

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 955**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/02 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)
C12R 1/19 (2006.01)
C12R 1/385 (2006.01)
C12R 1/45 (2006.01)
C12R 1/49 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.05.2013 PCT/US2013/039574**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.11.2013 WO13166460**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2013 E 13784842 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017 EP 2844762**

54 Título: **Evaluación de la susceptibilidad a antibióticos utilizando sondas para arn prerribosómico**

30 Prioridad:

04.05.2012 US 201261643009 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.04.2018

73 Titular/es:

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (50.0%)
1111 Franklin Street
Oakland, CA 94607-5200, US y
UNITED STATES GOVERNMENT REPRESENTED BY THE DEPARTMENT OF VETERANS AFFAIRS (50.0%)

72 Inventor/es:

HAAKE, DAVID;
HALFORD, COLIN;
BABBITT, JANE T. y
CHURCHILL, BERNARD M.

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 663 955 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

Evaluación de la susceptibilidad a antibióticos utilizando sondas para arn prribosómico

La presente solicitud reclama el beneficio de prioridad de la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos No. 61/643 009, presentada el 4 de mayo de 2012.

5 **DECLARACIÓN SOBRE INVESTIGACIÓN CON PATROCINIO FEDERAL**

Esta invención se hizo con apoyo del Gobierno bajo AI075565, otorgado por los Institutos Nacionales de Salud. El Gobierno posee ciertos derechos sobre la invención. Este trabajo fue financiado por el Departamento de Asuntos Veteranos de Estados Unidos, y el Gobierno Federal tiene ciertos derechos en la invención.

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

10 La presente invención se refiere generalmente a los materiales y métodos de prueba y determinación de susceptibilidad antibiótica en especímenes de fluidos corporales y otras muestras. La invención también se refiere a materiales y métodos para el monitoreo del estado fisiológico de los cultivos bacterianos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Hay una necesidad urgente para el desarrollo de métodos rápidos y convenientes para la detección e identificación de patógenos bacterianos en especímenes clínicos para orientar en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas. La terapia con antibióticos se basa en la identificación del patógeno y su sensibilidad antibiótica. El tratamiento no debe retrasarse debido a la gravedad de la enfermedad y así a menudo se inicia antes de que esta información esté disponible. La eficacia de los antibióticos individuales varía con la resistencia del patógeno bacteriano a los antibióticos. Los resultados terapéuticos pueden mejorarse significativamente por la disponibilidad
20 de un ensayo rápido de susceptibilidad a los antibióticos.

Sigue siendo una necesidad urgente el desarrollo de métodos rápidos y convenientes para detección y pruebas de susceptibilidad a los antibióticos. La presente invención trata esta necesidad y otras, como se describe a continuación.

SUMARIO DE LA INVENCION

25 La invención proporciona un método para determinar si una muestra de bacterias de interés es susceptible a un agente según se define mediante las reivindicaciones adjuntas a esta descripción. En una modalidad, el método comprende poner en contacto con una sonda que se une específicamente a una secuencia diana del ácido ribonucleico ribosómico ARN (rARN), más específicamente, ARN prribosómico (prARN), de las bacterias de interés. En una modalidad, la secuencia diana comprende el empalme, o sitio del empalme, entre prARN y ARN
30 ribosómico maduro (mrARN). La sonda es una sonda única o un par de sondas, como una sonda de captura y una sonda de detección. En una modalidad, la sonda es una sonda única que hibrida específicamente a la secuencia diana que abarca el sitio del empalme del prARN-mrARN. En otra modalidad, la sonda es un par de sondas que colectivamente hibrida específicamente a una secuencia diana que abarca el sitio del empalme del prARN-mrARN. Por ejemplo, cada una de las sondas puede hibridar a un lado del sitio de empalme prARN-mrARN y las dos sondas
35 juntas hibridan a una longitud contigua de la secuencia diana de prARN que abarca el sitio del empalme. La sonda se pone en contacto con la muestra tanto en presencia como en ausencia del agente antibiótico. Una cantidad reducida de hibridación de la sonda en la presencia del agente antibiótico en relación con la cantidad de hibridación de la sonda en la ausencia del agente antibiótico es indicativa de la susceptibilidad de la muestra al antibiótico.

40 El método comprende poner en contacto un espécimen obtenido de la muestra de bacterias con una sonda o par de sondas de oligonucleótidos en ausencia del agente. La sonda o el par de sondas hibrida específicamente a una secuencia diana sobre toda la longitud de la secuencia diana, en donde la secuencia diana consiste en 25-35 nucleótidos contiguos de ARN (rARN) ribosómico bacteriano que abarcan un sitio de empalme entre una cola pre-ribosómica de ARN (prARN) y ARN ribosómico maduro (mrARN). El método además comprende poner en contacto un espécimen obtenido de la muestra con la sonda o par de sondas en presencia del agente antibiótico; y la
45 detección de las cantidades relativas de la hibridación de la sonda a la secuencia diana en los especímenes bajo las dos condiciones de contacto. La muestra se identifica como susceptible al tratamiento con antibióticos si se reduce la cantidad de hibridación de la sonda a la secuencia diana en presencia de antibiótico en al menos un 80% en relación con la cantidad de hibridación de la sonda a la secuencia diana en presencia de antibiótico. Opcionalmente, el método además comprende inocular el espécimen en un medio de crecimiento antes de los pasos de contacto.

