

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 235**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.12.2009 PCT/US2009/067565**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **17.06.2010 WO2010068802**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2009 E 09832566 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2017 EP 2376657**

54 Título: **Análisis ratiométrico de pre-ARNr**

30 Prioridad:

10.12.2008 US 121485 P

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

12.06.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF WASHINGTON (50.0%)
4311 11th Avenue N.E., Suite 500
Seattle, WA 98015, US y
SEATTLE BIOMEDICAL RESEARCH INSTITUTE
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**CANGELOSI, GERARD A.;
MESCHKE, JOHN SCOTT y
WEIGEL, KRIS**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 616 235 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

Análisis ratiométrico de pre-ARNr

Campo técnico

5 La invención se refiere a detectar y determinar la presencia de células viables en una muestra. Más específicamente, la invención se refiere a detectar células viables presentes en un número muy pequeño en una muestra. Se incluyen composiciones y métodos para detectar precursores de ARN ribosómico (pre-ARNr) como indicadores dinámicos de microorganismos viables en una muestra.

Antecedentes

10 Los microorganismos, tales como los patógenos bacterianos, pueden ser difíciles de cultivar a partir de muestras clínicas y ambientales complejas. Pueden estar presentes en un pequeño número o en estados fisiológicos lesionados y envejecidos, con una escasa eficacia de siembra. Las muestras tienen a menudo una flora microbiana competitiva que supera a los patógenos en medios no selectivos, mientras los medios selectivos pueden reducir el rendimiento y tener un efecto selectivo contra ciertas cepas. La mayoría de métodos de detección basados en cultivo requieren 1-3 días para producir resultados, demasiado lento en muchas circunstancias, especialmente en las potencialmente mortales.

15 Una alternativa al cultivo bacteriológico es el ensayo de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT). El tipo más habitual de NAAT, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es rápida y sensible. Una limitación de la PCR es su incapacidad de distinguir las células patógenas viables de las células no viables, de los ácidos nucleicos libres en las muestras, y de los ácidos nucleicos contaminantes introducidos durante el proceso de ensayo. La PCR también es compleja mecánicamente, y susceptible a la inhibición mediante sustancias presentes en las muestras. Estas limitaciones son especialmente problemáticas cuando se usa la PCR para estudiar la eficacia de un tratamiento antimicrobiano, de procesos de desinfección (p.ej., tratamiento de aguas), y de limpieza.

20 Para mejorar la sensibilidad y especificidad de NAAT hacia los microorganismos viables sería valioso reducir o eliminar la detección de falsos positivos de microorganismos no viables y de ADN libre. Una aproximación es la detección del ARN microbiano en vez del ADN. El ARN se considera menos estable que el ADN en disolución y en las células muertas. Se conocen sondas específicas de especie para el ARN ribosómico (ARNr) o el ARN mensajero (mARN). Sin embargo, el mARN microbiano es difícil de detectar debido a su inestabilidad y baja abundancia (Gedalanga y Olson. 2009. Development of a quantitative PCR method to differentiate between viable and nonviable bacteria in environmental water samples. *Appl Microbial Biotechnol.* 82:587-596). A la inversa, el ARNr maduro es bastante estable y puede persistir dentro de las células bacterianas muertas durante largos periodos de tiempo.

Sumario

25 Para mejorar la sensibilidad y especificidad hacia las células viables, se pueden usar ensayos para precursores de ARNr microbiano (pre-ARNr). Los pre-ARNrs son intermedios en la síntesis del ARNr generados por la escisión nucleolítica rápida del transcrito del operón policistrónico *rrs-rrl-rrf*. Los fragmentos líder y tráiler se eliminan posteriormente en reacciones más lentas asociadas al ensamblaje del ribosoma, que producen las subunidades del ARNr maduro. En las células bacterianas en crecimiento, los pre-ARNrs constituyen una gran fracción del ARNr total. Los pre-ARNrs son significativamente más abundantes y fáciles de detectar que incluso las moléculas de mARN expresadas más intensamente en las bacterias. Además, su número de copias intracelular se incrementa rápidamente tras la estimulación nutricional, una propiedad dinámica que facilita la interpretación de los resultados dudosos, y de ese modo se mejora la sensibilidad funcional de los ensayos para las células presentes en un número muy pequeño en las muestras. Además, con frecuencia tienen secuencias específicas de especie que facilitan su detección en las muestras complejas mediante NAAT.

30 Como se describe en la presente memoria, se han desarrollado NAATs que detectan moléculas de pre-ARNr específicas de especie. Los pre-ARNrs son intermedios en la síntesis del ARNr maduro. Son componentes celulares abundantes con secuencias de nucleótidos sumamente específicas de la especie. Esto los hace buenos objetivos para detectar patógenos microbianos en muestras complejas. El número de copias de pre-ARNr se incrementa en órdenes de magnitud cuando las células microbianas experimentan una estimulación nutricional. Esta respuesta es muy rápida (<1 tiempo de generación) y fácil de detectar debido a la abundancia de pre-ARNr en las células estimuladas. La medida mediante PCR cuantitativa de pre-ARNr en las muestras estimuladas y de control produce razones numéricas. Si son positivas, estas razones confirman la presencia de células patógenas intactas y viables en las muestras. Cuando las señales de PCR cuantitativa son muy débiles, las razones positivas incrementan la confianza de que los resultados del ensayo representen resultados positivos verdaderos. Esto mejora la sensibilidad funcional de los ensayos.

35 Los aspectos y ventajas adicionales serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas, que prosigue con referencia a los dibujos adjuntos.

Descripción breve de los dibujos

La Figura 1 muestra mezclas de pre-ARNr 168 y ARNr 168 maduro durante el crecimiento desde la fase estacionaria en caldo LB.

5 La Figura 2 muestra una mezcla de pre-ARNr 168 tras la estimulación nutricional de *M. bovis* BCG en fase estacionaria.

La Figura 3 muestra el transcurso de la estimulación nutricional de pre-ARNr en células privadas de agua de *A. hydrophila* (A) y de la cepa 104 de *M. avium* (B).

10 La Figura 4 muestra la correlación entre la presencia de células viables de *A. hydrophila* y la razón de estimulación de pre-ARNr (A) o ADN genómico cuantificado mediante qPCR (B) en suspensiones de laboratorio tratadas con hipoclorito.

La Figura 5 muestra los resultados de múltiples reacciones de RT-qPCR llevadas a cabo con alícuotas emparejadas estimuladas y de control obtenidas de una única muestra de un lago de agua dulce.

La Figura 6 enumera géneros y especies de ejemplo de microorganismos objetivo que se pueden seleccionar como objetivo mediante los métodos de RPA descritos en la presente memoria.

15 La Figura 7 muestra ejemplos de cebadores de qPCR, que incluyen cebadores alternativos directos, inversos, y de transcriptasa inversa para los organismos mencionados.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

20 Se describen materiales, composiciones, y componentes que se pueden usar para, se pueden usar junto con, se pueden usar en la preparación de, o son productos de las composiciones y métodos descritos. Estos y otros materiales se describen en la presente memoria, y se entiende que cuando se describen combinaciones, subgrupos, interacciones, grupos, etc. de estos materiales que, aunque puede no describirse explícitamente la referencia específica de cada diversa combinación y permutación individual y colectiva de estos compuestos, cada una se contempla y se describe de manera específica en la presente memoria. Por ejemplo, si se describe y se discute un oligonucleótido y se discuten varias modificaciones que se pueden hacer a varias moléculas que incluyen el
25 oligonucleótido, se contemplan de manera específica todas y cada una de las combinaciones y permutaciones del oligonucleótido y las modificaciones que son posibles, a menos que se indique de manera específica al contrario. Este concepto se aplica a todos los aspectos de esta solicitud que incluyen, pero sin limitación, las etapas en los métodos de producción y uso de las composiciones descritas. Así, si hay una diversidad de etapas adicionales que se pueden llevar a cabo, se entiende que cada una de estas etapas adicionales se puede llevar a cabo con cualquier
30 realización específica o combinación de realizaciones de los métodos descritos, y que se contempla de manera específica cada una de tales combinaciones y se deberían considerar descritas.

Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar mediante el uso solamente de experimentación rutinaria, los equivalentes a las realizaciones específicas del método y las composiciones descritas en la presente memoria. Las reivindicaciones incluidas pretenden abarcar tales equivalentes.

35 También se debe entender que la terminología usada en la presente memoria tiene el propósito de describir solamente realizaciones particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, el cual estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

40 A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen los significados que entendería habitualmente un experto en la técnica en el contexto de la presente memoria descriptiva.

45 Se debe indicar que, tal como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "uno/una", y "el/la" incluyen la referencia plural, a menos que el contexto lo dicte claramente de otra manera. Así, por ejemplo, la referencia a "un microorganismo" incluye una diversidad de tales microorganismos, la referencia a "el microorganismo" es una referencia a uno o más microorganismos y equivalentes del mismo conocidos para los expertos en la técnica, etcétera.

50 En la presente memoria se describen compuestos y métodos que aprovechan la reposición de pre-ARNr como base para NAATs específicos para células microbianas viables. Cuando el crecimiento de los microorganismos se ralentiza o se detiene, la síntesis de pre-ARNr disminuye, pero su procesamiento continúa, lo que da como resultado un drenaje activo y sustancial de las mezclas de pre-ARNr. Las mezclas de pre-ARNr se reponen rápidamente cuando se proporcionan nutrientes a las células con crecimiento limitado. Tales fluctuaciones se dan sistemáticamente en las células microbianas viables intactas. No se observan en las células muertas, con los ácidos nucleicos libres, o con otros tipos de ensayos con "ruido" de fondo.

Las secuencias de pre-ARNr tienen una especificidad comparable a las regiones más hipervariables del ARNr maduro. Por lo tanto, las células microbianas viables de una especie determinada se pueden distinguir de otras

especies mediante la detección de pre-ARNr. Además, las células microbianas viables se pueden distinguir de las células muertas de la misma especie midiendo su pre-ARNr en muestras que se han estimulado brevemente con nutrientes. El nivel de pre-ARNr presente en la muestra estimulada se compara con una muestra de control sin estimular, y cuando el pre-ARNr específico de especie en la muestra estimulada supera el de la muestra de control, esto indica la presencia de células viables. Esta aproximación ratiométrica se denomina en la presente memoria análisis ratiométrico de pre-ARNr (RPA).

Como se describe en la presente memoria, el RPA se puede llevar a cabo dividiendo una muestra en dos o más alícuotas, en las que al menos una alícuota se estimula nutricionalmente y al menos una alícuota se trata como un control sin estimular. Los niveles de pre-ARNr en la muestra estimulada nutricionalmente se comparan con los niveles de pre-ARNr en la muestra de control, en la que la reposición de pre-ARNr en la muestra estimulada es indicativa de células viables en la muestra.

En una realización, el RPA puede incluir el uso de dos alícuotas iguales de una muestra, en las que una alícuota se estimula nutricionalmente mientras la otra se mantiene como un control sin estimular nutricionalmente. Tras la estimulación nutricional durante <1 tiempo de generación, se cuantifica ratiométricamente el pre-ARNr específico de especie para determinar los valores de la razón de estimulación de pre-ARNr. En una realización, la estimulación nutricional se puede dar durante un periodo de <1 tiempo de generación, $<1/2$ tiempo de generación, $<1/3$ tiempo de generación, $<1/4$ tiempo de generación, y $<1/8$ tiempo de generación de un microorganismo objetivo. La etapa de estimulación nutricional no tiene una duración suficiente para posibilitar ni siquiera una amplificación modesta del número de microbios. Como tal, RPA no es un enriquecimiento del cultivo. En una realización, los valores de la razón de estimulación de pre-ARNr son las razones de los niveles de pre-ARNr en las muestras estimuladas respecto de las muestras de control. En realizaciones particulares, se usan los valores de la estimulación de pre-ARNr para determinar la presencia de células microbianas viables en una muestra. Por ejemplo, se indica la presencia de microorganismos viables cuando los valores de pre-ARNr en una alícuota estimulada nutricionalmente son mayores que los valores de pre-ARNr en una alícuota de control sin estimular.

Se ha descubierto que, en las realizaciones específicas, los métodos de RPA descritos en la presente memoria se pueden usar para detectar microorganismos objetivo viables que están sustancialmente superados en número por microorganismos inactivados o muertos de la misma especie. En una realización, se puede llevar a cabo el RPA para detectar microorganismos viables en una muestra en la que aproximadamente del 0,01 % al 99% de los microorganismos objetivo son microorganismos viables. En una realización, se puede usar el RPA para detectar la presencia de microorganismos objetivo viables que están presentes en una muestra a un nivel de aproximadamente un 0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,04%, 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1,0%, 2,0%, 3,0%, 4,0%, 5,0%, 10%, 15, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, y 95% de la población total de microorganismos objetivo (vivos + muertos). Tal como se usa en la presente memoria, el porcentaje de microorganismos objetivo viables en una muestra es el número de microorganismos objetivo viables respecto del número total de microorganismos objetivo, tanto viables como inactivados.

