and the Synergism of their Inhibitory Mechanisms. J. Mol. Biol. 286: 375-387.
23S	2500	U2500G/C2501U	Como U2500A/C2501A. c	E. coli	Porse BT, Garrett RA. 1999. Sites of Interaction of Streptogramin A and B Antibiotics in the Peptidyl Transferase Loop of 23 S rRNA and the Synergism of their Inhibitory Mechanisms. J. Mol. Biol. 286: 375-387.

Tipo de ARN	Posición	Alteración/ Alteraciones	Fenotipo	Organismo	Referencia
23S	2500	U2500C/C2501A	Como U2500A/C2501A. c	E. coli	Porse BT, Garrett RA. 1999. Sites of Interaction of Streptogramin A and B Antibiotics in the Peptidyl Transferase Loop of 23 S rRNA and the Synergism of their Inhibitory Mechanisms. J. Mol. Biol. 286: 375-387.
23S	2500	U2500C/C2501G	Como U2500A/C2501A. c.	E. coli	Porse BT, Garrett RA. 1999. Sites of Interaction of Streptogramin A and B Antibiotics in the Peptidyl Transferase Loop of 23 S rRNA and the Synergism of their Inhibitory Mechanisms. J. Mol. Biol. 286: 375-387.
23S	2500	U2500C/C2501A	Como U2500A/C2501A.c	E. coli	Porse BT, Garrett RA. 1999. Sites of Interaction of Streptogramin A and B Antibiotics in the Peptidyl Transferase Loop of 23 S rRNA and the Synergism of their Inhibitory Mechanisms. J. Mol. Biol. 286: 375-387.
23S	2502	"G a A"	Velocidad de crecimiento disminuida	E. coli	Vester, B. y Garrett, R.A. (1988) EMBO J. 7, 3577-3587
23S	2503	"A a C"	Resistencia a cloranfenicol	Mitocondrias de levadura	Dujon, B. (1980) Cell 20, 185-197
23S	2503	"A a C"	Velocidad de crecimiento disminuida; CAMr	E. coli	Porse, B.T. y Garrett, R.A. (1995) J. Mol. Biol. 249, 1-10.
23S	2503	"A a G"	(Con A2058G y eritromicina) Velocidad de crecimiento lenta. CAMr	E. coli	Porse, B.T. y Garrett, R.A. (1995) J. Mol. Biol. 249, 1-10.
23S	2504	"U a A"	Lectura incrementada de codones de parada y desplazamiento de marco; letal	E. coli	O'Connor, M., Brunelli, C.A., Firpo, M.A., Gregory, S.T., Lieberman, K.R., Lodmell, J.S., Moine, H., Van Ryk, D.I., y Dahlberg, A.E. (1995) Biochem. Cell Biology 73, 859-868.
23S	2504	"U a C"	Lectura incrementada de codones de parada y desplazamiento de marco; letal	E. coli	O'Connor, M., Brunelli, C.A., Firpo, M.A., Gregory, S.T., Lieberman, K.R., Lodmell, J.S., Moine, H., Van Ryk, D.I., y Dahlberg, A.E. (1995) Biochem. Cell Biology 73, 859-868.
23S	2504	"U a C"	Resistencia a cloranfenicol	Mitocondrias de ratón	Blanc, H., Wright, C.T., Bibb, M.J., Wallace, D.C., y Clayton, D.A. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3789-3793