50 El rARN bacteriano es típicamente rARN 23S o puede ser rARN 16S. La sonda o sondas de oligonucleótidos tiene(n) normalmente cada una entre 10 a 50 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, las sondas son de 12-30 nucleótidos de longitud, mientras que, en otras modalidades, varían en longitud de 14-20 nucleótidos de longitud. Opcionalmente, la sonda de oligonucleótidos se etiqueta con un marcador detectable. Los marcadores representativos incluyen, pero no se limitan a, una etiqueta fluorescente, una etiqueta radiactiva, una etiqueta
55 luminiscente, una enzima, biotina, tiol o un tinte. El paso de detección del método puede comprender un análisis

óptico, electroquímico o inmunológico.

En una modalidad, el método además comprende la lisis de la bacteria bajo las condiciones de liberación de prARN de las bacterias antes de los pasos de contacto. Así, la muestra puede ser preparada con un agente de lisis presente. Preferiblemente, el agente de lisis es seleccionado para liberar prARN, pero sin dañar el sitio diana. El direccionamiento del sitio de empalme prARN-mrARN significa que el método se puede realizar sin tratamiento previo del espécimen para agotar el prARN antes del contacto de la sonda con la muestra, y sin colas del prARN empalmado que interfieran con la medición. La capacidad para realizar el método sin tal tratamiento previo facilita el procesamiento rápido de la determinación de la susceptibilidad.

Los agentes antibióticos para las pruebas de susceptibilidad incluyen, pero no se limitan a, Rifampicina, Cloranfenicol, aminoglucósidos, quinolonas o antibióticos beta-lactámicos. Además, puede probarse la eficacia de agentes antibióticos novedosos o candidatos mediante los métodos descritos en este documento. El método se puede utilizar para orientar el diagnóstico y tratamiento de un sujeto a partir del cual se obtuvo el espécimen que contiene bacterias. Por ejemplo, una vez que el método se ha empleado para identificar el antibiótico, o clase de antibiótico, para el cual el espécimen es susceptible, el método puede además comprender la administración del antibiótico al sujeto.

Un método para determinar la eficacia antibiótica de un agente antibiótico candidato puede comprender poner en contacto un espécimen obtenido de la muestra con una sonda o un par de sondas de oligonucleótidos en la ausencia del agente, en donde la sonda o el par de sondas hibrida específicamente a una secuencia diana sobre toda la longitud de la secuencia diana, en donde la secuencia diana comprende de 25-35 nucleótidos contiguos del ARN ribosómico (rARN) bacteriano que abarca un sitio de empalme entre la cola del ARN prerribosómico (prARN) y el ARN ribosómico maduro (mrARN), poner en contacto un espécimen obtenido de la muestra con la sonda o par de sondas en presencia del agente y en presencia de un antibiótico específico para PBP2, como amdinocilina; y detectar las cantidades relativas de la hibridación de la sonda a la secuencia diana en los especímenes. El agente se identifica como eficaz si se reduce la cantidad de hibridación de la sonda a la secuencia diana en presencia del agente en al menos un 80% en relación con la cantidad de hibridación de la sonda a la secuencia diana en ausencia del agente.

La invención proporciona además un dispositivo para detectar pre-rARN en una muestra bacteriana, según se define mediante las reivindicaciones adjuntas a esta descripción. El dispositivo comprende una sonda de oligonucleótidos inmovilizada en un soporte sólido, en donde la sonda de oligonucleótidos tiene aproximadamente entre 10 y 50 nucleótidos de longitud y es capaz de hibridar selectivamente la secuencia diana sobre toda la longitud de la secuencia diana. La secuencia diana comprende de 25-35 nucleótidos contiguos de ARN ribosómico (rARN) bacteriano que abarca un sitio de empalme entre la cola del ARN prerribosómico (prARN) y el ARN ribosómico maduro (mrARN). El soporte sólido es generalmente un electrodo o una membrana. También se contempla un pocillo ELISA o una superficie óptica.

Además, la invención comprende un kit que se puede utilizar en la práctica de los métodos descritos en este documento, es decir, un kit para determinar si una muestra de bacterias es susceptible a un agente antibiótico. El kit comprende una sonda de oligonucleótidos o un par de sondas de oligonucleótidos seleccionadas de las que se describen, saber:

(a) sondas de E. Coli (todas las enterobacterias): 5'-AAGCCTCACGGTTCATT (SEQ ID NO: 5) y GGCGTTGTAAGGTT (SEQ ID NO: 6);

(b) Sondas de Pseudomonas aeruginosa: 5'-AAGCCTCACGGGCAATT (SEQ ID NO: 7) y GGTGTTATATGGTC (SEQ ID NO: 8);

(c) Sondas de Streptococcus pyogenes: AAGTCTCGAGCTATT (SEQ ID NO: 9) y ATTTCTTTTTGGAT (SEQ ID NO: 10); y

(d) Sondas de Staphylococcus aureus: AAGTCTTCGATCGATT (SEQ ID NO: 11) y CATTATTTTTGATT (SEQ ID NO: 12).