El RPA, como se describe en la presente memoria, se puede llevar a cabo en diversos tipos diferentes de muestras específicas. En una realización, la muestra, tal como se usa en la presente memoria, puede ser una muestra recogida de cualquier fuente o localización deseada que potencialmente puede comprender células de interés. En una realización, la muestra se puede tomar de un líquido, un sólido, un gas, un compuesto, un tejido, o cualquier otro sustrato deseado. La muestra se puede tomar de un medio exterior o de un medio interior, o en otras realizaciones, la muestra puede ser una muestra de tejido, fluido, o torunda tomada de un sujeto. En una realización, una muestra de tejido puede ser una muestra de sangre, saliva, esputo, heces, orina, pelo, piel, o cualquier otra muestra tomada del cuerpo de un sujeto. Para los fines de la presente descripción, el término "sujeto" se refiere a un sujeto humano, animal, o vegetal. Además, se puede recoger una muestra para el análisis mediante el uso de los métodos de RPA descritos en la presente memoria de un medio natural, medio industrial, medio de atención sanitaria, medio residencial, medio agrícola, medio de distribución de aguas, medio de tratamiento de aguas residuales, medio de producción o distribución de alimentos, medio recreativo, o cualquier medio deseado o combinaciones de los mismos. Una muestra puede comprender materiales inorgánicos y/u orgánicos, y se puede recoger de un medio marino o medio de agua dulce, y puede comprender polvo, rocas, tierra, vegetación, aire, y combinaciones de los mismos.

Una muestra adecuada para el RPA como se describe en la presente memoria puede incluir una célula de interés, que puede ser una célula procariótica o una célula eucariótica. En las realizaciones particulares, el microorganismo puede ser una bacteria gram-negativa, una bacteria gram-positiva, u otro tipo de bacteria. Por lo tanto, los métodos de RPA descritos en la presente memoria se pueden aplicar para la detección de uno o más microorganismos que tienen importancia en uno o más contextos, que incluyen los entornos clínicos humanos y veterinarios. Por ejemplo, en una realización, los métodos de RPA como se describen en la presente memoria se pueden usar para la detección de microorganismos transmitidos por los alimentos y el agua. En otra realización, el RPA como se describe en la presente memoria se puede usar para la biodefensa y la detección de microorganismos usados para armas biológicas. En otra realización, los métodos de RPA como se describen en la presente memoria se pueden usar para el diagnóstico o la monitorización del tratamiento de enfermedades infecciosas. En otra realización, los métodos de RPA como se describen en la presente memoria se pueden usar para asegurar la calidad de los procesos de fabricación, que incluyen, pero sin limitación, alimentos, bebidas, o dispositivos médicos. En otra

realización, los métodos de RPA como se describen en la presente memoria se pueden usar para asegurar la esterilización eficaz, o el mantenimiento de la esterilidad, de dispositivos y materiales usados en la atención sanitaria.

5 Como se muestra en la FIG. 6, el RPA se puede llevar a cabo con muestras que contienen uno o más microorganismos de interés, que incluyen muchas especies de microorganismos de muchos géneros diferentes. Los métodos de RPA descritos en la presente memoria son adecuados para la detección de pre-ARNs específicos de especie, y en las realizaciones específicas, el RPA como se describe en la presente memoria puede detectar pre-ARNs específicos de especie de microorganismos de uno o más géneros seleccionados de *Acinetobacter*, *Actinobacillus*, *Aeromonas*, *Arcobacter*, *Bacteroides*, *Bordetella*, *Borrelia*, *Brucella*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Eubacterium*, *Francisella*, *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Leptospira*, *Moraxella*, *Morganella*, *Neisseria*, *Pasteurella*, *Plesiomonas*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Stenotrophomonas*, *Treponema*, *Veillonella*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Mobiluncus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, y *Streptomyces*.

Los métodos de RPA comprenden dividir una muestra en dos o más alícuotas, en las que al menos una alícuota se estimula nutricionalmente y al menos una alícuota se trata como un control sin estimular. En una realización, el material presente en la alícuota estimulada nutricionalmente se sedimenta, se lava, y se coloca en condiciones deseadas de cultivo microbiano. Las condiciones de cultivo microbiano como se describen en la presente memoria son las condiciones ambientales y de nutrientes conocidas en general por los expertos en la técnica adecuadas para el crecimiento deseado de un organismo objetivo. En general, las condiciones optimizadas de cultivo microbiano pueden incluir los medios nutritivos, temperatura, humedad, tensión de oxígeno, presencia de micro- o macro-nutrientes específicos, ausencia de inhibidores, y presión, adecuadas para un microorganismo objetivo. En una realización, la alícuota estimulada nutricionalmente se incuba o se cultiva durante un periodo deseado de tiempo en condiciones en las que la alícuota se complementa con medios de cultivo adecuados para un microorganismo objetivo. Por ejemplo, cuando el organismo objetivo es un bacilo gram-negativo de *Aeromonas hydrophila*, la muestra se puede incubar con un medio de cultivo que comprende un medio de cultivo de caldo de nutrientes. En otro ejemplo, el organismo objetivo es *Mycobacterium avium* y las condiciones de cultivo microbiano pueden incluir incubar la muestra con medio Middlebrook 7H9. En otro ejemplo, el organismo objetivo es anaerobio y las condiciones de estimulación nutricional pueden incluir una tensión baja de oxígeno. En otro ejemplo, el organismo objetivo es un patógeno tal como *Listeria*, que vive en un medio intracelular con una disponibilidad limitada de hierro, y las condiciones de estimulación nutricional pueden incluir el suministro de hierro. En una realización, la alícuota de control sin estimular nutricionalmente se incuba en condiciones de control diseñadas para mantener el estado de un microorganismo objetivo. En una realización, la alícuota de control se incuba en agua o tampón. En otra realización, la alícuota de control se mantiene en una atmósfera desfavorable, tal como la concentración atmosférica de oxígeno en el caso de la detección de organismos anaerobios.

Los métodos de RPA descritos en la presente memoria incluyen en general la cuantificación de una o más moléculas de pre-ARNr que se han aislado a partir de microorganismos objetivo en una muestra. En una realización, los pre-ARNs se aíslan a partir de una muestra según técnicas de extracción de ácidos nucleicos conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las células de la muestra se pueden lisar y los ácidos nucleicos se pueden extraer según métodos habituales tales como un método de extracción con fenol-cloroformo. Los métodos ejemplares de extracción de ácidos nucleicos, que incluyen la extracción y cuantificación de pre-ARNr, se describen en la patente de EE.UU. 5.712.095, Cangelosi et al. 1997, y Cangelosi et al. 1996 (Cangelosi, G. A. y W. H. Brabant. 1997. Depletion of pre-16S rRNA in starved *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.* 179:4457-4463; Cangelosi, G. A., W. H. Brabant, T. B. Britschgi, y C. K. Wallis. 1996. Detection of rifampin- and ciprofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by using species-specific assays for precursor rRNA. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:1790-1795).

La cuantificación de las moléculas de pre-ARNr incluye el uso de tecnologías de amplificación de ácidos nucleicos. En una realización, la tecnología de amplificación de ácidos nucleicos puede ser una tecnología basada en PCR. En otra realización, los ácidos nucleicos se pueden amplificar mediante un método que no se basa en PCR, tal como un método de amplificación isotérmica tal como, por ejemplo, la amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA). Los ejemplos de los métodos de amplificación de ácidos nucleicos se describen en Gill y Ghaemi, 2008 (Pooria Gill y Amir Ghaemi. 2008. Nucleic acid isothermal amplification technologies-a review. *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids.* 27:224-243). En una realización del RPA descrito en la presente memoria, se puede usar RT-qPCR para cuantificar el pre-ARNr específico de especie de una muestra para determinar los valores de estimulación de pre-ARNr. La RT-qPCR usa una transcriptasa inversa para convertir el ARN en cADN, que después se mide mediante PCR cuantitativa estándar (qPCR).

Los métodos de RPA descritos en la presente memoria pueden usar cebadores oligonucleotídicos diseñados para las secuencias de pre-ARNr objetivo de un microorganismo objetivo, y los cebadores para el uso con RPA pueden seleccionar como objetivo cualquier secuencia madura de ARNr o cualquier secuencia de pre-ARNr. En una realización, los cebadores pueden seleccionar como objetivo las regiones líder de pre-ARNr de 5'. En una realización, los cebadores para los métodos de RPA descritos en la presente memoria pueden seleccionar como objetivo las secuencias inmediatamente anteriores al extremo 5' del ARNr 16S maduro, porque estas regiones

proximales del promotor serían abundantes en las células que están transcribiendo activamente el pre-ARNr. En otra realización, los cebadores para el uso con RPA pueden seleccionar como objetivo una secuencia espaciadora posterior del gen de ARNr 16S. En las realizaciones adicionales, los pares de cebadores pueden abarcar el extremo de ARNr maduro de 5' o 3', de forma que la amplificación requiere pre-ARNr intacto como molde. Se pueden diseñar cebadores inversos para el uso en los métodos de RPA descritos en la presente memoria para reconocer regiones semi-conservadas dentro del ARNr maduro, y se pueden diseñar cebadores directos para reconocer secuencias específicas de especie dentro del pre-ARNr. De manera alternativa, se pueden diseñar cebadores inversos para el uso en los métodos de RPA descritos en la presente memoria para reconocer secuencias específicas de especie dentro del pre-ARNr, y se pueden diseñar cebadores directos para reconocer regiones semi-conservadas dentro del ARNr maduro. La longitud y la composición de los cebadores no son importantes para la invención, con tal de que se diseñen para amplificar de manera específica el pre-ARNr y no el ARNr maduro o el ADN.

En una realización particular, se pueden diseñar cebadores para cuantificar moléculas de pre-ARNr de *M. avium*. En una realización, con referencia a la FIG. 7, se pueden diseñar cebadores directos e inversos para generar un producto de amplificación que abarca el extremo 5' del ARNr 16S maduro, de forma que la amplificación eficaz requiere pre-ARNr 16S intacto como molde. Por ejemplo, la síntesis de cADN para RT-qPCR se puede cebar con la secuencia de ARNr madura 5'-GCCCGCACGCTCACAGTTAAG -3' (SEQ ID N°: 3). Los cebadores de PCR directo e inverso pueden ser 5'-TTGGCCATACCTAGCACTCC-3' (SEQ ID N°: 1) y 5'-GATTGCCACGTTACTCA-3' (SEQ ID N°: 2), respectivamente. El cebador inverso puede estar dentro de la secuencia de ARNr madura, mientras el cebador directo puede reconocer un sitio en el espaciador transcrito externo-1 (ETS-1). Los ejemplos de cebadores para el uso con los métodos de RPA se muestran en la FIG. 7, que incluye grupos de cebadores directos, inversos, y de la transcriptasa inversa, y cebadores alternativos, que se pueden usar con los microorganismos objetivo mencionados.

Para los métodos descritos en la presente memoria, los valores de la razón de estimulación de pre-ARNr son las razones de los niveles de pre-ARNr en las muestras estimuladas respecto de los niveles de pre-ARNr en las muestras de control. En las realizaciones particulares, los métodos de RPA descritos en la presente memoria incluyen la etapa de cuantificar ratiométricamente el pre-ARNr específico de especie en una muestra. En una realización, el pre-ARNr específico de especie se cuantifica ratiométricamente para determinar los valores de la razón de estimulación de pre-ARNr. En una realización, los valores de la razón de estimulación de pre-ARNr son las razones de los niveles de pre-ARNr en una muestra estimulada nutricionalmente respecto de una muestra de control sin estimular nutricionalmente, y los valores de estimulación de pre-ARNr se usan para determinar la presencia de las células objetivo viables en una muestra. Por ejemplo, la presencia de células viables se indica cuando el valor de la razón de estimulación de pre-ARNr es aproximadamente igual a, o mayor de, un valor umbral de viabilidad. En una realización, la viabilidad de las células objetivo se indica mediante un valor umbral de viabilidad cuando los niveles de pre-ARNr en una alícuota estimulada nutricionalmente son mayores que los valores de pre-ARNr en una alícuota de control sin estimular.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "valor umbral de viabilidad" es la razón calculada de los niveles de pre-ARNr en las muestras estimuladas respecto de los niveles de pre-ARNr en las muestras de control, que indica la presencia de células viables en una muestra. Como se describe en la presente memoria, el valor umbral de viabilidad para una muestra determinada puede depender del organismo objetivo, del tipo de muestra, de la capacidad de resolución del NAAT, y otras condiciones que pueden afectar a la cuantificación del pre-ARNr en la muestra. En las realizaciones específicas, el valor umbral de viabilidad para una muestra puede oscilar de aproximadamente 1 a 100. La elección de un valor umbral podría depender de las necesidades específicas del ensayo. Por ejemplo, un ensayo que requiera la sensibilidad más alta posible hacia la presencia de un patógeno (tal como un control de calidad de un dispositivo médico) podría usar un valor umbral de 1. De manera alternativa, un ensayo que requiera especificidad hacia las células viables, pero no un grado elevado de sensibilidad analítica, tal como la monitorización del tratamiento de aguas residuales, podría usar un valor umbral mayor para minimizar la frecuencia de resultados falsos positivos costosos.

En una realización, el RPA se puede llevar a cabo con muestras obtenidas de fuentes naturales o *in vivo*. Por ejemplo, los métodos de RPA descritos en la presente memoria se pueden llevar a cabo con muestras obtenidas de tejidos o fluidos corporales. En una realización, se puede recoger una muestra del tejido, sangre o esputo de un sujeto humano o animal. En comparación con el agua de un grifo o de un lago, la sangre y el esputo pueden ser medios ricos en nutrientes. Los microorganismos en tales muestras naturales pueden replicarse de manera activa y mantener grandes mezclas de pre-ARNr. Sin embargo, las condiciones nutricionales equilibradas y optimizadas de los medios de laboratorio son muy raras en la naturaleza. En los medios naturales, el crecimiento microbiano está limitado normalmente por la disponibilidad de nutrientes específicos. Por ejemplo, los seres humanos tienen mecanismos inmunitarios innatos que limitan la disponibilidad de hierro en los tejidos. Debido a que ciertos nutrientes son limitantes, los microorganismos se dividen mal, si se dividen, en muestras naturales tales como esputo o sangre completa. En este sentido, los medios naturales son similares a los medios de cultivo gastados, que contienen grandes cantidades de ciertos nutrientes pero tienen agotados otros (normalmente carbono o nitrógeno). Una muestra natural que contiene microorganismos que están limitados por un nutriente específico, ya sea carbono, nitrógeno, oxígeno, o un oligoelemento, puede experimentar un estallido medible de síntesis de pre-ARNr cuando se le proporciona el nutriente limitante en una estimulación nutricional.