Tipo de ARN	Posición	Alteración/ Alteraciones	Fenotipo	Organismo	Referencia
23S	2504	"U a C"	Resistencia a cloranfenicol	Mitocondrias humanas	Kearsey, S.E., y Craig, I.W. (1981) Nature (Londres) 290, 607-608
23S	2505	"G a A"	14% de actividad de ribosomas 70S	E. coli	Porse, B.T., Thi-Ngoc, H.P. y Garrett, R.A. (1996) J. Mol. Biol. 264, 472-486
23S	2505	"G a C"	(Con A1067U y tiorstreptona) Crecimiento sensible a la temperatura. a Hipersensibilidad a CAM; sensibilidad incrementada de traducción in vitro. Ligero incremento en sensibilidad a lincomicina. b Sin efecto en la exactitud de la traducción.	E. coli	1. Saarma, U. y Remme, J. (1992) Nucleic Acids Res. 23, 2396-2403. 2. Saarma, U., Lewicki, B.T.U., Margus, T., Nigul, S., y Remme, J. (1993) "The Translational Apparatus: Structure, Function, Regulation and Evolution" 163-172.
23S	2505	"G a C"	Excluido de ribosomas 70S; 17% de actividad de ribosomas 70S	E. coli	Porse, B.T., Thi-Ngoc, H.P. y Garrett, R.A. (1996) J. Mol. Biol. 264, 472-486
23S	2505	"G a U"	<5% de actividad de ribosomas 70S	E. coli	Porse, B.T., Thi-Ngoc, H.P. y Garrett, R.A. (1996) J. Mol. Biol. 264, 472-486
23S	2505	"G a A"	Resistencia conferida a los fármacos MLS y cloranfenicol.	E. coli	Hansen LH, Mauvais P, Douthwaite S. 1999. The macrolide-ketolide antibiotic binding site is formed by structures in domains II and V of 23S ribosomal RNA. Molecular Microbiology 31 (2): 623-631.
23S	2505	"G a C"	Como G2505A.	E. coli	Hansen LH, Mauvais P, Douthwaite S. 1999. The macrolide-ketolide antibiotic binding site is formed by structures in domains II and V of 23S ribosomal RNA. Molecular Microbiology 31 (2): 623-631.
23S	2505	"G a U"	Como G2505A	E. coli	Hansen LH, Mauvais P, Douthwaite S. 1999. The macrolide-ketolide antibiotic binding site is formed by structures in domains II and V of 23S ribosomal RNA. Molecular Microbiology 31 (2): 623-631.
23S	2506	"U a A"	Letal dominante; 5% de actividad de ribosomas 70S	E. coli	Porse, B.T., Thi-Ngoc, H.P. y Garrett, R.A. (1996) J. Mol. Biol. 264, 472-486

Tipo de ARN	Posición	Alteración/ Alteraciones	Fenotipo	Organismo	Referencia
23S	2508	"A a U"	Eryr, Cdr, Cms; suprime la metilación de ARNr 23S por ErmE.	E. coli	1. Sigmund, C.D., Ettayebi, M., y Morgan, E.A. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 4653-4663. 2. Vannuffel, P., Di Giambattista, M., y Cocito, C. (1992) J. Biol. Chem. 267, 16114-16120. 3. Douthwaite, S. y Aagaard, C. (1993) J. Mol. Biol. 232, 725-731. 4. Vester, B., Hansen, L.H., y Douthwaite, S. (1995) RNA 1, 501-509.
23S	2508	"G a U"	Nivel control de actividad peptidil transferasa	E. coli	1. Porse, B.T. y Garrett, R.A. (1995) J. Mol. Biol. 249, 1-10. 2. Porse, B.T., Thi-Ngoc, H.P. y Garrett, R.A. (1996) J. Mol. Biol. 264, 472-486
23S	2514	"U a C"	Nivel control de actividad peptidil transferasa	E. coli	Porse, B.T. y Garrett, R.A. (1995) J. Mol. Biol. 249, 1-10.
23S	2516	"A a U"	Nivel control de actividad peptidil transferasa	E. coli	Porse, B.T. y Garrett, R.A. (1995) J. Mol. Biol. 249, 1-10.
23S	2528	"U a A"	(Con A2058G y eritromicina) Velocidad de crecimiento lenta. Nivel control de actividad peptidil transferasa	E. coli	Porse, B.T. y Garrett, R.A. (1995) J. Mol. Biol. 249, 1-10.
23S	2528	"U a C"	Nivel control de actividad peptidil transferasa	E. coli	Porse, B.T. y Garrett, R.A. (1995) J. Mol. Biol. 249, 1-10.
23S	2530	"A a G"	(Con A2058G y eritromicina) Velocidad de crecimiento lenta.	E. coli	Porse, B.T. y Garrett, R.A. (1995) J. Mol. Biol. 249, 1-10.
23S	2546	"U a C"	Nivel control de actividad peptidil transferasa.	E. coli	Porse, B.T. y Garrett, R.A. (1995) J. Mol. Biol. 249, 1-10.
23S	2550	"G a A"	(Con A2058G y eritromicina) Velocidad de crecimiento lenta.	E. coli	Porse, B.T. y Garrett, R.A. (1995) J. Mol. Biol. 249, 1-10.
23S	2552	"U a A"	(Con A2058G y eritromicina) Velocidad de crecimiento lenta.	E. coli	Porse, B.T. y Garrett, R.A. (1995) J. Mol. Biol. 249, 1-10.
23S	2555	"U a A"	Estimula la lectura de codones de parada y desplazamiento de marco; U a A es trpE91 supresor de desplazamiento de marco; viable en plásmidos de bajo número de copias,	E. coli	1. O'Connor, M. y Dahlberg, A.E. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 9214-9218. 2. O'Connor, M., Brunelli, C.A., Firpo, M.A., Gregory, S.T., Lieberman, K.R., Lodmell, J.S., Moine, H., Van Ryk, D.I., y Dahlberg, A.E. (1995) Biochem. Cell Biology 73,