Las sondas pueden ser etiquetadas opcionalmente con un marcador detectable. El kit además puede comprender uno o varios recipientes para alojar la(s) sonda(s) y otros reactivos para uso con el método.

La invención también proporciona un método para el monitoreo de la tasa de crecimiento de un cultivo bacteriano, según se define mediante las reivindicaciones adjuntas a esta descripción. El método comprende poner en contacto un espécimen obtenido del cultivo con una sonda o par de sondas que hibrida específicamente a una secuencia diana sobre toda la longitud de la secuencia diana, en donde la secuencia diana consiste en 25-35 nucleótidos contiguos de ARN ribosómico (rARN) bacteriano que abarcan un sitio de empalme entre una cola de ARN prebosómico (prARN) y ARN ribosómico maduro (mrARN). El método además comprende la detección del grado de hibridación de la sonda a la secuencia diana en el espécimen de (a) en relación a un punto de tiempo anterior

relativo; y/o en relación a un control que carece o incluye un componente de medio de crecimiento para ser probado. El cultivo se identifica como en crecimiento, o en una fase logarítmica de crecimiento, si la cantidad de hibridación de la sonda a la secuencia diana en el punto de tiempo posterior aumenta en relación con la cantidad de hibridación de la sonda a la secuencia diana en el punto de tiempo anterior.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Regiones dirigidas por pares de sondas del pre-rARN. Se muestran las estructuras de las moléculas de pre-rARN 16S (SEQ ID NO: 49) y 23S (SEQ ID NO: 50), incluyendo ubicaciones de *termini* (indicadores) de rARN maduro y las regiones dirigidas por pares de sondas de sensor electroquímico para la cola 16S 5' (secuencia entre dos cabezas de flecha de dos puntas) y sitios de empalme 16S y 23S (entre paréntesis).

10 Figura 2. Comparación de pares de sondas del pre-rARN. Los pares de sondas fueron probados para la detección de *E. coli* en las fases de crecimiento log y estacionaria. Se espera que las células en fase log y estacionaria tengan altos y bajos niveles de pre-rARN, respectivamente, produciendo una proporción alta de la señal para células en fase log frente a células en fase estacionaria. Los pares de sondas para pre-rARN 16S tuvieron buena sensibilidad para células en fase log, pero la proporción de la señal para células en fase log vs células en fase estacionaria fue baja. Algunos pares de sondas dirigidas a los sitios de empalme en el *termini* del rARN maduro 16S y 23S tuvieron mayores proporciones de señal para células en fase log frente a las células en fase estacionaria. El par de sondas dirigidas al sitio del empalme en la terminal 3' del rARN 23S tuvo la mejor combinación de sensibilidad y proporción de señal alta de células en fase log frente a células en fase estacionaria.

20 Figuras 3A-3B. Variaciones en los niveles pre-rARN y rARN durante el crecimiento de *E. coli*. Fig. 3A: Los cambios en rARN maduro, pre-rARN y su proporción se midieron en la noche (ON) en cultivos que fueron inoculados posteriormente en medio de crecimiento de MH fresco y se incubaron durante 7 horas a 37°C. Figura 3B: Comparación de la relación rARN maduro/pre-rARN y la tasa de crecimiento durante las diferentes fases de crecimiento. La curva de la tasa de crecimiento es un promedio ponderado determinado a partir del cambio de UFC durante cada período de 30 minutos. Las barras de error estimaron la desviación estándar.

25 Figuras 4A-4B. Volumen celular de *E. coli* frente al número de copias de rARN durante las diferentes fases de crecimiento. Fig. 4A: Correlación entre el volumen celular y el número de copias del rARN por célula en densidades por debajo $OD_{600nm} \leq 1.0$. Fig. 4B: Micrografía electrónica demostrando células progresivamente más pequeñas sobre un tiempo de incubación desde la fase log (2.5 hrs) a la fase estacionaria (7 horas). Las barras de error estimaron la desviación estándar.

30 Figuras 5A - 5D. Respuesta de rARN maduro y pre-rARN a los antibióticos. Los antibióticos tienen efectos diferenciales sobre rRNA y pre-rARN. La rifampicina (Fig. 5A) y ciprofloxacina (Fig. 5C) selectivamente inhibieron la transcripción de nuevo pre-rARN, mientras que la adición del cloranfenicol (Fig. 5B) y la gentamicina (Fig. 5) resultaron en una disminución selectiva de rARN maduro. Las barras de error estimaron la desviación estándar.