En una realización, las muestras recogidas para RPA como se describe en la presente memoria pueden incluir muestras naturales que comprenden variaciones espaciales con respecto a la disponibilidad de nutrientes y la presencia de inhibidores del crecimiento y defensas del hospedador. Por ejemplo, los bacilos de tuberculosis en macrófagos recién infectados pueden replicarse a una velocidad superior, mientras es probable que el crecimiento sea lento en la matriz extracelular o en células hospedadoras con una gran carga de bacilos. En una realización, para las muestras naturales recogidas durante una infección aguda en un sujeto, puede ser poco probable que se proporcione a todos los organismos objetivo potenciales de una muestra la mezcla óptima de nutrientes para asegurar un crecimiento celular máximo. Como tal, se puede esperar que los microorganismos objetivo en las muestras naturales sinteticen pre-ARNr y muestren un aumento de pre-ARNr al incubarlos en condiciones de estimulación nutricional. En una realización, los métodos de RPA como se describen en la presente memoria pueden comprender recoger una muestra natural que comprende un microorganismo objetivo vivo en un medio con limitación de nutrientes. En una realización, los métodos de RPA como se describen en la presente memoria pueden incluir determinar el nutriente limitante en la muestra natural y después estimular nutricionalmente una alícuota de la muestra natural con un medio enriquecido de nutrientes que comprende el nutriente limitante. Por lo tanto, el medio enriquecido de nutrientes puede provocar un aumento de los niveles de pre-ARNr en el microorganismo objetivo al proporcionar el nutriente limitante al microorganismo objetivo.

En una realización particular, el RPA se puede llevar a cabo para un organismo objetivo tal como *M. tuberculosis* en una muestra obtenida de un sujeto humano o animal. En una realización, se puede recoger esputo de un sujeto que se sospecha que está infectado con *M. tuberculosis* o que se somete a tratamiento para *M. tuberculosis*. Las muestras de esputo se pueden dividir en 2 alícuotas, una de las cuales se puede estimular nutricionalmente con un medio de enriquecimiento, tal como caldo Middlebrook 7H9, mientras la otra se puede mantener en PBS o agua como control. En una realización, la estimulación nutricional puede desarrollarse durante aproximadamente 3-5 horas a 37 °C. Las bacterias de las alícuotas estimuladas y de control se pueden lisar después, y se puede usar RT-qPCR para cuantificar el pre-ARNr y calcular los valores de la razón de estimulación de pre-ARNr. Los valores de estimulación de pre-ARNr se pueden usar para determinar la presencia de *M. tuberculosis* viable en la muestra natural. En una realización, se indica la presencia de células viables de *M. tuberculosis* cuando los valores de pre-ARNr en la alícuota estimulada nutricionalmente son mayores que los valores de pre-ARNr en la alícuota de control sin estimular. En las realizaciones similares, los patógenos intracelulares de los géneros *Chlamydia*, *Listeria*, *Legionella*, u otros se pueden detectar mediante RPA con el uso de estimulación nutricional con nutrientes limitantes. Los patógenos objetivo no necesitan ser "cultivables" *in vitro*. Por ejemplo, un patógeno intracelular obligado tal como *Chlamydia trachomatis* se puede detectar en una torunda vaginal mediante el uso de RPA en el que se proporciona un nutriente específico que era limitante en su medio intracelular natural. El patógeno puede no ser capaz de replicarse en estas condiciones, pero puede percibir la presencia del nutriente limitante y sintetizar pre-ARNr en un intento fallido de replicarse, ya que la síntesis de pre-ARNr es una etapa muy temprana del crecimiento celular. Tal síntesis sería detectable mediante RPA.

Los métodos manuales o automatizados conocidos para la extracción y cuantificación de ácidos nucleicos se pueden aplicar para llevar a cabo los métodos de RPA como se describe en la presente memoria. En una realización, el RPA puede incluir la extracción y/o cuantificación de ácidos nucleicos que usa una o más tecnologías tales como la tecnología de chips de ácidos nucleicos, micromatrices, tecnología multiplex, laboratorio en un chip, laboratorio en una tarjeta, dispositivos microfluídicos, y otras tecnologías de extracción y cuantificación de ácidos nucleicos conocidas por los expertos en la técnica. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "dispositivo microfluídico" es un dispositivo que se puede usar para llevar a cabo RPA, y puede incluir la tecnología de chip de ácidos nucleicos, micromatrices, tecnología multiplex, laboratorio en un chip, laboratorio en una tarjeta, y tecnologías relacionadas. Por ejemplo, se describen métodos de extracción y análisis de ácidos nucleicos en la patente de EE.UU. 7.608.399 y la solicitud de patente de EE.UU. 11/880.790.

En una realización, los métodos de RPA descritos en la presente memoria pueden incluir el uso de una tarjeta de ácido nucleico para la extracción y amplificación del ARN, seguido del análisis ratiométrico. Una alícuota tomada de una muestra se estimula nutricionalmente mientras una alícuota de control se mantiene con tampón (etapa A). Después de una estimulación nutricional breve, las células se lisan (etapa B) y después se cargan en tarjetas de ácido nucleico emparejadas. Tras la finalización de la extracción de ARN (etapa C), los eluidos se someten a qPCR. Cuando se aplica a micobacterias de crecimiento lento, el proceso total, que incluye la estimulación nutricional, puede conllevar de 6 a 24 horas. Comparativamente, el cultivo de *Mycobacterium* requiere 5-14 días.

En una realización, el RPA como se describe en la presente memoria puede incluir la extracción y cuantificación de ácidos nucleicos mediante el uso de una tarjeta de vidrio plano o compuesta capaz de aislar de manera rápida, sencilla, y fiable ADN y ARN de sangre y una diversidad de otras muestras biológicas. En una realización, el RPA como se describe en la presente memoria se puede llevar a cabo mediante el uso de un dispositivo que combina la lisis celular, la extracción y purificación de ácidos nucleicos, y la medida de los ácidos nucleicos extraídos. En una realización, el dispositivo puede ser un recipiente para recibir y procesar una muestra biológica como se describe en la presente memoria. En una realización, los métodos de RPA descritos en la presente memoria pueden comprender el uso de una tarjeta de flujo para ácidos nucleicos con paredes de vidrio para la extracción de ácidos nucleicos de una muestra. En tal realización, la tarjeta se puede usar para la cuantificación de ácidos nucleicos, la extracción de ADN o ARN y la determinación de la concentración. En una realización alternativa, la extracción y/o cuantificación de ácidos nucleicos se puede realizar manualmente mediante el uso de pipetas insertadas en orificios de carga y

elución localizados en una tarjeta de ácido nucleico. De manera alternativa, la extracción y/o cuantificación de ácidos nucleicos como se describe en la presente memoria se puede automatizar mediante el uso de un dispositivo de manipulación de fluidos u otros dispositivos adecuados conocidos por los expertos en la técnica.

5 Los métodos de RPA como se describen en la presente memoria pueden incluir un proceso de pre-cribado, tal como un proceso de inmunoseparación o inmunocribado, para mejorar la especificidad del RPA. En una realización, el RPA puede comprender una etapa en la que uno o más microorganismos objetivo de interés se pueden identificar o capturar sobre esferas u otras partículas que están revestidas con anticuerpos u otras sondas o péptidos que se unen de manera específica a los microorganismos objetivo. En una realización, los microorganismos objetivo identificados por los anticuerpos o sondas se pueden someter a RPA como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, los microorganismos objetivo identificados mediante un proceso de inmunoseparación preliminar se pueden dividir en dos o más alícuotas diferentes, en las que una alícuota se estimula nutricionalmente y otra alícuota se reserva como una alícuota de control sin estimular nutricionalmente. La reposición de pre-ARNr en las muestras estimuladas nutricionalmente respecto de las muestras de control se puede cuantificar después como se describe en la presente memoria. En una realización, se puede usar un proceso de inmunoseparación como se describe en la presente memoria para aislar una cepa o población específica de un microorganismo objetivo. Por ejemplo, un método de RPA como se describe en la presente memoria puede comprender una etapa de inmunoseparación, en la que se puede identificar una cepa o aislamiento específico dentro de una población de microorganismos objetivo. En un ejemplo particular, un método de RPA como se describe en la presente memoria puede comprender una etapa de inmunoseparación en la que se separa una cepa específica de *E. coli*, tal como *E. coli* 0157, de otros microorganismos de la misma especie.

En una realización, se puede usar el RPA como se describe en la presente memoria para mejorar la sensibilidad de la detección de microorganismos objetivo. Por ejemplo, el RPA se puede usar para confirmar la presencia de microorganismos objetivo viables junto con otro ensayo. Como medida dinámica de una actividad celular, el RPA como se describe en la presente memoria ofrece una mayor confianza para las señales dudosas que la detección estática de ADN. Esto puede mejorar la sensibilidad, fiabilidad, y solidez global de los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos para microorganismos en una muestra. La sensibilidad biológica mejorada procede de la naturaleza dinámica del RPA. Una analogía sería la observación de los animales en un bosque, en la que un animal en movimiento es mucho más fácil de localizar que uno inmóvil. La síntesis de pre-ARNr observada en el RPA es un tipo de "movimiento" bacteriano que se induce de manera fiable mediante la estimulación nutricional.

30 Además, el RPA tiene ventajas adicionales sobre los NAATs tradicionales. La mayoría de protocolos de transcriptasa inversa-PCR cuantitativa (RT-qPCR) tienen 3 etapas: digestión con ADNasa para eliminar el ADN genómico que podría interferir con la cuantificación del ARN; transcriptasa inversa (RT) para convertir el ARN en cADN; y finalmente qPCR para cuantificar el cADN. En RPA, la etapa de digestión con ADNasa no es necesaria, porque el ADN genómico de las células bacterianas está superado en número por el pre-ARNr en 1-3 órdenes de magnitud. También se espera que el ADN genómico se halle en cantidades similares en las alícuotas estimuladas y en las de control. Como resultado, el ADN genómico provoca muy poca señal de fondo, y no interfiere con el análisis ratiométrico.

En una realización, el RPA se puede usar para mejorar la confianza en los resultados de un análisis principal cuando el análisis principal proporciona resultados que no son concluyentes, que son dudosos, o difíciles de interpretar. Por ejemplo, en general, la RT-qPCR con valores de ciclo umbral (Ct) de <30 (es decir, resultados positivos después de menos de -30 ciclos de amplificación) son inequívocamente positivos. Sin embargo, los valores de Ct >30 son dudosos, y pueden ser difíciles de interpretar. Tales señales pueden ser el resultado de la contaminación de la muestra o incluso ruido de fondo. En una realización, se puede usar RPA para confirmar los resultados de un ensayo de RT-qPCR para la presencia de células microbianas cuando los valores de Ct son >30. Cuando se hacen medidas repetidas y las alícuotas estimuladas nutricionalmente exhiben una señal de RT-qPCR que es sistemáticamente más intensa que la de las alícuotas de control, este resultado refleja muy probablemente la presencia de células viables. Sería muy poco probable que el ruido de fondo, la contaminación por ADN, u otras causas de resultados positivos dudosos provocasen tales resultados. Por lo tanto, además de mejorar la especificidad hacia las células microbianas viables, el RPA puede mejorar significativamente la sensibilidad funcional de un NAAT hacia las células microbianas. Otros ejemplos de NAATs pueden incluir la amplificación no ratiométrica de ARNr (maduro o precursor) y la detección no ratiométrica de ARNr mediante hibridación directa.

Además de los valores de Ct, se pueden usar otras lecturas de ensayos NAAT cuantitativos o semicuantitativos con RPA. Los ejemplos incluyen los resultados de electroforesis en gel, señales fluorescentes o colorimétricas, lecturas térmicas, curvas de desnaturalización, y lecturas basadas en la hibridación de sondas de ácidos nucleicos tales como los ensayos con sondas en tiras o el flujo lateral de ácidos nucleicos (NALF). En todos los casos, el RPA puede mejorar la especificidad hacia las células viables así como la sensibilidad funcional para la detección de las células microbianas presentes en pequeño número.

En una realización, el RPA se puede usar para incrementar la sensibilidad de un NAAT principal, tal como un ensayo de detección de ADN diseñado para identificar la presencia de microorganismos en una muestra. En una realización, un ensayo de detección de ADN genómico de una muestra se puede llevar a cabo al mismo tiempo que RPA, o seguido de RPA, con la misma muestra para detectar la presencia de microorganismos objetivo viables. En otra

realización, el RPA se puede usar para superar el ruido de fondo o la contaminación con ADN ambiental que puede hacer difícil interpretar los resultados dudosos generados por los métodos de detección de microorganismos objetivo.

Ejemplos

5 Los Ejemplos siguientes se ofrecen con fines ilustrativos solamente, y no pretenden limitar el alcance de las composiciones y métodos descritos en la presente memoria de ninguna manera. Se debe entender que las composiciones y métodos descritos no se limitan a las metodologías, protocolos y reactivos particulares descritos en la presente memoria. En cada caso, a menos que se especifique de otra manera, se usaron materiales y métodos habituales para llevar a cabo el trabajo descrito en los Ejemplos proporcionados.