Tipo de ARN	Posición	Alteración/ Alteraciones	Fenotipo	Organismo	Referencia
			pero letal cuando se expresa constitutivamente a partir del promotor lambda pL		859-868.
23S	2555	"U a C"	(Con A2058G y eritromicina) Velocidad de crecimiento lenta. Nivel control de actividad peptidil transferasa.	E. coli	Porse, B.T. y Garrett, R.A. (1995) J. Mol. Biol. 249, 1-10.
23S	2555	"U a C"	sin efecto	E. coli	O'Connor, M. y Dalhberg, A.E. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 9214-9218
23S	2557	"G a A"	(Con A2058G y eritromicina) Velocidad de crecimiento lenta. Disminución intermedia en la actividad peptidil transferasa.	E. coli	Porse, B.T. y Garrett, R.A. (1995) J. Mol. Biol. 249, 1-10. Mol.
23S	2565	"A a U"	(Con A2058G y eritromicina) Velocidad de crecimiento lenta. Actividad peptidil transferasa muy baja.	E. coli	Porse, B.T. y Garrett, R.A. (1995) J. Mol. Biol. 249, 1-10.
23S	2580	"U a C"	(Con A2058G y eritromicina) Efectos letales en el crecimiento. Sin actividad peptidil transferasa.	E. coli	Porse, B.T. y Garrett, R.A. (1995) J. Mol. Biol. 249, 1-10.
23S	2581	"G a A"	Inhibición letal dominante de puromicina en reacción	E. coli	1. Spahn, C., Reeme, J., Schafer, M. y Nierhaus, K. (1996) J. Biol. Chem. 271, 32849-32856 2. Spahn, C., Reeme, J., Schafer, M. y Nierhaus, K. (1996) J. Biol. Chem. 271, 32857-32862
23S	2584	"U a A"	Perjudicial; 20% de actividad de ribosomas 70S	E. coli	Porse, B.T., Thi-Ngoc, H.P. y Garrett, R.A. (1996) J. Mol. Biol. 264, 472-486
23S	2584	"U a C"	Perjudicial; 20% de actividad de ribosomas 70S	E. coli	Porse, B.T., Thi-Ngoc, H.P. y Garrett, R.A. (1996) J. Mol. Biol. 264, 472-486
23S	2584	"U a G"	(Con A2058G y eritromicina) Efectos letales en el crecimiento. Sin actividad peptidil	E. coli	Porse B.T. y Garrett, R.A. (1995) J. Mol. Biol. 249, 1-10.