35 Figuras 6A-6C. La comparación de cepas de *E. coli* susceptibles y resistentes a ciprofloxacina. El rARN y el pre-rARN se midieron en cultivos de un aislado clínico de *E. coli* susceptible a la ciprofloxacina (EC103) y tres aislados resistentes a la ciprofloxacina (EC135, EC139 y EC197). La cantidad del pre-rARN en la cepa EC103 fue significativamente menor que el que de los aislados resistentes a ciprofloxacina en los 15 min posteriores a la adición del antibiótico. Las barras de error estimaron la desviación estándar.

40 Figura 7. Gráfico que representa la correlación entre las copias del pre-rARN por célula y la tasa de crecimiento bacteriano. La tasa de crecimiento se basa en el volumen celular total medido por turbidez o el aumento en la densidad óptica a 600 nm, con picos en 120 minutos, el mismo tiempo que el pico en el número de copias de pre-rARN por célula.

45 Figura 8. Evaluación de pares de sondas del pre-rARN en bacterias gram-negativas. La relación de las señales de pares de sonda específicas para el pre-rARN a rARN maduro se comparó durante la noche (O/N) en cultivos en fase estacionaria frente a cultivos en fase log de crecimiento. Las señales pre-rARN fueron cuatro veces mayores en las células *Klebsiella* en fase log que en las células *Klebsiella* en fase estacionaria y seis veces mayor en células de *Pseudomonas* en fase log que las células *Pseudomonas* en fase estacionaria.

50 Figura 9. Respuesta del pre-rARN a la cefazolina. La adición de cefazolina a un cultivo de una cepa de *E. coli* susceptible en la fase log de crecimiento dio lugar a una caída de un logaritmo en la cantidad pre-rARN en 30 minutos en comparación con un cultivo sin el antibiótico. Las barras de error estimaron la desviación estándar.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

55 El ARN ribosómico es una molécula diana excelente para sistemas de detección de patógenos debido a su abundancia en la célula bacteriana y a la accesibilidad a las secuencias de firma específicas a especies para la hibridación de sondas (5). (Los números entre paréntesis corresponden a los números en la lista de referencias citadas al final de la Descripción Detallada). Cuando se combina con métodos de la química de superficies sensibles

para reducir al mínimo las señales de fondo no específicas, tales sensores de hibridación de la sonda de rARN son capaces de detectar tan poco como 100 bacterias por ml (2, 7, 16). Las estimaciones de densidad bacteriana son posibles porque, dentro de la gama dinámica del análisis, se observa una correlación log-log entre la concentración de moléculas de rARN diana en el lisado de bacterias y la amplitud de corriente amperométrica generada por el ensayo del sensor electroquímico (9, 11). La exactitud de los métodos de cuantificación bacteriana basados en la detección de rARN es mitigada por las variaciones en el número de moléculas de rARN por célula según el tipo de célula y la fase de crecimiento bacteriano. En *E. coli*, se ha estimado que el número de copias de rARN por célula varía desde tan alto como 72 000 durante la fase log a menos de 6800 durante la fase estacionaria (1).

El precursor de ARN ribosómico (pre-rARN) es una etapa intermedia en la formación de ARN ribosómico maduro (rARN) y es un marcador útil para la tasa de crecimiento y el metabolismo celular. En una modalidad, la invención proporciona un ensayo de sensor electroquímico para pre-rARN de *Escherichia coli* que implica hibridación de sondas de captura y de detección con secciones de cola que son empalmadas lejos durante la maduración del rARN. Una monocapa automontada ternaria (SAM) elaborada sobre superficies de electrodos de oro mediante comontaje de sondas de captura de tioladas con hexanoditiol y tratamiento posterior con 6-mercaptop-1-hexanol redujo al mínimo la señal de fondo y maximizó la relación señal a ruido. La inclusión de controles de calibración interna permitió una estimación precisa del número de copias de pre-rARN por célula. Como es de esperar, la relación del pre-rARN frente al rARN maduro fue baja durante la fase estacionaria y alta durante la fase log. Los niveles de pre-rARN fueron altamente dinámicos, oscilando desde 2 copias por célula durante la fase estacionaria a ~1200 copias por célula en 60 minutos de inoculación en medio de cultivo fresco. La especificidad de la prueba para pre-rARN se validó usando rifampicina y cloranfenicol, que son inhibidores conocidos de la síntesis y procesamiento del pre-rARN, respectivamente. Se encontró que el inhibidor del ADN girasa, ciprofloxacina, actúa de manera similar a rifampicina; una disminución de pre-rARN fue perceptible a los 15 minutos en bacterias susceptibles a la ciprofloxacina. La invención proporciona ensayos para pre-rARN, los cuales proporcionan percepciones en el metabolismo celular, así como indicadores de susceptibilidad antibiótica.

Para abordar la necesidad de datos de resistencia a antibióticos en el momento de la selección inicial de antibióticos, en este documento se describen los métodos para analizar la susceptibilidad a antibióticos de organismos en especímenes clínicos. Así, la invención proporciona un método para detectar e identificar la susceptibilidad a antibióticos en un espécimen que contiene, o se sospecha que contiene, bacterias. En algunas modalidades, el método se utiliza para guiar el diagnóstico y tratamiento de un sujeto a partir del cual se obtuvo el espécimen que contiene bacterias. Por ejemplo, una vez que el método se ha empleado para identificar el antibiótico, o clase de antibiótico para el cual el espécimen es susceptible, el método puede además comprender la administración del antibiótico al sujeto.