10 La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique de otra manera, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante, genética, inmunología, biología celular, cultivo celular y biología transgénica, que se hallan dentro de la experiencia en la técnica. (Véase, p.ej., Real-Time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterization (I. M. Makay ed. 2007); Nolan, T., et al. (2006) Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. Nature Protocols 1, 1559-1582; Maniatis, T., et al. (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.); Sambrook, J., et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.); Ausubel, F. M., et al. (1992) Current Protocols in Molecular Biology, (J. Wiley and Sons, NY); Glover, D. (1985) DNA Cloning, I y II (Oxford Press); Anand, R. (1992) Techniques for the Analysis of Complex Genomes, (Academic Press); Guthrie, G. y Fink, G. R. (1991) Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology (Academic Press); Harlow y Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.); Jakoby, W. B. y Pastan, I. H. (eds.) (1979) Cell Culture. Methods in Enzymology, Vol. 58 (Academic Press, Inc., Harcourt Brace Jovanovich (NY); Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames y S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames y S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); el tratado Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller y M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 y 155 (Wu et al. eds.); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer y Walker, eds., Academic Press, Londres, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986); Hogan et al. (eds) (1994) Manipulating the Mouse Embryo; A Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique de otra manera, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante, genética, e inmunología. (Véase, p.ej., Maniatis et al., 1982; Sambrook et al., 2001; Ausubel et al., 1992; Glover, 1985; Anand, 1992; Guthrie y Fink, 1991).

35 Nada de la presente memoria se debe considerar una admisión de que la materia descrita en la presente memoria no tenga derecho a preceder a dicha descripción en virtud de una invención anterior. No se hace ninguna admisión de que cualquier referencia constituya la técnica anterior. La discusión de las referencias expone lo que sus autores afirman, y los solicitantes se reservan el derecho de cuestionar la exactitud y pertinencia de los documentos citados. Se entenderá claramente que, aunque en la presente memoria se hace referencia a varias publicaciones, tal referencia no constituye una admisión de que cualquiera de estos documentos forme parte del conocimiento general habitual en la técnica.

Ejemplo 1 - Diseño de Ensayos de Viabilidad Celular Basados en Pre-ARNr

Las mezclas de pre-ARNr se reponen rápidamente en las bacterias que perciben nutrientes nuevos en sus medios. Como se muestra en la FIG. 1, las mezclas de pre-ARNr 168 se reponen en *E. coli* después de un aumento nutricional de las células en fase estacionaria. Siguiendo con referencia a la FIG. 1, se diluyeron cultivos nocturnos de *E. coli* 20 veces en caldo LB nuevo a tiempo cero (flecha). En los puntos de tiempo antes y después de la dilución, se registraron las densidades ópticas, y se analizó en las muestras el contenido de pre-ARNr y de ARNr 168 maduro mediante ensayos de hibridación tipo sándwich quimioluminiscente. Círculos claros, DO600 del cultivo (eje derecho); Triángulos claros, pre-ARNr 168 por DO600 (eje izquierdo); Triángulos oscuros, ARNr 168 maduro por DO600. En la FIG. 1 se muestran las medias y desviaciones estándar de tres cultivos paralelos.

50 En contraste con *E. coli*, que se divide y duplica cada 30 min y tiene un número elevado de copias de ARNr, *Mycobacterium bovis* BCG se duplica cada -24 horas y tiene menos copias de ARNr. Sin embargo, la reposición de pre-ARNr es claramente visible en un tiempo de duplicación desde el aumento nutricional en este organismo. La FIG. 2 ilustra esto en un experimento llevado a cabo con *M. bovis* BCG en el que se usó un ensayo de hibridación de transferencia en ranura para detectar pre-ARNr (círculos oscuros). Siguiendo con referencia a la FIG. 2, se diluyeron células de *M. bovis* BCG en fase estacionaria en caldo 7H10 nuevo en el momento indicado por la flecha. Se monitorizó el número de copias de pre-ARNr y la densidad celular antes y después de la estimulación nutricional. Los círculos oscuros muestran la razón de pre-ARNr respecto del ADN genómico. Los triángulos claros muestran la DO600 del cultivo de *M. bovis*. Fue posible la detección directa sin amplificación, ya que los pre-ARNrs son abundantes en las células bacterianas, y representan un 4%-20% del ARNr total. Como resultado, la sensibilidad de detección de pre-ARNr supera la de la detección del ADN genómico.

Ejemplo 2-Análisis Ratiométrico de Pre-ARNr

Se desarrollaron ensayos RPA para dos patógenos bacterianos que se sospecha que provocan una enfermedad humana adquirida por el agua potable. Las especies modelo fueron el bacilo gram-negativo de crecimiento rápido *Aeromonas hydrophila* y el actinomiceto de crecimiento lento *Mycobacterium avium*. Para ambas especies, se seleccionaron como objetivo las regiones líder de pre-ARNr de 5' (las secuencias inmediatamente anteriores al extremo 5' del ARNr 16S), basándose en la suposición de que estas regiones proximales al promotor serían abundantes en las células que estuvieran transcribiendo activamente pre-ARNr. Los pares de cebadores abarcaron el extremo 5' del ARNr maduro, de forma que la amplificación requirió un pre-ARNr intacto como molde. Los cebadores inversos reconocieron regiones semi-conservadas dentro del ARNr maduro. Los cebadores directos reconocieron secuencias específicas de especie dentro del líder de 5'.

Los cebadores directo e inverso de *M. avium* se diseñaron para generar un producto de amplificación de 237 pb predicho que abarcó el extremo 5' del ARNr 16S maduro, de forma que la amplificación eficaz necesitó pre-ARNr 16S intacto como molde. La síntesis de cADN se cebó mediante la secuencia de ARNr maduro 5'-GCCCCGACGCTCACAGTTAAG -3' (SEQ ID N°: 3). Los cebadores de PCR directo e inverso fueron 5'-TTGGCCATACCTAGCACTCC-3' (SEQ ID N°: 1) y 5'-GATTGCCACGTGTTACTCA-3' (SEQ ID N°: 2), respectivamente. El cebador inverso se halló dentro de la secuencia de ARNr maduro, mientras el cebador directo reconoció un sitio en ETS-1. De forma coherente con la especificidad de especie predicha a partir del análisis BLAST, la PCR con electroforesis en gel proporcionó sistemáticamente productos de los tamaños esperados al aplicarla al ácido nucleico de 15 aislamientos clínicos de *M. avium* y 4 aislamientos clínicos de *M. intracellulare*. Estas dos especies estrechamente relacionadas comprenden el grupo clínicamente relevante conocido como el complejo *M. avium* (MAC). No se observaron productos al aplicar las reacciones a *M. tuberculosis*, *M. smegmatis*, *M. terrae*, *M. gastri*, *M. nonchromogenicum*, *M. phlei*, y *M. vaccae* (datos no mostrados). Estas observaciones ilustran la especificidad filogenética útil del análisis de pre-ARNr.

Los cebadores directo e inverso de *A. hydrophila* generaron un producto de amplificación predicho de 189 pb. La síntesis de cADN se cebó mediante la secuencia de ARNr maduro 5'-CTACAAGACTCTAGCTGGACAGT-3' (SEQ ID N°: 6). Los cebadores de PCR directo e inverso fueron 5'-ATTGAGCCGCCTTAACAGG-3' (SEQ ID N°: 4) y 5'-AACTGTTATCCCCCTCGAC-3' (SEQ ID N°: 5), respectivamente. El análisis BLAST llevado a cabo con la base de datos no redundante del NCBI no halló coincidencias con el cebador directo aparte de *A. hydrophila*. La especie estrechamente relacionada *A. salmonicida* A449 no tuvo una secuencia homóloga.

Para estudiar la evolución a lo largo del tiempo de la reposición de pre-ARNr tras la estimulación nutricional, se lavaron células de *A. hydrophila* ATCC 7966 en fase estacionaria temprana, se resuspendieron en agua del grifo tratada en autoclave (ATW), y se incubaron durante 7 días con ventilación a 28 °C. Las células en fase estacionaria temprana de la cepa HMC02 de MAH se lavaron, se resuspendieron en ATW, y después se incubaron durante 14 días con ventilación a 37 °C. Estas condiciones se diseñaron para agotar las mezclas de pre-ARNr en los medios simulados de suministro de agua. Para llevar a cabo el RPA, las bacterias privadas de agua se dividieron en dos alícuotas y se centrifugaron. Un sedimento se resuspendió en medios de cultivo (estimulación nutricional), y el otro en ATW (control). Las densidades celulares finales fueron aproximadamente 10⁶ ufc/ml. Se usó caldo de nutrientes para la estimulación nutricional de *A. hydrophila*, y se usó medio Middlebrook 7H9 con un 10% de suplemento ADC para MAH. Tras la incubación durante periodos de tiempo variables, las células se lisaron mediante batido con esferas de alta energía, el ARN se aisló mediante fenol-cloroformo acidificado, y se midió el pre-ARNr mediante RT-qPCR. Las razones de los valores de RT-qPCR en las muestras estimuladas nutricionalmente y en las de control se calcularon tras la normalización con respecto a curvas patrón de ADN genómico. La estimulación del pre-ARNr fue muy rápida en ambos organismos. Aproximadamente 15 minutos de estimulación nutricional fueron adecuados para el aumento coherente de pre-ARNr en *A. hydrophila*. Fueron necesarias aproximadamente 4 horas para la estimulación máxima de pre-ARNr en *M. avium*, un organismo de crecimiento lento con un tiempo de generación de >20 horas. Para ambos organismos, estos periodos de tiempo son <1 tiempo de generación.

La FIG. 3 muestra el transcurso de la estimulación nutricional de pre-ARNr en células privadas de agua de *A. hydrophila* (A) y de la cepa 104 de *M. avium* (B). Los valores de la razón de estimulación de pre-ARNr son las razones de pre-ARNr en las muestras estimuladas respecto de las muestras de control, medidas mediante RT-qPCR. Los valores son las medias y SO de >2 experimentos por punto de tiempo. Para llevar a cabo una RT-qPCR con ARN extraído, primero se generó el ADN complementario (eADN) mediante el uso del sistema Superscript III (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) y se lavó mediante el uso de un kit de purificación para PCR de Qiagen (n° de cat. 28104, Qiagen Inc., Valencia, CA). La amplificación del cADN se llevó a cabo mediante el uso de la mezcla de Applied Biosystems (ABI) Power SYBR Green (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). Las reacciones se llevaron a cabo por triplicado a dos diluciones diferentes para asegurar las lecturas cuantitativas. Las amplificaciones se analizaron en placas de 96 pocillos en un aparato ABI Prism RT-7500 como sigue: 10 minutos a 95 °C, 40 ciclos de (15 seg a 95 °C, 30 seg a 60 °C, 30 seg a 72 °C) mediante el uso de 'emulación 9600'. Se usó el programa informático SDS de ABI para ajustar los valores umbrales Ct.

Ejemplo 3-Correlación Entre la Razón de Estimulación de Pre-ARNr y la Viabilidad Celular

Para estudiar la especificidad de RPA por las células viables, se usó un tratamiento con hipoclorito sódico para

- generar suspensiones celulares de *A. hydrophila* con razones variables de células viables e inactivadas. Las razones se cuantificaron mediante la colocación en placas de células viables tras la exposición a cloro, y se expresaron como la viabilidad en porcentaje respecto de la densidad de inicio de aproximadamente 1×10^6 ufc/ml. Para llevar a cabo el RPA en las suspensiones celulares tratadas con cloro y sin tratar, se centrifugaron alícuotas emparejadas y los sedimentos celulares se resuspendieron en agua (muestra de control) o caldo de nutrientes (muestra estimulada). Después de 1 hora de estimulación nutricional, se determinaron las razones de estimulación de pre-ARNr. En ciertos experimentos, también se cuantificó mediante qPCR el ADN genómico en las muestras estimuladas y de control. Esto permitió la determinación de la especificidad de RPA hacia las células viables, en comparación con la especificidad observada con la qPCR tradicional de ADN.
- La Tabla 1 muestra los resultados de dos experimentos en los que se midió el ADN genómico, así como el pre-ARNr. En el primer experimento, las muestras con viabilidades en porcentaje del 96,3%, 26,9%, y 0,02% exhibieron valores de razones de estimulación de pre-ARNr de $\geq 3 \pm 1$ DE. Las muestras sin células viables detectables (0% de viabilidad) exhibieron razones de estimulación de pre-ARNr que no fueron estadísticamente mayores de 1,0. Por lo tanto, RPA mostró valores significativos de razones de estimulación de pre-ARNr en una muestra en la que hasta aproximadamente un 99,98% de los microorganismos objetivo estaban muertos. En contraste, la detección mediante qPCR del ADN genómico de *A. hydrophila* fue claramente positiva en todas las muestras, independientemente de la viabilidad celular. Además, no hubo ninguna diferencia entre las señales de ADN en las alícuotas estimuladas nutricionalmente y las de control (no mostrado). Se observaron resultados similares en el segundo experimento (Tabla 1). Este ejemplo ilustra la notable sensibilidad de RPA hacia las células viables, incluso cuando están superadas en número por las células inactivadas mediante factores de 5000 veces o más, como en la muestra del Experimento 1 que se trató con 2 mg/l de hipoclorito.