Tipo de ARN	Posición	Alteración/ Alteraciones	Fenotipo	Organismo	Referencia
23S	2589	"A a G"	transferasa. (Con A2058G y eritromicina) Velocidad de crecimiento lenta. Reducción fuerte en la actividad peptidil transferasa.	E. coli	Porse, B.T. y Garrett, R.A. (1995) J. Mol. Biol. 249, 1-10.
23S	2602	A2602C/C2501A	Inhibe la unión de 1A estreptogramina B, antibiótico pristinamicina 1 A en el bucle peptidil transferasa causando la inhibición de elongación peptídica. c	E. coli	Porse BT, Kirillov SV, Awayez MJ, Garrett RA. 1999. UV-induced modifications in the peptidyl transferase loop of 23S rRNA dependent on binding of the streptogramin B antibiotic pristinamycin IA. RNA 5: 585-595.
23S	2602	A2602C/C2501U	Como A2602C/C2501A. c	E. coli	Porse BT, Kirillov SV, Awayez MJ, Garrett RA. 1999. UV-induced modifications in the peptidyl transferase loop of 23S rRNA dependent on binding of the streptogramin B antibiotic pristinamycin IA. RNA 5: 585-595.
23S	2602	A2602C/C2501G	Como A2602C/C2501A. c	E. coli	Porse BT, Kirillov SV, Awayez MJ, Garrett RA. 1999. UV-induced modifications in the peptidyl transferase loop of 23S rRNA dependent on binding of the streptogramin B antibiotic pristinamycin IA. RNA 5: 585-595.
23S	2602	A2602U/C2501A	Como A2602C/C2501A. c	E. coli	Porse BT, Kirillov SV, Awayez MJ, Garrett RA. 1999. UV-induced modifications in the peptidyl transferase loop of 23S rRNA dependent on binding of the streptogramin B antibiotic pristinamycin IA. RNA 5: 585-595.
23S	2602	A2602U/C2501U	Como A2602C/C2501A. c	E. coli	Porse BT, Kirillov SV, Awayez MJ, Garrett RA. 1999. UV-induced modifications in the peptidyl transferase loop of 23S rRNA dependent on binding of the streptogramin B antibiotic pristinamycin IA. RNA 5: 585-595.
23S	2602	A2602U/C2501G	Como A2602C/C2501A. c	E. coli	Porse BT, Kirillov SV, Awayez MJ, Garrett RA. 1999. UV-induced modifications in the peptidyl transferase loop of 23S rRNA dependent on binding of the streptogramin B antibiotic pristinamycin IA. RNA 5: 585-595.