Definiciones

Todos los términos científicos y técnicos utilizados en esta solicitud tienen significados comúnmente usados en la materia, a menos que se especifique lo contrario. Como se utiliza en esta solicitud, las siguientes palabras o frases tienen los mismos significados especificados.

Como se usa en este documento, una "sonda de oligonucleótidos" es un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos suficientemente complementaria para su secuencia de ácido nucleico diana para poder formar un dúplex sonda:diana híbrido detectable bajo condiciones de hibridación de alto rigor. Una sonda de oligonucleótidos es una especie química aislada y puede incluir nucleótidos adicionales fuera de la región diana siempre que tales nucleótidos no prevengan la hibridación bajo condiciones de hibridación de alto rigor. Las secuencias no complementarias, tales como secuencias promotoras, sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción, o secuencias que confieren una estructura secundaria o terciaria deseada tales como un sitio activo catalítico pueden utilizarse para facilitar la detección usando las sondas inventadas. Una sonda de oligonucleótidos opcionalmente puede etiquetarse con un marcador detectable tal como un radioisótopo, una entidad fluorescente, una entidad quimioluminiscente, una enzima o un ligando, que puede utilizarse para detectar o confirmar la hibridación de la sonda a su secuencia diana. "Especificidad de la sonda" se refiere a la capacidad de una sonda para distinguir entre secuencias diana y no diana.

El término "ácido nucleico", "oligonucleótido" o "polinucleótido" se refiere a un polímero dexosirribonucleótido o ribonucleótido en cualquier forma simple o doble hebra, y a menos que se limite de otra forma, abarca análogos conocidos de nucleótidos naturales que hibridan a los ácidos nucleicos en una manera similar a los nucleótidos de origen natural.

En este documento, un "marcador detectable" o "etiqueta" es una molécula unida a, o sintetizada como parte de una sonda de ácido nucleico. Esta molécula debe ser detectable en forma única y permitirá que la sonda sea detectada como un resultado. Estas entidades detectables son a menudo radioisótopos, moléculas quimioluminiscentes, enzimas, haptenos, o incluso secuencias de oligonucleótidos únicas.

Como se usa en este documento, un "híbrido" o un "duplex" es un complejo formado entre dos secuencias de ácido nucleico de hebra sencilla en acoplamientos de base de Watson-Crick o acoplamientos de base no-canónicos entre

bases complementarias.

5 Como se usa en este documento, "hibridación" es el proceso por el cual dos hebras complementarias de ácido nucleico se combinan para formar una estructura de doble hebra ("híbrido" o "duplex"). "Rigor" se utiliza para describir la temperatura y la composición del solvente existente durante la hibridación y los pasos de procesamiento posteriores. Bajo altas condiciones de rigor sólo se formarán híbridos de ácido nucleico altamente complementarios; no se formarán híbridos sin un suficiente grado de complementariedad. En consecuencia, el rigor de las condiciones de ensayo determina la cantidad de complementariedad necesaria entre dos hebras de ácido nucleico, formando un híbrido. Las condiciones de rigor se eligen para maximizar la diferencia en estabilidad entre el híbrido formado con el ácido nucleico diana y el no diana. Las condiciones de rigor ejemplares se describen a continuación.

10 Como se usa en este documento, "complementariedad" es una propiedad conferida por la secuencia base de una hebra sencilla de ADN o ARN que puede formar un híbrido o ADN:ADN de doble hebra, ARN:ARN o ADN:ARN a través de enlaces de hidrógeno entre los pares de base de Watson-Crick en las hebras respectivas. La adenina (A) normalmente complementa la timina (T) o uracilo (U), mientras que la guanina (G) normalmente complementa la citosina (C). "Totalmente complementaria", al describir una sonda con respecto a su secuencia diana, significa que la complementariedad está presente a lo largo de toda la longitud de la sonda.

20 Como se usa en este documento, "adyacente", en el contexto de secuencias de nucleótidos y oligonucleótidos, significa inmediatamente uno junto al otro (extremo a extremo), de modo que dos moléculas adyacentes no se traslapan una con la otra y no hay espacio entre ellas. Por ejemplo, dos sondas de oligonucleótidos hibridadas a regiones adyacentes de una molécula de ácido nucleico diana no tienen nucleótidos de la secuencia diana (no acopladas con cualquiera de las dos sondas) entre ellas.

25 Como se usa en este documento, las frases "consiste esencialmente de" o "que consiste esencialmente en" significa que el oligonucleótido tiene una secuencia de nucleótidos sustancialmente similar a una secuencia especificada de nucleótidos. Cualesquiera adiciones o supresiones son variaciones no materiales de la secuencia de nucleótidos especificada que no impiden al oligonucleótido tener su propiedad reivindicada, como por ejemplo poder hibridar preferiblemente bajo condiciones de alto rigor de hibridación a su ácido nucleico diana sobre los ácidos nucleicos no diana.