Tabla 1

Experimento 1

Hipoclorito (mg/l)	Ucf/ml final	Viabilidad en porcentaje ¹	Razón de estimulación de pre-ARNr ²	Copias de ADN genómico (millones)
0	963000	96,3	$3,0 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,4$
1	279000	27,9	$17,2 \pm 3,6$	$3,8 \pm 0,5$
2	190	0,02	$73,0 \pm 54,2$	$4,0 \pm 0$
3	0	0	$0,6 \pm 1,0$	$3,8 \pm 0,5$
4	0	0	$0,04 \pm 0,1$	$5,4 \pm 0,6$

Experimento 2

Hipoclorito (mg/l)	Ucf/ml final	Viabilidad en porcentaje ¹	Razón de estimulación de pre-ARNr ²	Copias de ADN genómico (millones)
0	774000	77,4	$39,4 \pm 17,0$	$0,5 \pm 0,1$
1	846000	84,6	$17,44 \pm 5,4$	$2,2 \pm 0,5$
1,5	186000	18,6	$16,47 \pm 6,6$	$2,7 \pm 0,1$
2	0	0	$1,28 \pm 0,4$	$2,2 \pm 0,04$

¹ Normalizado respecto de aproximadamente 1×10^6 bacterias iniciales. ² Media \pm DE de 3 muestras replicadas.

- En cuatro experimentos que usaron el protocolo de la Tabla 1, se aplicó el RPA a un total de 18 muestras tratadas con cloro y sin tratar con viabilidades en porcentaje variables. Las razones de estimulación de pre-ARNr observadas en las muestras sin unidades formadoras de colonias detectables fueron significativamente inferiores ($p = 0,0026$ mediante la prueba U de Mann-Whitney) que las observadas en las muestras con unidades formadoras de colonias detectables (Figura 4A). Hubo cierto solapamiento entre los dos grupos, sin embargo el solapamiento fue significativamente menor que el observado cuando se cuantificó el ADN genómico mediante qPCR en las muestras estimuladas o sin estimular (Figura 4B). No hubo una correlación significativa entre la viabilidad y las razones de estimulación de ADN. Más específicamente, la FIG. 4 muestra la correlación entre la presencia de células viables de *A. hydrophila* y la razón de estimulación de pre-ARNr (A) o ADN genómico cuantificado mediante qPCR (B) en suspensiones de laboratorio tratadas con hipoclorito. Los valores de la razón de estimulación de pre-ARNr (A) son las razones de pre-ARNr en las muestras estimuladas respecto de las muestras de control, medidos mediante RT-qPCR. Los valores son las medias de 3 medidas por muestra. Las copias de ADN genómico (B) se cuantificaron mediante qPCR normalizadas respecto de una curva patrón de ADN genómico. El ADN se midió en muestras estimuladas nutricionalmente (cuadrados claros), así como en muestras no estimuladas (triángulos claros).

Ejemplo 4-Ensayo de Campo de un Ensayo RPA

5 Como habitante habitual de las aguas superficiales, *A. hydrophila* fue un modelo adecuado para el ensayo de campo de RPA. Se recogieron muestras de localizaciones de agua dulce y salada en Seattle, WA. Se trató en autoclave una porción de cada muestra para generar un control inactivado. Las muestras tratadas y sin tratar en autoclave (300 ml cada una) se concentraron mediante filtración. Tras la resuspensión, se diluyeron alícuotas dos veces en caldo de nutrientes 2X (muestra estimulada) o agua (control). Después de 1 hora de incubación, se concentraron las bacterias y partículas mediante centrifugación, y después se midió el pre-ARNr de *A. hydrophila* en los sedimentos mediante RT-qPCR. Se determinaron los recuentos viables de *A. hydrophila* en las muestras mediante colocación en placas de células viables siguiendo métodos habituales.

Tabla 2.

Sitio	Descripción	Recuentos de <i>A. hydrophila</i> viable (ufc media por ml ± DE)	Pre-ARNr (razón media estimulado/control ± DE) ¹
A1	Agua dulce	798	4,8 ± 1,4
A2	Agua dulce	280	9,5 ± 5,9
B	Agua salada	6	Pre-ARNr no detectado
C	Agua dulce	760	39,8 ± 12,8

¹Medias y desviaciones estándar de ≥4 medidas por muestra.

10 En total, se analizaron 3 muestras de agua dulce y 1 muestra de agua salada. Las muestras de agua dulce produjeron cuentas viables de *A. hydrophila* que oscilaron de 280 a 798 ufc/ml. Todas ellas exhibieron señales positivas de RPA (Tabla 2). Ninguna de las muestras tratadas en autoclave produjeron ufc, y no se detectó pre-ARNr de *A. hydrophila* en estas muestras. La muestra de agua salada tuvo 6 ufc/mL de *A. hydrophila*, sin embargo no se detectó pre-ARNr de *A. hydrophila* en las muestras estimuladas o sin estimular, con o sin tratamiento en autoclave.

15 Los resultados apoyan el uso de RPA como medio para detectar de manera específica microorganismos viables en muestras ambientales. Los métodos de RPA se pueden usar para eliminar resultados falsos positivos observados en muestras que contienen solamente células bacterianas muertas y ADN. El uso de RPA puede reducir también los falsos positivos provocados por la contaminación de laboratorio de las muestras o los reactivos de PCR. Además, el RPA es robusto y se basa en una característica fisiológica de todas las bacterias, y es útil en el análisis de la seguridad de alimentos y agua, por sí mismo o como análisis auxiliar para otras herramientas.

20 *Ejemplo 5-Sensibilidad biológica de RPA*

25 Se puede usar el RPA para mejorar la sensibilidad de un ensayo con respecto a la detección de ADN genómico. La FIG. 5 muestra los resultados de múltiples reacciones de RT-qPCR llevadas a cabo en alícuotas emparejadas estimuladas y de control obtenidas de una única muestra de agua dulce de lago (muestra A2 de la Tabla 2) que contuvo 280 ufc/ml de *A. hydrophila* viables. Siguiendo con referencia a la FIG. 5, se dividió una muestra del lago Union, Seattle, WA en dos alícuotas, una de las cuales se estimuló con caldo de nutrientes (barras oscuras) y la otra se resuspendió en ATW (barras claras) como control. Los resultados mostrados en la FIG. 5 se expresan como copias de pre-ARNr aproximadas por ml de muestra calculadas comparando los valores de ciclo umbral (Ct) respecto de una curva patrón de ADN genómico. En cada una de estas réplicas técnicas, las señales de pre-ARNr en las muestras estimuladas superaron las de las muestras de control con márgenes sustanciales.

30 Los valores de Ct de la Tabla 2 estuvieron todos en el intervalo de 32 a 43, es decir, las señales fueron dudosas y débiles. Esto se debió muy probablemente a los inhibidores de PCR que son habituales en las muestras de agua superficial concentrada. A pesar de estas limitaciones, los resultados fueron inequívocamente positivos, ya que el aumento coherente de la señal de pre-ARNr en las muestras estimuladas prestó confianza a la conclusión de que
35 hubo células viables de *A. hydrophila*.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> University of Washington Technology Transfer Office
- 5 <120> Análisis ratiométrico de pre-ARNr.
 <130> 53433/15
 <160> 110
- 10 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Mycobacterium avium complex
 <400> 1
 ttggccatac cttagcactcc 20
- 20 <210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Mycobacterium avium complex
- 25 <400> 2
 gattgcccac gtgtactca 20
 <210> 3
 <211> 21
 30 <212> ADN
 <213> Mycobacterium avium complex
 <400> 3
 gcccgcacgc tcacagtaa g 21
- 35 <210> 4
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Aeromonas hydrophila
- 40 <400> 4
 attgagccgc ctaacagg 19
 <210> 5
 45 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Aeromonas hydrophila
 <400> 5
 50 aactgtatc cccctcgac 19
 <210> 6
 <211> 23
 <212> ADN
 55 <213> Aeromonas hydrophila
 <400> 6
 ctacaagact cttagctggac agt 23
- 60 <210> 7
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Bacillus anthracis
- 65 <400> 7

acaaacaacg tgaacgtca at 22
 <210> 8
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> Bacillus anthracis
 <400> 8
 gtccgccgct aactcataa 20
 10 <210> 9
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Bacillus anthracis
 15 <400> 9
 aactttattg gagagttga tctg 25
 <210> 10
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Bacillus anthracis
 <400> 10
 25 ccggaggtta tcccagtct 20
 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Bacillus anthracis
 <400> 11
 cagtttcaa tgacctcca 20
 35 <210> 12
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Bacillus anthracis
 40 <400> 12
 tgcactcaag tctcccagtt t 21
 <210> 13
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Bacillus anthracis
 <400> 13
 gagccgttac ctaccaact 20
 50 <210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Bordetella pertussis
 55 <400> 14
 gatcagggtc cacacacaga 20
 <210> 15
 60 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Bordetella pertussis
 <400> 15
 65 ccacgcttc gcgtagttat 20

ES 2 616 235 T3

<210> 16
<211> 20
<212> ADN
<213> Bordetella pertussis
5
<400> 16
aagcgatacg gatcctggtt 20

<210> 17
10 <211> 20
<212> ADN
<213> Bordetella pertussis

<400> 17
15 ccgacttgca tegttaaagc 20

<210> 18
<211> 21
<212> ADN
20 <213> Bordetella pertussis

<400> 18
gcccggtagt taaaaatgca g 21
25 <210> 19
<211> 21
<212> ADN
<213> Bordetella pertussis

<400> 19
30 aaggtaagc cctgggatt c 21

<210> 20
<211> 20
35 <212> ADN
<213> Bordetella pertussis

<400> 20
tcctctcaaa ccagctacgg 20
40
<210> 21
<211> 23
<212> ADN
<213> Borrelia burgdorferi
45
<400> 21
gccaaaagaa taaacaaac ctg 23

<210> 22
50 <211> 20
<212> ADN
<213> Borrelia burgdorferi

<400> 22
55 ccgtttgact tgcattgctta 20

<210> 23
<211> 22
<212> ADN
60 <213> Borrelia burgdorferi

<400> 23
ttggaagatg agagaaggga ag 22
65 <210> 24
<211> 20

ES 2 616 235 T3

<212> ADN
<213> Borrelia burgdorferi

<400> 24
5 ttcgccactg aatgtattgc 20

<210> 25
<211> 21
<212> ADN
10 <213> Borrelia burgdorferi

<400> 25
agttccaac ataggtccac a 21

15 <210> 26
<211> 23
<212> ADN
<213> Borrelia burgdorferi

20 <400> 26
agttgagctg tggatttta tgc 23

<210> 27
<211> 20
25 <212> ADN
<213> Borrelia burgdorferi

<400> 27
30 tgccttgga ggcattacc 20

<210> 28
<211> 27
<212> ADN
35 <213> Campylobacter jejuni

<400> 28
ttaggcata agcaattatg taaaatc 27

40 <210> 29
<211> 20
<212> ADN
<213> Campylobacter jejuni

<400> 29
45 cgttcactct gagccaggat 20

<210> 30
<211> 26
<212> ADN
50 <213> Campylobacter jejuni

<400> 30
gatttaggca taagcaatta tgtaaa 26

55 <210> 31
<211> 20
<212> ADN
<213> Campylobacter jejuni

60 <400> 31
agccaggatc aaactctca 20

<210> 32
<211> 22
65 <212> ADN
<213> Campylobacter jejuni

ES 2 616 235 T3

<400> 32
gagactgat aatccgccta cg 22

5 <210> 33
<211> 17
<212> ADN
<213> Campylobacter jejuni

10 <400> 33
cctacgcgcc ctttacg 17

<210> 34
<211> 20
15 <212> ADN
<213> Campylobacter jejuni

<400> 34
tcgtttcaa ctgtgtcct 20

20 <210> 35
<211> 23
<212> ADN
<213> Clostridium difficile

25 <400> 35
aagaaacaaa ccataaagcc aga 23

<210> 36
30 <211> 20
<212> ADN
<213> Clostridium difficile

<400> 36
35 tcgctcaact tgcattggt 20

<210> 37
<211> 27
<212> ADN
40 <213> Clostridium difficile

<400> 37
ttgataaca atagtatctg agcctga 27

45 <210> 38
<211> 20
<212> ADN
<213> Clostridium difficile

50 <400> 38
gtaggttac ccacgcgta 20

<210> 39
<211> 20
55 <212> ADN
<213> Clostridium difficile

<400> 39
tccactctcc tctctgcac 20

60 <210> 40
<211> 21
<212> ADN
<213> Clostridium difficile

65 <400> 40

5 tgactcaag tctcccagtt t 21
 <210> 41
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Clostridium difficile
 <400> 41
 10 cgtaggagtt tggaccgtgt 20
 <210> 42
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 15 <400> 42
 gtcgaagac gaaaaatgaa 20
 <210> 43
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 <400> 43
 25 tcgacttga tgtgtaggc 20
 <210> 44
 <211> 26
 <212> ADN
 30 <213> Escherichia coli
 <400> 44
 tcttgagca tcaaacttt aaattg 26
 35 <210> 45
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 40 <400> 45
 caggcagttt cccagacatt 20
 <210> 46
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 <400> 46
 50 tcagatgcag ttcccaggtt 20
 <210> 47
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 55 <400> 47
 cccggggatt tcacatct 18
 <210> 48
 60 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 <400> 48
 65 ctcagaccag ctaggatcg 20