Tipo de ARN	Posición	Alteración/ Alteraciones	Fenotipo	Organismo	Referencia
23S	2602	A2602G/C2501A	Como A2602C/C2501A. c	E. coli	Porse BT, Kirillov SV, Awayez MJ, Garrett RA. 1999. UV-induced modifications in the peptidyl transferase loop of 23S rRNA dependent on binding of the streptogramin B antibiotic pristinamycin IA. RNA 5: 585-595.
23S	2602	A2602G/C2501U	Como A2602C/C2501A. c	E. coli	Porse BT, Kirillov SV, Awayez MJ, Garrett RA. 1999. UV-induced modifications in the peptidyl transferase loop of 23S rRNA dependent on binding of the streptogramin B antibiotic pristinamycin IA. RNA 5: 585-595.
23S	2602	A2602G/C2501G	Como A2602C/C2501A. c	E. coli	Porse BT, Kirillov SV, Awayez MJ, Garrett RA. 1999. UV-induced modifications in the peptidyl transferase loop of 23S rRNA dependent on binding of the streptogramin B antibiotic pristinamycin IA. RNA 5: 585-595.
23S	2611	"C a G"	Resistencia a eritromicina y espiramicina	Chlamydomonas reinhardtii	Gauthier, A., Turmel, M. y Lemieux, C. (1988) Mol. Gen. Genet. 214, 192-197.
23S	2611	"C a G"	Resistencia a eritromicina y espiramicina	Mitocondrias de levadura	Sor, F. y Fukahara, H. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 8313-8318.
23S	2611	"C a U"	Eryr y bajo nivel de resistencia a lincomicina y clindamicina	Chlamydomonas reinhardtii	Harris, E.H., Burkhardt, B.D., Gillham, N.W. y Boynton, J.E. (1989) Genetics 123, 281-292
23S	2611	"C a G"	Eryr y bajo nivel de resistencia a lincomicina y clindamicina	Chlamydomonas reinhardtii	Harris, E.H., Burkhardt, B.D., Gillham, N.W. y Boynton, J.E. (1989) Genetics 123, 281-292
23S	2611	"C a U"	Ligeramente Eryr; metilación reducida Doble mutación (C2611U/ G2057A)	E. coli	Vester, B., Hansen, L.H., y Douthwaite, S. (1995) RNA 1, 501-509
23S	2611	C a G	Ery-R, Spi-LR	Chlamydomonas moewusii chl.	Gauthier, A., M. Turmel, y C. Lemieux. 1988. Mapping of chloroplast mutations conferring resistance to antibiotics in Chlamydomonas: evidence for a novel site of streptomycin resistance in the small subunit rRNA. Mol. Gen. Genet. 214:192-197.

Tipo de ARN	Posición	Alteración/ Alteraciones	Fenotipo	Organismo	Referencia
23S	2611	C a G/U	Ery-R, Lin-MR	Chlamydomonas reinhardtii chl.	Harris, E. H., B. D. Burkhardt, N. W. Gillham, y J. E. Boynton. 1989. Antibiotic resistance mutations in the chloroplast 16S y 23S rRNA genes of Chlamydomonas reinhardtii: correlation of genetic and physical maps of the chloroplast genome. Genetics.
23S	2611	C a U	Ery-R, Spi-S, Tyl-S, Lin-S	Escherichia coli	Vannuffel, P., M. Di Giambattista, E. A. Morgan, y C. Cocito. 1992. Identification of a single base change in ribosomal RNA leading to erythromycin resistance. J. Biol. Chem. 267:8377-8382.
23S	2611	C a A/G	Mac-R, SB-S	Streptococcus pneumoniae	Tait-Kamradt, A., T. Davies, M. Cronan, M. R. Jacobs, P. C. Appelbaum, y J. Sutcliffe. 2000. Mutations in 23S rRNA and L4 ribosomal protein account for resistance in Pneumococcal strains selected in vitro by macrolide passage. Antimicrobial Agents and
23S	2611	C a G	Ery-R, Spi-R	Saccharomyces cerevisiae mit.	Sor, F., y H. Fukuhara. 1984. Erythromycin and spiramycin resistance mutations of yeast mitochondria: nature of the rib2 locus in the large ribosomal RNA gene. Nucleic Acids Res. 12:8313-8318.
23S	2611	C a U	Ery-S, Spi-R	Saccharomyces cerevisiae mit.	Sor, F., y H. Fukuhara. 1984. Erythromycin and spiramycin resistance mutations of yeast mitochondria: nature of the rib2 locus in the large ribosomal RNA gene. Nucleic Acids Res. 12:8313-8318.
23S	2661	"G a C"	Lectura errónea disminuida; dependiente de estreptomina cuando se expresa con Smr, mutación S12 hiperexacta.	E. coli	1. Tappich, W.E. y Dahlberg, A.E. (1990) EMBO J. 9, 2649-2655. 2. Tapio, S. e Isaksson, L.A. (1991) Eur. J. Biochem. 202, 981-984. 3. Melancon, P., Tappich, W. y Brakier-Gingras, L. (1992) J. Bacteriol. 174, 7896-7901. 4. Bilgin, N. y Ehrenberg, M. (1994) J. Mol. Biol. 235, 813-824. 5. O'Connor, M., Brunelli, C.A., Fippo, M.A., Gregory, S.T., Lieberman, K.R., Lodmell, J.S., Moine, H., Van Ryk, D.I., y Dahlberg, A.E. (1995) Biochem. Cell Biology 73, 859-868.