30 Un experto en la materia comprenderá que las sondas sustancialmente correspondientes de la invención pueden variar de la secuencia referida y todavía hibridar a la misma secuencia de ácido nucleico diana. Esta variación de los ácidos nucleicos puede declararse en términos de porcentaje de bases idénticas dentro de la secuencia o el porcentaje de las bases perfectamente complementarias entre la sonda y su secuencia diana. Las sondas de la presente invención corresponden sustancialmente a una secuencia de ácido nucleico si estos porcentajes son del 100% al 80% o desde 0 desajustes de base en una secuencia diana de 10 nucleótidos hasta 2 bases desajustadas en una secuencia diana de 10 nucleótidos. En modalidades preferibles, el porcentaje es del 100% al 85%. En modalidades más preferibles, este porcentaje es del 90% al 100%; en otras modalidades preferibles, este porcentaje es del 95% al 100%.

35 Por "suficientemente complementario" o "sustancialmente complementario" se entiende ácidos nucleicos que tienen una cantidad suficiente de nucleótidos complementarios contiguos para formar, en condiciones de hibridación de alta rigurosidad, un híbrido que es estable para la detección.

40 Por "preferiblemente hibridar" significa que, bajo condiciones de hibridación de alto rigor, las sondas de oligonucleótidos pueden hibridar con sus ácidos nucleicos diana para formar híbridos sonda:diana estables (lo que indica la presencia de ácidos nucleicos diana) sin formar híbridos sonda:no diana estables (que indicarían la presencia de ácidos nucleicos no diana de otros organismos). Así, la sonda hibrida al ácido nucleico diana a un grado lo suficientemente mayor que a un ácido nucleico no diana para permitir que un experto en la materia pueda detectar con precisión la presencia de las bacterias relevantes y distinguir su presencia sobre la de otros organismos. La hibridación preferencial puede medirse utilizando técnicas conocidas en la técnica y se describe aquí.

50 Como se usa en este documento, una "región de secuencia de ácido nucleico diana" de un patógeno se refiere a una secuencia de ácido nucleico presente en el ácido nucleico de un organismo o una secuencia complementaria del mismo, que no está presente en los ácidos nucleicos de otras especies. Los ácidos nucleicos que tienen secuencias de nucleótidos complementarias a la secuencia diana pueden generarse por técnicas de amplificación de la diana tales como la reacción en cadena de una polimerasa (PCR) o la transcripción mediada por amplificación.

Como se usa en este documento, "temperatura ambiente" significa cerca de 20-25°C.

Como se usa en este documento, "un" o "uno" significa por lo menos uno, a menos que se indique claramente lo contrario.

55 Sondas de la Invención

La invención proporciona las sondas de oligonucleótidos específicos para rARN bacteriano. En una modalidad típica, las sondas son totalmente complementarias con la secuencia diana. Las secuencias diana representativas para hibridación de la sonda con rARN de las especies bacterianas indicadas se presentan a continuación:

Secuencia diana de *E. coli* (todas las enterobacterias):

5 AATGAACCGTGAGGCTT|AACCTTACAACGCCGAAGCTGTTTTGGCGGATTG (SEQ ID NO: 1);

Secuencia diana de *Pseudomonas aeruginosa*:

AATTGCCCGTGAGGCTT|GACCATATAACACCCAACAATCTGACGATTGT (SEQ ID NO:2);

Secuencia diana del *Streptococcus pyogenes*:

AATAGCTCGAGGACTT|ATCCAAAAAGAAATATTGACAACGTTACGGATTCTTG (SEQ ID NO: 3);

10 Secuencia diana del *Staphylococcus aureus*:

AATCGATCGAAGACTT|AATCAAATAAATGTTTTGCGAAGCAAATCACTT (SEQ ID NO: 4);

donde | indica el sitio del empalme entre prARN y mARN.

Los pares de sondas representativos dirigidos a estas secuencias diana incluyen las siguientes:

15 Sondas de *E. coli* (todas las enterobacterias): 5'-AAGCCTCACGGTTCATT (SEQ ID NO: 5) y GGCGTTGTAAGGTT (SEQ ID NO: 6);

Sondas de *Pseudomonas aeruginosa*: 5'-AAGCCTCACGGCAATT (SEQ ID NO: 7) y GGTGTTATATGGTC (SEQ ID NO: 8);

Sondas de *Streptococcus pyogenes*: AAGTCTCGAGCTATT (SEQ ID NO: 9) y ATTTCTTTTTG GAT (SEQ ID NO: 10); y

20 Sondas de *Staphylococcus aureus* AAGTCTTCGATCGATT (SEQ ID NO: 11) y CATTTATTTTGATT (SEQ ID NO: 12).

Los oligonucleótidos pueden prepararse usando cualquiera de una variedad de técnicas conocidas en la materia. Las sondas de oligonucleótidos de la invención incluyen las secuencias que se muestran arriba y en la Tabla 1 del Ejemplo abajo, y secuencias equivalentes que exhiben esencialmente la misma capacidad para formar un dúplex sonda:diana híbrido detectable bajo condiciones de hibridación de alto rigor. Las sondas de oligonucleótidos por lo general varían en tamaño desde 10 a 50 nucleótidos de longitud. Las sondas preferidas son de 10-35 nucleótidos de longitud, con 10-25 nucleótidos siendo óptimo para algunas condiciones. Se conoce en la técnica una variedad de etiquetas detectables incluyendo, pero no limitado a, etiquetas enzimáticas, fluorescentes y de radioisótopos.