ES 2 616 235 T3

<210> 49
<211> 25
<212> ADN
<213> Haemophilus influenzae
5
<400> 49
cgattgaact tgaattgaag agttt 25
10
<210> 50
<211> 20
<212> ADN
<213> Haemophilus influenzae
15
<400> 50
cactcgtcag caagaaagca 20
20
<210> 51
<211> 27
<212> ADN
<213> Haemophilus influenzae
25
<400> 51
ttgaagtctt aataggtgct taactga 27
30
<210> 52
<211> 20
<212> ADN
<213> Haemophilus influenzae
35
<400> 52
ctttctcctg ctaccgttcg 20
40
<210> 53
<211> 20
<212> ADN
<213> Haemophilus influenzae
45
<400> 53
ctgaaatgca attcccaggt 20
50
<210> 54
<211> 19
<212> ADN
<213> Haemophilus influenzae
55
<400> 54
ggggcttca cacctact 19
60
<210> 55
<211> 20
<212> ADN
<213> Haemophilus influenzae
65
<400> 55
cagtcccgca ctttcatctt 20
70
<210> 56
<211> 18
<212> ADN
<213> Helicobacter pylori
75
<400> 56
gttgtagga ataacaac 18
80
<210> 57
<211> 20

ES 2 616 235 T3

<212> ADN
<213> Helicobacter pylori

<400> 57
5 agcttcatcg ttcgacttgc 20

<210> 58
<211> 22
<212> ADN
10 <213> Helicobacter pylori

<400> 58
cgagttcttg tgatagccta aa 22

15 <210> 59
<211> 20
<212> ADN
<213> Helicobacter pylori

20 <400> 59
ttccaatggc tatcccaaac 20

<210> 60
<211> 23
25 <212> ADN
<213> Helicobacter pylori

<400> 60
30 ctcccacact ctagaatagt agt 23

<210> 61
<211> 26
<212> ADN
<213> Helicobacter pylori

35 <400> 61
acactctaga atagtagttt caaatg 26

<210> 62
40 <211> 20
<212> ADN
<213> Legionella pneumophila

<400> 62
45 agagctagtg ccggaattga 20

<210> 63
<211> 20
<212> ADN
50 <213> Legionella pneumophila

<400> 63
tgagtttccc caagttgtcc 20

55 <210> 64
<211> 21
<212> ADN
<213> Legionella pneumophila

60 <400> 64
gacaaactgt gtgggcatt t 21

<210> 65
<211> 20
65 <212> ADN
<213> Legionella pneumophila

<400> 65
 gctagacaat gctgccgttc 20

5 <210> 66
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Legionella pneumophila

10 <400> 66
 aggttaagcc caggaatttc a 21

<210> 67
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> Legionella pneumophila

<400> 67
 attatctgac cgtcccaggt t 21

20 <210> 68
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Legionella pneumophila

25 <400> 68
 gtccccagct ttcgtcct 18

<210> 69
 30 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Listeria monocytogenes

<400> 69
 35 agctgttttc aacaaaacaa acta 24

<210> 70
 <211> 20
 <212> ADN
 40 <213> Listeria monocytogenes

<400> 70
 cctgagccag gatcaaactc 20

45 <210> 71
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Listeria monocytogenes

50 <400> 71
 gctgtttca acaaaacaaa ctagtaa 27

<210> 72
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Listeria monocytogenes

<400> 72
 agcaagctct tcctccgttc 20

60 <210> 73
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Listeria monocytogenes

65 <400> 73

ggggcttca catcagact 20
 <210> 74
 <211> 18
 5 <212> ADN
 <213> Listeria monocytogenes
 <400> 74
 aatgaccctc cccggta 18
 10 <210> 75
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Listeria monocytogenes
 15 <400> 75
 aggtgccca cgtgttactc 20
 <210> 76
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 20 <400> 76
 tttcaaagg gagtgttgg 20
 <210> 77
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 77
 acccagttc ccaggcttat 20
 35 <210> 78
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 40 <400> 78
 taccttggc tccctttcc 20
 <210> 79
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 45 <400> 79
 tcaccacgt gttactcacc 20
 50 <210> 80
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 55 <400> 80
 gcccgcacgc tcacagtaa g 21
 <210> 81
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 60 <400> 81
 gctgggccg tatctcagtc 20
 65

<210> 82
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 5
 <400> 82
 cgtcacccca ccaacaag 18
 <210> 83
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Neisseria gonorrhoeae
 <400> 83
 15 tgtcggtttc ttgaagcag 20
 <210> 84
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Neisseria gonorrhoeae
 <400> 84
 ccggtacggt ccgatatggt 20
 25 <210> 85
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Neisseria gonorrhoeae
 30 <400> 85
 gcagaccaga agttaaaaag ttagaga 27
 <210> 86
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Neisseria gonorrhoeae
 <400> 86
 atcagttatc ccccgctacc 20
 40
 <210> 87
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Neisseria gonorrhoeae
 45
 <400> 87
 ggggattca catcctgct 19
 <210> 88
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Neisseria gonorrhoeae
 <400> 88
 55 actcgagtca cccagtcag 20
 <210> 89
 <211> 20
 <212> ADN
 60 <213> Neisseria gonorrhoeae
 <400> 89
 ctactgatcg tcgccttgg 20
 65 <210> 90
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Porphyromonas gingivalis

 <400> 90
 5 gggaataat cggcgtctga 20

 <210> 91
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Porphyromonas gingivalis

 <400> 91
 ccctcgactt gcatgtgta 20

 15 <210> 92
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Porphyromonas gingivalis

 20 <400> 92
 cgaggtgtac tacctgataa atcg 24

 <210> 93
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Porphyromonas gingivalis

 <400> 93
 cctatcgcta gcgtcatcc 20
 30
 <210> 94
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Porphyromonas gingivalis
 35
 <400> 94
 gttcaacgg caggctga 18

 <210> 95
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Porphyromonas gingivalis
 40
 <400> 95
 gagcgctcag gtttcacc 18
 45
 <210> 96
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Porphyromonas gingivalis

 <400> 96
 gtccgtcttt caacgggta 20

 55 <210> 97
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Treponema pallidum

 60 <400> 97
 gatcctggct cagaacgaac 20

 <210> 98
 <211> 20
 65 <212> ADN
 <213> Treponema pallidum

ES 2 616 235 T3

<400> 98
gcagattacc cacgcgttac 20

5 <210> 99
<211> 19
<212> ADN
<213> Treponema pallidum

10 <400> 99
cctggaacg gggttaga 19

<210> 100
<211> 20
15 <212> ADN
<213> Treponema pallidum

<400> 100
ttactacca gtccgccact 20

20 <210> 101
<211> 20
<212> ADN
<213> Treponema pallidum

25 <400> 101
gattccaccc ctacactgg 20

<210> 102
30 <211> 20
<212> ADN
<213> Treponema pallidum

<400> 102
35 gttcccctc cgtgattcta 20

<210> 103
<211> 20
<212> ADN
40 <213> Treponema pallidum

<400> 103
tctcaggtcg gataccatc 20

45 <210> 104
<211> 21
<212> ADN
<213> Vibrio cholerae

50 <400> 104
gcaatcattc agcacagtca a 21

<210> 105
<211> 20
55 <212> ADN
<213> Vibrio cholerae

<400> 105
tcgacttgca tgtgttaggc 20

60 <210> 106
<211> 21
<212> ADN
<213> Vibrio cholerae

65 <400> 106

ES 2 616 235 T3

cagtattcat tgagccgaag c 21
<210> 107
<211> 20
5 <212> ADN
<213> Vibrio cholerae

<400> 107
atggttatcc ccctctaccg 20
10
<210> 108
<211> 21
<212> ADN
<213> Vibrio cholerae
15
<400> 108
gtcagttca aatgcgattc c 21

<210> 109
<211> 19
20 <212> ADN
<213> Vibrio cholerae

<400> 109
25 tgcgattcct aggttgagc 19

<210> 110
<211> 20
<212> ADN
30 <213> Vibrio cholerae

<400> 110
cagaccagct agggatcgtc 20
35

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar microorganismos viables en una muestra, y el método comprende, en una muestra recogida:
 - estimular nutricionalmente una primera alícuota de la muestra;
 - 5 mantener una segunda alícuota de la muestra en condiciones de control que no son estimulantes nutricionalmente;
 - incubar la primera alícuota y la segunda alícuota;
 - comparar el nivel de al menos un pre-ARNr objetivo de al menos un microorganismo objetivo de la primera alícuota con el nivel del al menos un pre-ARNr objetivo de al menos un microorganismo objetivo en la segunda alícuota;
 - 10 en el que la razón del nivel del al menos un pre-ARNr objetivo en la primera alícuota y el nivel del al menos un pre-ARNr objetivo en la segunda alícuota es indicativa de microorganismos viables en la muestra.
2. Un método para incrementar la sensibilidad de un ensayo de amplificación de ácidos nucleicos para determinar la presencia de al menos un microorganismo objetivo viable en una muestra, en el que los resultados de un ensayo no ratiométrico estándar de amplificación de ácidos nucleicos para la muestra podría no ser concluyente con respecto a la presencia del al menos un microorganismo objetivo viable, y el método comprende:
 - dividir la muestra en al menos una primera alícuota y una segunda alícuota;
 - estimular nutricionalmente la primera alícuota de la muestra;
 - mantener la segunda alícuota de la muestra en condiciones de control que no son estimulantes nutricionalmente;
 - 20 incubar la primera alícuota y la segunda alícuota;
 - extraer ARN de la primera alícuota y extraer ARN de la segunda alícuota;
 - cuantificar el nivel de al menos un pre-ARNr objetivo de la primera alícuota;
 - cuantificar el nivel del al menos un pre-ARNr objetivo de la segunda alícuota;
 - 25 comparar el nivel del al menos un pre-ARNr objetivo en la primera alícuota con el nivel del al menos un pre-ARNr objetivo en la segunda alícuota;
 - en el que se usa la razón del nivel del al menos un pre-ARNr objetivo en la primera alícuota y el nivel de pre-ARNr objetivo en la segunda alícuota para mejorar la confianza en resultados dudosos, y de ese modo incrementar la sensibilidad del ensayo de amplificación de ácidos nucleicos con respecto a la presencia del al menos un microorganismo objetivo viable en la muestra.
 - 30
3. El método de la reivindicación 1, que comprende además extraer ARN de la primera alícuota y extraer ARN de la segunda alícuota;
 - y cuantificar el nivel del al menos un pre-ARNr objetivo en la primera alícuota y cuantificar el nivel del al menos un pre-ARNr objetivo en la segunda alícuota.
- 35 4. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el porcentaje del al menos un microorganismo objetivo que es viable en la muestra es de al menos un 0,02%.
5. El método de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en el que la extracción del ARN de la primera alícuota y la segunda alícuota y la cuantificación del al menos un pre-ARNr de la primera alícuota y la segunda alícuota comprende el uso de un dispositivo microfluídico.
- 40 6. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende además un proceso de separación específica de cepas.
7. El método de la reivindicación 2, que comprende además un proceso de separación específica de cepas en el que el proceso de separación específica de cepas comprende cribar la muestra con respecto a la presencia de *E. coli* 0157.
- 45 8. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el al menos un microorganismo objetivo es un miembro de un género de microorganismos seleccionados del grupo que consiste en *Acinetobacter*, *Actinobacillus*, *Aeromonas*, *Arcobacter*, *Bacteroides*, *Bordetella*, *Borrelia*, *Brucella*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Citrobacter*,

- 5 *Cronobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Eubacterium*, *Francisella*, *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Leptospira*, *Moraxella*, *Morganella*, *Neisseria*, *Pasteurella*, *Plesiomonas*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Stenotrophomonas*, *Treponema*, *Veillonella*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Mobiluncus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, y *Streptomyces*, preferiblemente en el que el al menos un microorganismo objetivo es una especie *Mycobacterium* o en el que el al menos un microorganismo objetivo es *Aeromonas hydrophila* o al menos uno de *Chlamydia trachomatis*, *Legionella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*, *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, *Rickettsia prowasekii*, *Rickettsia typhi*, y *Helicobacter pylori*.
- 10
9. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la primera alícuota se incuba durante un periodo de tiempo que es menor de 1 tiempo de generación del al menos un microorganismo objetivo.
- 15
10. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que estimular nutricionalmente la primera alícuota comprende enriquecer la primera alícuota con nutrientes para favorecer un aumento de la producción de pre-ARNr en el al menos un microorganismo objetivo.
- 20
11. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la razón del nivel del al menos un pre-ARNr objetivo en la primera alícuota y del nivel del al menos un pre-ARNr objetivo en la segunda alícuota es >1 .
12. El método de la reivindicación 2, en el que cuando la razón del nivel del al menos un pre-ARNr objetivo en la primera alícuota y del nivel de pre-ARNr objetivo en la segunda alícuota es >1 , se confirma la presencia del al menos un microorganismo objetivo en la muestra.
- 25
13. El método de la reivindicación 2, en el que el ensayo principal de amplificación de ácido nucleico no es concluyente porque genera un valor de ciclo umbral de >30 .
14. El método de la reivindicación 2, en el que la muestra se divide en al menos una primera alícuota y una segunda alícuota de manera concurrente con un ensayo distinto de amplificación de ácido nucleico, o tras la finalización del ensayo principal de amplificación de ácido nucleico.
- 30
15. El método de la reivindicación 2, en el que el ensayo de amplificación de ácido nucleico es un ensayo de amplificación de ADN.
16. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra se obtiene de una fuente natural o *in vivo*.
17. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 16, en el que la muestra se obtiene de tejidos o fluidos corporales.
18. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 16, en el que la muestra es del tejido, sangre o esputo de un sujeto humano o animal.
- 35
19. El método de la reivindicación 6, en el que el al menos un microorganismo objetivo tiene al menos un fenotipo de interés, y el al menos un microorganismo objetivo se captura en esferas u otras partículas revestidas con anticuerpos o sondas.