Tipo de ARN	Posición	Alteración/ Alteraciones	Fenotipo	Organismo	Referencia
23S	2661	"C a A"	Como C2661	E. coli	Munishkin A, Wool IG. 1997. The ribosome-in-pieces: Binding of elongation factor EF-G to oligoribonucleotides that mimic the sarcin/ricin and thiostrepton domains of 23S ribosomal RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 12280-12284.
23S	2661	"C a G"	Como C2661	E. coli	Munishkin A, Wool IG. 1997. The ribosome-in-pieces: Binding of elongation factor EF-G to oligoribonucleotides that mimic the sarcin/ricin and thiostrepton domains of 23S ribosomal RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 12280-12284.
23S	2661	"C a U"	Como C2661	E. coli	Munishkin A, Wool IG. 1997. The ribosome-in-pieces: Binding of elongation factor EF-G to oligoribonucleotides that mimic the sarcin/ricin and thiostrepton domains of 23S ribosomal RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 12280-2284.
23S	2666	"C a G"	Lectura incrementada de codones de parada y desplazamiento de marco. a Doble mutación (C2666G/A2654C)	E. coli	O'Connor, M. y Dalhberg, A.E. (1996) Nucleic Acids Res. 24, 2701-2705
23S	2666	"C a G"	Incremento menor en lectura de codones de parada y desplazamiento de marco. a Doble mutación (C2666G/A2654U)	E. coli	O'Connor, M. y Dalhberg, A.E. (1996) Nucleic Acids Res. 24, 2701-2705
23S	2666	"C a U"	Incremento menor en lectura de codones de parada y desplazamiento de marco. a Doble mutación (C2666U/A2654C)	E. coli	O'Connor, M. y Dalhberg, A.E. (1996) Nucleic Acids Res. 24, 2701-2705
23S	2666	"C a U"	Incremento significativo en lectura de codones de parada y desplazamiento de marco. a Doble mutación (C2666U/A2654G)	E. coli	O'Connor, M. y Dalhberg, A.E. (1996) Nucleic Acids Res. 24, 2701-2705
23S	2666	"C a U"	Incremento menor en lectura de codones de parada y desplazamiento de marco. a Doble mutación (C2666U/A2654U)	E. coli	O'Connor, M. y Dalhberg, A.E. (1996) Nucleic Acids Res. 24, 2701-2705

Tabla 4

Resistencia	Patógeno	Etest Recomendado	Mecanismo	Efecto de resistencia en fluorescencia	% de Cambio en Fluorescencia
MRSA Resistente a Meticilina SA	Staphylococcus aureus		Afinidad reducida de PBP2 frente a penicilinas; nosocomial, Resistente a múltiples fármacos (clindamicina, gentamicina, FQ); Contienen SCCmec tipo I, II, o III; Habitualmente PVL-negativo; Virulento (esp. piel y pulmón)	Reducción de la unión de Penicilina	> a ≈ 80% de reducción
CA-MRSA MRSA comunitario adquirido;	Staphylococcus aureus		Resistente a múltiples fármacos (clindamicina, gentamicina, FQ); Habitualmente sólo resistente a pen, ox ± eryth ± FQs; Habitualmente producen PVL, especialmente en los US; En general los organismos permanecen susceptibles a clindamicina y a trimetoprima sulfá. Esto es diferente de un patógeno nosocomial que habitualmente es resistente a uno de estos antibióticos.	Reducción de la unión de Penicilina. Mantiene la capacidad de unión para clindamicina y trimetoprima	> a ≈ 80% de reducción de la unión de penicilina, clindamicina y trimetoprima
PVL-MRSA Panton-Valentine leukocidin - MRSA	Staphylococcus aureus		Toxina altamente abundante, causando choque séptico, grandes complicaciones	--	--
BORSA SA Resistente a a oxacilina Marginal	Staphylococcus aureus	Oxacilina		Reducción de la unión de Penicilina.	> a ≈ 80% of reduction of penicilina
ORSA SA Resistente a oxacilina	Staphylococcus aureus	Oxacilina		Reducción de la unión de Penicilina.	> a ≈ 80% de reducción de penicilina