30 Como se utiliza en este documento, "condiciones altamente rigurosas" o "condiciones de alta rigurosidad" son aquellas que: (1) emplean baja fuerza iónica y temperatura alta para lavarse, por ejemplo 0.015 M cloruro de sodio/0.0015 M citrato de sodio/0.1% dodecil sulfato de sodio a 50°C; (2) emplean durante la hibridación un agente de desnaturalización, como la formamida, por ejemplo, 50% (v/v) de formamida con 0.1% de seroalbúmina bovina/0.1% Ficoll/0.1% polivinilpirrolidona/50 mM tampón de fosfato de sodio a pH 6.5 con 750 mM de cloruro sódico, 75 mM de citrato de sodio 42°C; o (3) emplean 50% de formamida, 5 x SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M de citrato de sodio), 50 mM de fosfato de sodio (pH 6.8), 0.1% de pirofosfato de sodio, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), 0.1% SDS y 10% de sulfato de dextrano a 42°C, con lavados a 42°C en 0.2 x SSC (cloruro de sodio/citrato de sodio) y 50% de formamida a 55°C, seguido de un lavado con alto rigor de 0.1 x SSC conteniendo EDTA a 55°C. El experto en la materia reconocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc. según sea necesario para acomodar los factores tales como longitud de la sonda y similares.

40 Una ventaja de las sondas de la invención es su capacidad de hibridar a la secuencia diana con suficiente selectividad y resistencia a temperatura ambiente y sin requerir el uso de un agente de desnaturalización. Las sondas de la invención pueden utilizarse para detección de dianas específicas para especies a temperatura ambiente (o a la temperatura corporal), a pH nativo (7.0) en un tampón de fosfato 1 M. Por consiguiente, para las sondas cortas (10-35 bases de longitud) de la invención, "condiciones altamente rigurosas" incluyen la hibridación y los lavados de 20°C a 39°C en tampón de fosfato 1 M, u otro tampón que contenga una solución de sal adecuada, pH nativo (en o cerca de 7.0).

45 Las "condiciones moderadamente rigurosas" adecuadas incluyen prelavado en una solución 5 X SSC, 0.5% SDS, 1,0 mM EDTA (pH 8.0); hibridación a 50°C-65°C, 5 X SSC, durante la noche; seguido por el lavado dos veces a 65°C durante 20 minutos con cada uno de 2X 0.5X y 0.2X SSC conteniendo 0.1% SDS.

Cualquier polinucleótido puede ser modificado aún más para aumentar la estabilidad. Las posibles modificaciones incluyen, pero no se limitan a, la adición de secuencias flanqueantes en los extremos 5' y/o 3'; el uso de fosfotioato o 2' O-metil en lugar de los enlaces de la fosfodiesterasa en la cadena principal; y/o la inclusión de bases no tradicionales como inosina, queosina y wibutosina, así como acetil-, metil-, tio- y otras formas modificadas de adenina, citidina, guanina, timina y uridina.

Las secuencias de nucleótidos se pueden unir a una variedad de otras secuencias de nucleótidos utilizando técnicas de ADN recombinante establecidas. Por ejemplo, un polinucleótido puede ser clonado en cualquiera de una variedad de vectores de clonación, como plásmidos, fagémidos, derivados de fago lambda y cósmidos. Los vectores de interés particular incluyen vectores de generación de sonda. En general, un vector contiene un origen de replicación funcional en al menos un organismo, sitios convenientes de endonucleasa de restricción y uno o más marcadores seleccionables. Otros elementos dependerán del uso deseado y serán evidentes para los expertos en la técnica.

Métodos de Detección de Susceptibilidad a Antibióticos

La invención proporciona un método para determinar si una muestra de bacterias de interés es susceptible a un agente antibiótico según se define mediante las reivindicaciones adjuntas a esta descripción. En una modalidad, el método comprende poner en contacto con una sonda que se une específicamente a una secuencia diana que comprende 25-35 nucleótidos contiguos de ARN ribosómico (rARN), más específicamente ácido ribonucleico prerribosómico (prARN), de las bacterias de interés. En una modalidad, la secuencia diana comprende la unión, o sitio del empalme, entre prARN y ARN ribosómico maduro (mrARN). La sonda puede ser una sonda única o un par de sondas, como una sonda de captura y una sonda de detección. En una modalidad, la sonda es una sonda única que hibrida específicamente a la secuencia diana que abarca el sitio del empalme del prARN-mrARN. En una modalidad, la sonda es un par de sondas que, en conjunto, hibrida específicamente a la secuencia diana que abarca el sitio de empalme del prARN-mrARN. Por ejemplo, una de las sondas puede hibridar a cualquier lado del sitio de empalme del prARN-mrARN. La sonda se pone en contacto con la muestra tanto en presencia como en ausencia del agente antibiótico. Una cantidad reducida de hibridación de la sonda en la presencia del agente antibiótico en relación con la cantidad de hibridación de la sonda en ausencia del agente antibiótico es indicativa de la susceptibilidad de la muestra al antibiótico.