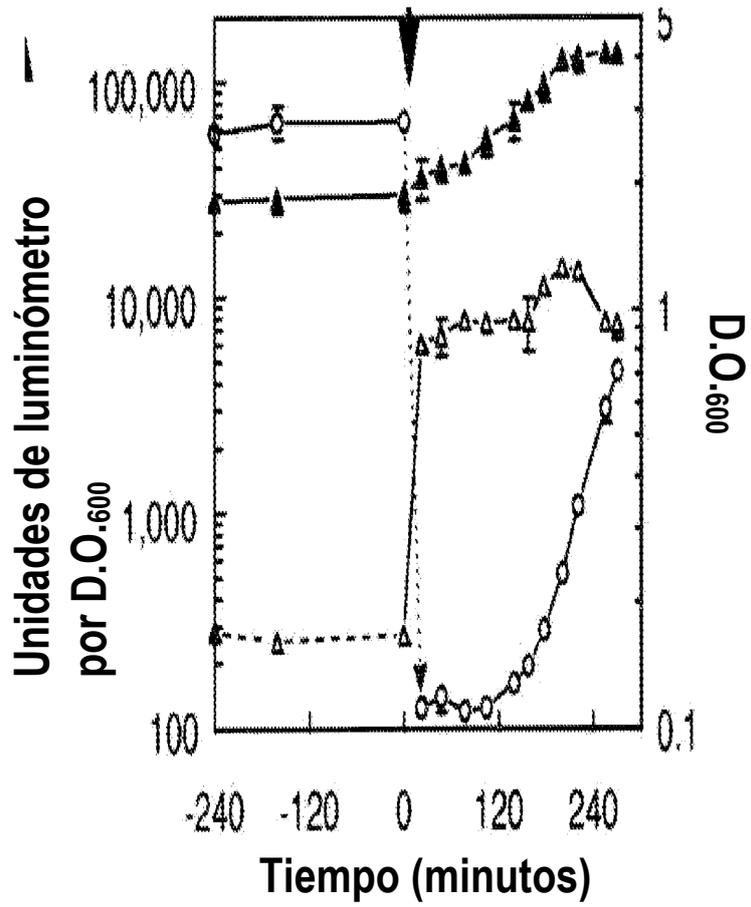


FIG. 1

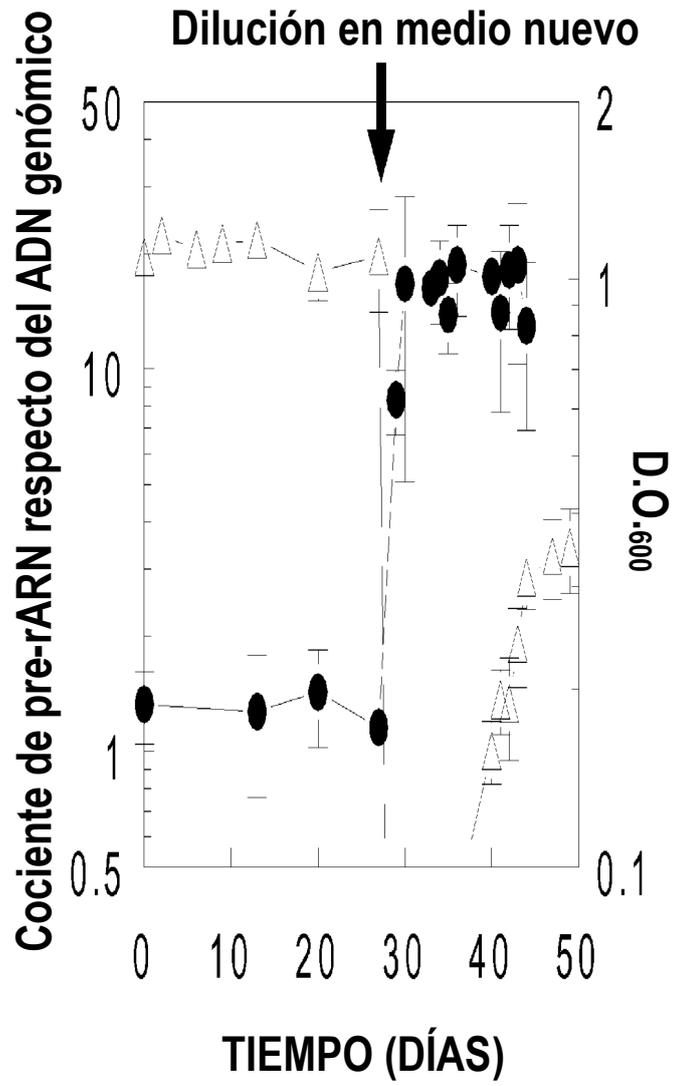


FIG. 2

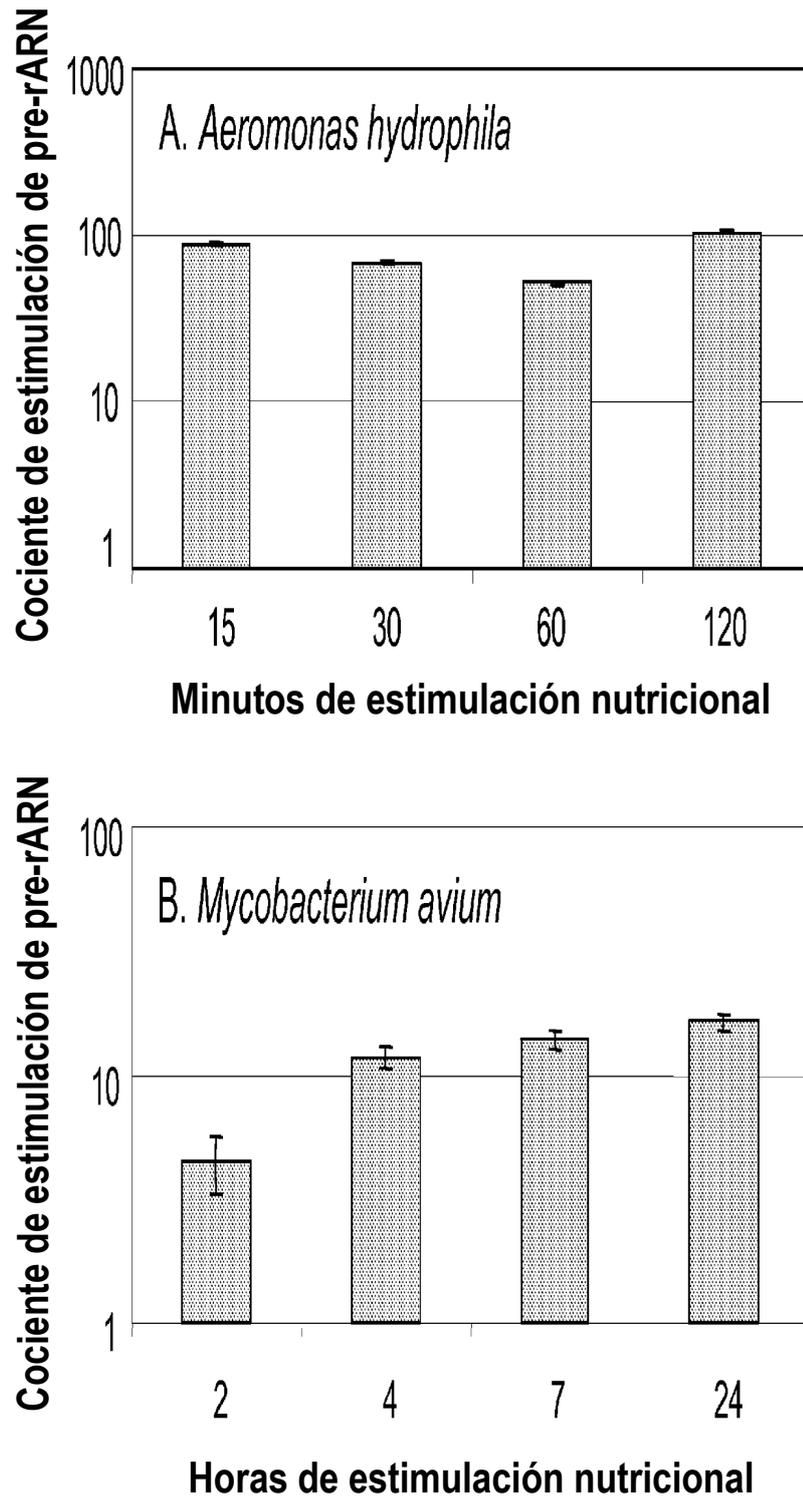


FIG. 3

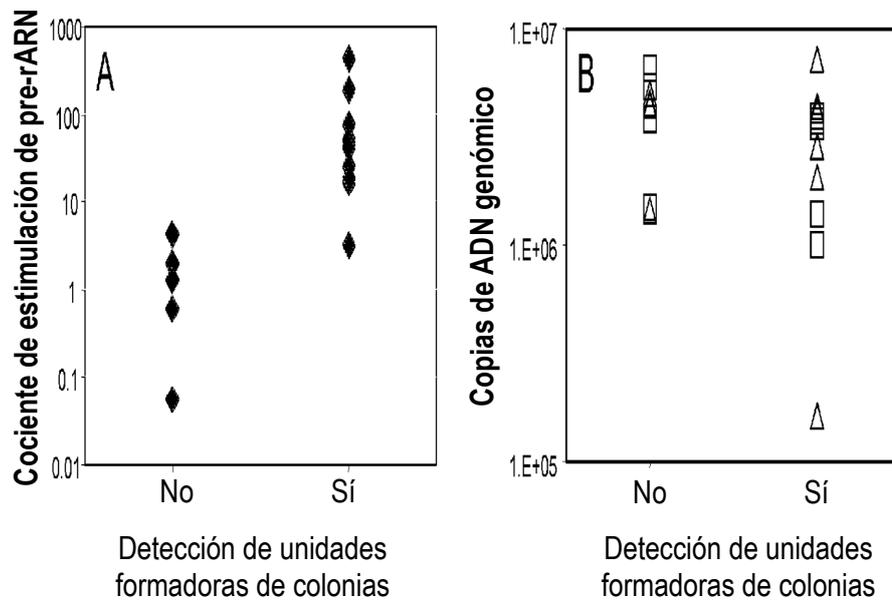


FIG. 4

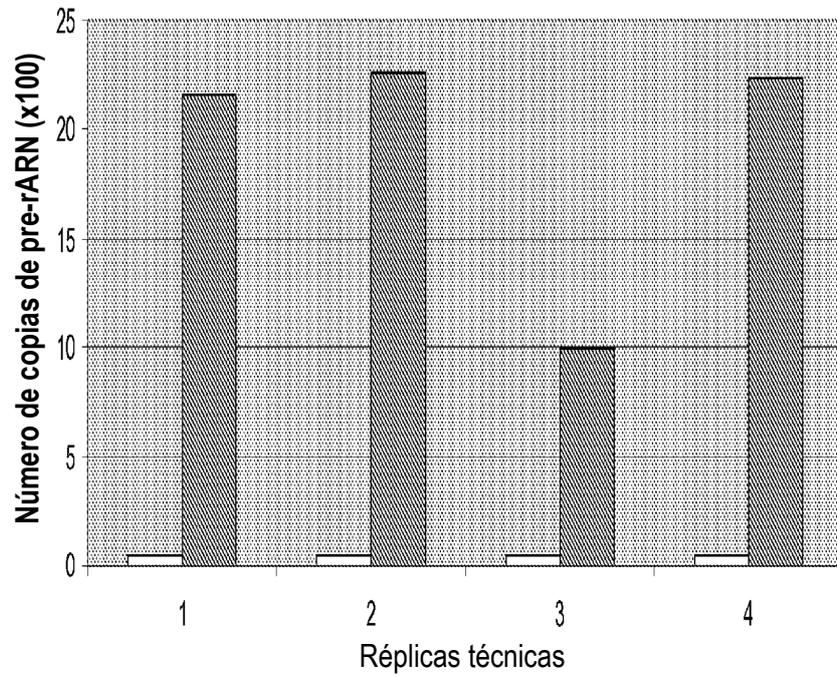


FIG. 5

Géneros (estado gram +/-)	Especies de Ejemplo
<i>Acinetobacter</i> (-)	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Actinobacillus</i> (-)	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans*</i>
<i>Aeromonas</i> (-)	<i>Aeromonas caviae</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Aeromonas veronii biovar sobria</i>
<i>Arcobacter</i> (-)	
<i>Bacteroides</i> (-)	<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>Bordetella</i> (-)	<i>Bordetella bronchiseptica</i> <i>Bordetella parapertussis</i> <i>Bordetella pertussis</i>
<i>Borrelia</i> (-)	<i>Borrelia burgdorferi</i> <i>Borrelia recurrentis</i>
<i>Brucella</i> (-)	<i>Brucella abortus</i> <i>Brucella canis</i> <i>Brucella melintensis</i> <i>Brucella suis</i>
<i>Burkholderia</i> (-)	<i>Burkholderia cepacia</i> <i>Burkholderia mallei</i> <i>Burkholderia pseudomallei</i>

FIG. 6

<i>Campylobacter</i> (-)	<i>Campylobacter coli</i> <i>Campylobacter fetus</i> <i>Campylobacter jejuni</i> <i>Campylobacter lari</i>
<i>Citrobacter</i> (-)	<i>Citrobacter diversus</i> <i>Citrobacter freundii</i>
<i>Cronobacter</i> (-)	<i>Cronobacter sakazakii</i>
<i>Edwardsiella</i> (-)	<i>Edwardsiella tarda</i>
<i>Enterobacter</i> (-)	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter agglomerans</i> <i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Escherichia</i> (-)	<i>Escherichia coli</i> EaggEC = E. coli enteronegativa EHEC = E. coli enterohemorrágica EIEC = E. coli enteroinvasiva EPEC = E. coli enteropatógena ETEC = E. coli enterotoxígena Escherichia coli oportunista UPEC = E. coli uropatógena
<i>Eubacterium</i> (-)	
<i>Francisella</i> (-)	<i>Francisella tularensis</i>
<i>Fusobacterium</i> (-)	

FIG. 6 cont.