	Resistencia	Patógeno	Etest Recomendado	Mecanismo	Efecto de resistencia en fluorescencia	% de Cambio en Fluorescencia
VRSA	SA Resistente a vancomicina	Staphylococcus aureus	Vancomicina; Teicoplanina	Características fenotípicas modificadas, sin embargo, incluyen velocidades de crecimiento lentas, una pared celular engrosada, y niveles incrementados de PBP2 y PBP2' (aunque el grado de entrecruzamiento con la pared celular gruesa parece estar reducido) [58]. Las cepas resistentes a Vancomicina también parecen tener una mayor capacidad para absorber el antibiótico desde el medio exterior, lo que puede ser una consecuencia de la mayor disponibilidad de péptidos madre en la pared celular gruesa. Además, las cantidades incrementadas de dos PBPs pueden competir con el antibiótico para los sustratos peptídicos madre, agravando así el perfil de resistencia	Unión incrementada de Vancomicina	
VRS	Staph Resistente a vancomicina	Staphylococci (CNS)	Vancomicina		Unión incrementada de Vancomicina >50%	>50%
VISA	SA Intermedia para Vancomicina	Staphylococcus aureus	Vancomicina		Unión incrementada de Vancomicina 20 - 50%	20 - 50%
hVISA	hetero-(resistentes) Vancomicina	Staphylococcus aureus	Vancomicina	muy raros, pero pueden ser susceptibles a meticilina y resistentes a vancomicina	Unión de penicilina y vancomicina	
VRE	Resistente a Vancomicina	Enterococci	Vancomicina; Teicoplanina	Afinidad reducida para Van por 3 órdenes de magnitud	Reducción de la unión de vancomicina	>80% de reducción

	Resistencia	Patógeno	Etest Recomendado	Mecanismo	Efecto de resistencia en fluorescencia	% de Cambio en Fluorescencia
ESBL	Espectro Extendido de β -Lactamasa	Enterobacteriaceae		Sobreproducción de β -Lactamasas, inhibido por ácido clavulánico	Unión incrementada de ácido clavulánico	>80% incremento de
ESBL	Espectro Extendido de β -Lactamasa	Pseudomonas spp.	Ceftazidima	Sobreproducción de β -Lactamasas, inhibido por ácido clavulánico	Unión incrementada de ácido clavulánico	>80% incremento de
ESBL	Espectro Extendido de β -Lactamasa	Acinetobacter	Ceftazidima	Sobreproducción de β -Lactamasas, inhibido por ácido clavulánico	Unión incrementada de ácido clavulánico	>80% incremento de
ESBL	Espectro Extendido de β -Lactamasa	BCC	Ceftazidima	Sobreproducción de β -Lactamasas, inhibido por ácido clavulánico	Unión incrementada de ácido clavulánico	>80% incremento de
ESBL	Espectro Extendido de β -Lactamasa	Stenotrophomonas maltophilia	Ceftazidima	Sobreproducción de β -Lactamasas, inhibido por ácido clavulánico	Unión incrementada de ácido clavulánico	>80% incremento de
MBL	Metalo- β -Lactamasa		Imipenem		--	--

Resistencia	Patógeno	Etest Recomendado	Mecanismo	Efecto de resistencia en fluorescencia	% de Cambio en Fluorescencia
MLS macrólido estreptogramina lincomamida			Un mecanismo se denomina MLS, macrólido lincomamida estreptogramina. Y en esta situación existe una alteración en un sitio de unión diana a nivel del ARN ribosomal 23, lo que resulta en una mutación puntual o metilación de ARN 23S lo que resulta en unión reducida de macrólidos (también Quetólidos); los organismos con mecanismos de eflujo unirán macrólidos en condiciones FISH. También son sensibles a clindamicina	Unión reducida de macrólidos y quetólidos	>50%
DRSP S. pneumoniae resistente a fármaco	Ácido clavulánico modificado, y detección de un único gen para la bomba de eflujo		DR se indica para beta-lactamas, macrólidos, cloranfenicol, y sulfonamidas	Reducción de unión macrólidos	>50%
HLAR Alto nivel de Resistencia a Aminoglicósido en Enterococci	Enterococci	Gentamicina; Estreptomina		Reducción en unión Estreptomina	>80% de reducción

REIVINDICACIONES

1. Método para la detección de una resistencia a antibióticos en un microorganismo particular en una muestra biológica, que comprende las etapas:
- (a) proporcionar un antibiótico marcado,
- 5 (b) poner en contacto el antibiótico marcado con una muestra biológica que comprende el microorganismo en condiciones que permitan la unión del antibiótico marcado a su sitio de unión en el microorganismo,
- (c) detectar el antibiótico marcado en el microorganismo e identificar este microorganismo en la misma muestra biológica, y
- 10 (d) determinar si la cantidad de marcador detectable está alterada respecto a la cantidad de marcador detectable en el microorganismo particular en su forma no resistente,
- en el que los microorganismos en los que la cantidad de marcador detectable está alterada respecto a la cantidad de marcador detectable en el microorganismo particular en su forma no resistente son microorganismos resistentes frente al antibiótico.
- 15 2. El método según la reivindicación 1, en el que el antibiótico se selecciona del grupo que consiste en aminoglicósidos, carbacefemos, carbapenemos, cefalosporinas, glicopéptidos, macrólidos, monobactamas, antibióticos beta-lactama, quinolonas, bacitracina, sulfonamidas, tetraciclinas, estreptograminas, cloranfenicol, clindamicina, y lincosamida.
3. El método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el antibiótico se marca con un grupo marcador luminiscente, en particular con un grupo marcador fluorescente.
- 20 4. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sitio de unión está localizado en el lumen celular, en el citoplasma, en la pared celular, o/y en una proteína secretada.
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el antibiótico es un antibiótico beta-lactama, que se une preferiblemente a la proteína de unión PBP2 y no a PBP2a.
- 25 6. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el marcador en la etapa (c) se detecta mediante microscopía de epifluorescencia, citometría de flujo, dispositivos de escaneo por láser, fluorimetría de tiempo resuelto, detección por luminiscencia, detección por isótopos, escáner de visualización hiper espectral, Resonancia de Plasmón Superficial o/y otra tecnología de lectura basada en evanescencia.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el microorganismo particular se identifica con un ácido nucleico marcado capaz de hibridar específicamente con un ácido nucleico en el microorganismo en condiciones in-situ.
- 30 8. Método según la reivindicación 7, en el que el microorganismo particular se identifica por FISH.
9. El método según la reivindicación 7 u 8, en el que el microorganismo se detecta mediante microscopía de epifluorescencia, citometría de flujo, dispositivos de escaneo por láser, fluorimetría de tiempo resuelto, detección por luminiscencia, detección por isótopos, escáner de visualización hiper espectral, Resonancia de Plasmón Superficial o/y otra tecnología de lectura basada en evanescencia.
- 35 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en bacterias, levaduras y hongos, en particular de bacterias Gram positivas y Gram negativas.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el microorganismo es una bacteria Gram positiva que se perfora por la formulación Tampón de Perforación de Gram Positivas en la Tabla 2, o en el que el microorganismo es una levadura u hongo, que se perfora por la formulación Tampón de Perforación de Levaduras en la Tabla 2.
- 40 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores que es un método de diagnóstico.