<i>Haemophilus</i> (-)	<i>Haemophilus aegyptius</i> <i>Haemophilus ducreyi</i> <i>Haemophilus haemolyticus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Haemophilus parahaemolyticus</i> <i>Haemophilus parainfluenzae</i>
<i>Helicobacter</i> (-)	<i>Helicobacter cinaedi</i> <i>Helicobacter fennelliae</i> <i>Helicobacter pylori</i>
<i>Klebsiella</i> (-)	<i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Legionella</i> (-)	<i>Legionella pneumophila</i>
<i>Leptospira</i> (-)	<i>Leptospira interrogans</i> <i>Leptospira interrogans serogrupo canicola</i> <i>Leptospira interrogans serogrupo icterohaemorrhagiae</i> <i>Leptospira interrogans serogrupo pomona</i>
<i>Moraxella</i> (-)	<i>Moraxella catarrhalis</i>
<i>Morganella</i> (-)	<i>Morganella morganii</i>
<i>Neisseria</i> (-)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Pasteurella</i> (-)	<i>Pasteurella multocida</i>

FIG. 6 cont.

<i>Plesiomonas</i> (-)	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
<i>Porphyromonas</i> (-)	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>Prevotella</i> (-)	
<i>Proteus</i> (-)	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Proteus vulgaris</i>
<i>Providencia</i> (-)	<i>Providencia alcalifaciens</i> <i>Providencia rettgeri</i> <i>Providencia stuartii</i>
<i>Pseudomonas</i> (-)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Salmonella</i> (-)	<i>Salmonella enterica</i> <i>Salmonella choleraesuis</i> <i>Salmonella enteritidis</i> <i>Salmonella paratyphi</i> <i>Salmonella typhi</i> <i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Serratia</i> (-)	<i>Serratia liquifaciens</i> <i>Serratia marcesans</i>
<i>Shigella</i> (-)	<i>Shigella boydii</i> <i>Shigella dysenteriae</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Shigella sonnei</i>

FIG. 6 cont.

<i>Stenotrophomonas</i> (-)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Treponema</i> (-)	<i>Treponema carateum</i> <i>Treponema denticola</i> <i>Treponema pallidum</i>
<i>Veillonella</i> (-)	
<i>Vibrio</i> (-)	<i>Vibrio alginolyticus</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Vibrio damsela</i> <i>Vibrio fluvialis</i> <i>Vibrio furnisii</i> <i>Vibrio hollisae</i> <i>Vibrio metchnikovii</i> <i>Vibrio mimicus</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>Vibrio vulnificus</i>
<i>Yersinia</i> (-)	<i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Yersinia pestis</i> <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
<i>Actinomyces</i> (+)	<i>Actinomyces israelii</i> <i>Actinomyces naeslundii</i>

FIG. 6 cont.

Bacillus (+)	<i>Bacillus anthracis</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus stearothermophilus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus thuringiensis</i>
Bifidobacterium (+)	
Clostridium (+)	<i>Clostridium botulinum</i> <i>Clostridium difficile</i> <i>Clostridium perfringens</i>
Corynebacterium (+)	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Corynebacterium jeikeum</i> <i>Corynebacterium urealyticum</i>
Enterococcus (+)	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i>
Lactobacillus (+)	
Listeria (+)	<i>Listeria monocytogenes</i>
Micrococcus (+)	
Mobiluncus (+)	
Mycobacterium (+)	<i>Complejo Mycobacterium avium</i> <i>Mycobacterium kansasii</i> <i>Mycobacterium leprae</i>

FIG. 6 cont.

	<i>Mycobacterium marinum</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium ulcerans</i> <i>Otras micobacterias no tuberculosas de crecimiento lento</i> <i>Micobacterias no tuberculosas de crecimiento rápido</i>
Nocardia (+)	<i>Nocardia asteroides</i> <i>Nocardia brasiliensis</i>
Peptostreptococcus (+)	
Propionibacterium (+)	<i>Propionibacterium acnes</i>
Rhodococcus (+)	
Staphylococcus (+)	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus saprophyticus</i>
Streptococcus (+)	<i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus anginosus</i> <i>Streptococcus bovis</i> <i>Streptococcus equismilis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Estreptococos viridans que incluyen</i> <i>Streptococcus mutans</i>
Streptomyces (+)	

FIG. 6 cont.

ES 2 616 235 T3

Microorg. objetivo	Cebador directo 1	Cebador inverso 1	Cebador directo 2	Cebador inverso 2	Cebador 1 de transcriptasa inversa	Cebador 2 de transcriptasa inversa	Cebador 3 de transcriptasa inversa
<i>Mycobacterium avium complex</i>	TTGGCCATACCTAGCACTCC (SEQ ID NO: 1)	GATTCGCCACGTGTACTCA (SEQ ID NO: 2)			GCCCGCACGCTCACAGTTAAG (SEQ ID NO: 3)		
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATTGAGCCGCTTAACAGG (SEQ ID NO: 4)	AACTGTTATCCCGCTGAC (SEQ ID NO: 5)			CTACAAGCTCTAGCTGGACAGT (SEQ ID NO: 6)		
<i>Bacillus anthracis</i>	ACAAACAACGTGAACGTCAAT (SEQ ID NO: 7)	GTCCGCGGTAAGTTCATAA (SEQ ID NO: 8)	AACTTTATTGGAGAGTTTGATCTG (SEQ ID NO: 9)	CCCGAGTATCCAGTCTT (SEQ ID NO: 10)	CAGTTTCAATGACCCCTCA (SEQ ID NO: 11)	TGCACCTCAAGTCTCCAGTT (SEQ ID NO: 12)	GAGCGTTACCTCACCAACT (SEQ ID NO: 13)
<i>Bordetella pertussis</i>	GATCAGGCTCCACACAGAG (SEQ ID NO: 14)	CCACGCTTTCCGCTAGTAT (SEQ NO: 15)	AAGCGATACGATCCTGTT (SEQ NO: 16)	CCGACTTGCATGTGTAAGC (SEQ NO: 17)	GCCCGTAGTAAAAATGAG (SEQ NO: 18)	AAGGTTAAGCCCTGGGATTC (SEQ NO: 19)	TCCTCAAAACAGCTACGG (SEQ NO: 20)
<i>Borrelia burgdorferi</i>	GCCAAAAGATAAACAACCTG (SEQ NO: 21)	CGTTTGACTTCATGCTTA (SEQ NO: 22)	TTGGAAGATGAGAGAGGGAG (SEQ NO: 23)	TTGCAACTGAATGATTCG (SEQ NO: 24)	AGTTTCAAGATAGCTCCACA (SEQ NO: 25)	AGTTGAGCTGTGGTATTTATCG (SEQ NO: 26)	TGCTTGGTAGGCATTTACC (SEQ NO: 27)
<i>Campylobacter jejuni</i>	TTTAGGATTAAGCAATTATGTAATC (SEQ NO: 28)	CGTCACTCTGAGCCAGAT (SEQ NO: 29)	GATTTAGGATAAGCAATTATGTAATC (SEQ NO: 30)	AGCCAGATCAAACTCTCCA (SEQ NO: 31)	GAGACTTGATAAATCCGCTACG (SEQ NO: 32)	CCTACGGCCCTTTACG (SEQ NO: 33)	TGTTTCAACTGTTGCTCT (SEQ NO: 34)
<i>Clostridium difficile</i>	AAGAAACAACCAATAAACCAGA (SEQ NO: 35)	TGCTCAACTGCATGTGTT (SEQ NO: 36)	TTTGATAACATAGTATCTGAGCCTGA (SEQ NO: 37)	GGTAGGTTACCCACGGTTA (SEQ NO: 38)	TCCACTCTCTCTCCTCCAC (SEQ NO: 39)	TGCACCTCAAGTCTCCAGTT (SEQ NO: 40)	CGTAGGAGTTGGACCGTGT (SEQ NO: 41)
<i>Escherichia coli</i>	GTGCAAGAGCAAAAATGAA (SEQ NO: 42)	TGCACTTCATGTGTTAGCC (SEQ NO: 43)	TCTTTGAGCATCAAACTTTAAATG (SEQ NO: 44)	CAGGAGTTTCCAGACATT (SEQ NO: 45)	TCAGATGCAATCCAGGTT (SEQ NO: 46)	CCCGGGGATTCACATCT (SEQ NO: 47)	CTCAGACCAAGCTAGGGATCG (SEQ NO: 48)
<i>Haemophilus influenzae</i>	CGATTGAAGTTGAATTGAAGGTTT (SEQ NO: 49)	CAGTCTCAGCAAGAAGCA (SEQ NO: 50)	TTGAAGTCTTAATAGGTGCTTAAGTA (SEQ NO: 51)	CTTCTCCTGCTACCGTTG (SEQ NO: 52)	CTGAAATGCAATCCAGGT (SEQ NO: 53)	GGGGCTTTCACACTCACT (SEQ NO: 54)	CAGTCCCGACTTTGATCTT (SEQ NO: 55)
<i>Helicobacter pylori</i>	GTTGTTAGGAATAACAAC (SEQ NO: 56)	AGCTTCATCGTTGACTTGC (SEQ NO: 57)	CGAGTCTTGTGATAGCCTAAA (SEQ NO: 58)	TTCCAAAGGATATCCCAAC (SEQ NO: 59)	CTCCACACTCTAGAAATAGT (SEQ NO: 60)	ACACTCTAGAAATAGTATTTCAATG (SEQ NO: 61)	
<i>Legionella pneumophila</i>	AGAGCTAGTGCCCGAATTGA (SEQ NO: 62)	TGAGTTTCCCAAGTTGCC (SEQ NO: 63)	GACAACTGTGTGGGCACTT (SEQ NO: 64)	GCTAGACAATGCTGCGGTC (SEQ NO: 65)	AGTTAAGCCAGGAATTCA (SEQ NO: 66)	ATTATCTGACCGTCCAGTT (SEQ NO: 67)	GTCCCAAGCTTTGCTCT (SEQ NO: 68)
<i>Listeria monocytogenes</i>	AGCTGTTTTCAAAAACAACCTA (SEQ NO: 69)	CGTAGCCAGGATCAAACTC (SEQ NO: 70)	GCTGTTTTCAAAAACAACCTA (SEQ NO: 71)	AGCAAGCTCTTCCGCTTC (SEQ NO: 72)	GGGGCTTTCACATCAGACTT (SEQ NO: 73)	AATGACCCCTCCCGGTTA (SEQ NO: 74)	AGGTTGCCAGCTGTACTCT (SEQ NO: 75)

FIG. 7

ES 2 616 235 T3

<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	TTTCCAAGGGAGTGTGG (SEQ NO: 76)	ACCCAGTTCCAGGCTTAT (SEQ NO: 77)	TACCTTGGCTCCCTTTCC (SEQ NO: 78)	TCAGCCAGGTGTACTCACC (SEQ NO: 79)	GCCCGACGGTCACAGTTAAG (SEQ NO: 80)	GTCTGGCCGTATCTCAGTC (SEQ NO: 81)	CGTCAGCCGCAACAG (SEQ NO: 82)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	TGTCGGTTCTTTGAAGCAG (SEQ NO: 83)	CCGGTACGTCGATATGTT (SEQ NO: 84)	GCAGACCAAGAAATAAAAAGTAGAGA (SEQ NO: 85)	ATCAGTTATCCCGCTACC (SEQ NO: 86)	GGGGATTCACATCCTGCT (SEQ NO: 87)	ACTGAGTCACCCAGTTACG (SEQ NO: 88)	CTACTGATCGTCGCCITGGT (SEQ NO: 89)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	GGTAATAATCGCGCTCTGA (SEQ NO: 90)	CCCTGACTTGCATGTGTTA (SEQ NO: 91)	CGAGGTGTACTACTGATAAATCG (SEQ NO: 92)	CCATCGCTAGCGTTCATCC (SEQ NO: 93)	GTTCAACGGCAGGCTGA (SEQ NO: 94)	GAGCGCTCAGTTCCACC (SEQ NO: 95)	GTCGCTCTTCAAGGGTTA (SEQ NO: 96)
<i>Treponema pallidum</i>	GATCCTGGCTCAGAACGAC (SEQ NO: 97)	GCAGATTCCCGAGGTTAC (SEQ NO: 98)	CCTGGAAGGGGGTTAGA (SEQ NO: 99)	TTACTACCGAGTCCGGCACT (SEQ NO: 100)	GATTCCACCCCTACACTTGG (SEQ NO: 101)	GTTCCCGCTCCGTGATTCTA (SEQ NO: 102)	TCTCAGGTCGGATACCCATC (SEQ NO: 103)
<i>Vibrio cholerae</i>	GGATCATTGACGACAGTCAA (SEQ NO: 104)	TGCACTTCATGTGTAGGC (SEQ NO: 105)	CAGTATTCATTGAGCCGAAGC (SEQ NO: 106)	ATGGTTATCCCGCTCAGCG (SEQ NO: 107)	GTCAGTTTCAAATCGATTCC (SEQ NO: 108)	TCCGATTCCTAGGTTGAGC (SEQ NO: 109)	CAGACGAGCTAGGGATCGTC (SEQ NO: 110)

FIG. 7 cont.