El método comprende poner en contacto un espécimen obtenido de la muestra de bacterias con una sonda o un par de sondas de oligonucleótidos en ausencia del agente. La sonda o el par de sondas hibrida específicamente a la secuencia diana sobre toda la longitud de la secuencia diana, en donde la secuencia diana consiste en 25-35 nucleótidos contiguos de ARN ribosómico bacteriano (rARN) que abarca un sitio de empalme entre una cola de ARN prerribosómico (prARN) y ARN ribosómico maduro (mrARN). El método además comprende poner en contacto un espécimen obtenido de la muestra con la sonda o par de sondas en presencia del agente antibiótico; y la detección de las cantidades relativas de la hibridación de la sonda a la secuencia diana en los especímenes bajo ambas condiciones de contacto. La muestra se identifica como susceptible al tratamiento con antibiótico si la cantidad de hibridación de la sonda a la secuencia diana en presencia de antibiótico se reduce al menos el 80% en relación con la cantidad de hibridación de la sonda a la secuencia diana en ausencia de antibióticos. En otra modalidad, la cantidad de hibridación a la secuencia diana se reduce por 40%, 50%, 60%, 70%, 90% o 95%, en relación con la cantidad de hibridación de la sonda a la secuencia diana en la ausencia de antibiótico. Opcionalmente, el método además comprende inocular el espécimen en un medio de crecimiento antes de los pasos de contacto.

El rARN bacteriano normalmente es rARN 23S, o puede ser rARN 16S. Normalmente, el rARN es rARN 23S. La sonda o sondas de oligonucleótidos están normalmente cada una entre aproximadamente 10 a 50 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, las sondas son de 12-30 nucleótidos de longitud, mientras que en otras varían en longitud a partir de 14-20 nucleótidos de longitud. Opcionalmente, la sonda de oligonucleótidos se etiqueta con un marcador detectable. Los marcadores representativos incluyen, pero no se limitan a, una etiqueta fluorescente, una etiqueta radiactiva, una etiqueta luminiscente, una enzima, biotina, tiol o un tinte. El paso de detección del método puede comprender un análisis óptico, electroquímico o inmunológico.

En una modalidad, el método además comprende la lisis de las bacterias bajo condiciones que liberan rARN de las bacterias de los pasos de contacto previos. Así, la muestra puede ser preparada con un agente de lisis presente. Preferiblemente, el agente de lisis es seleccionado para liberar rARN, pero sin dañar el rARN. El direccionamiento del sitio de empalme prARN-mrARN significa que el método se puede realizar sin tratamiento previo del espécimen para agotar el prARN antes del contacto de la sonda con la muestra, y sin colas del prARN empalmadas que interfieran con la medición. La capacidad para llevar a cabo el método sin tal tratamiento previo facilita el procesamiento rápido de la determinación de la susceptibilidad.

Los agentes antibióticos para las pruebas de susceptibilidad incluyen, pero no se limitan a, rifampicina, cloranfenicol, aminoglucósidos, quinolonas o antibióticos beta-lactámicos. Además, puede probarse la eficacia de agentes antibióticos novedosos o candidatos mediante los métodos descritos en este documento. La invención además proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene, o se sospecha que tiene, una infección bacteriana. El método comprende la determinación de la susceptibilidad a antibiótico en un espécimen obtenido del sujeto tal como se describe en este documento, y administrar un antibiótico al sujeto al cual el espécimen es susceptible.

Un método para determinar la eficacia antibiótica de un agente antibiótico candidato puede comprender poner en contacto un espécimen obtenido de la muestra con una sonda o un par de sondas de oligonucleótidos en la ausencia del agente, donde la sonda o el par de sondas hibrida específicamente a la secuencia diana sobre toda la longitud de la secuencia diana, en donde la secuencia diana comprende de 25-35 nucleótidos contiguos de ARN ribosómico bacteriano (rARN) que abarca un sitio de empalme entre la cola del ARN prerribosómico (prARN) y el ARN ribosómico maduro mrARN, poner en contacto un espécimen obtenido de la muestra con la sonda o par de sondas en presencia del agente; y detectar las cantidades relativas de la hibridación de la sonda a la secuencia diana en los especímenes. El agente se identifica como eficaz si se reduce la cantidad de hibridación de la sonda a la secuencia diana en presencia del agente en al menos un 80% en relación con la cantidad de hibridación de la sonda a la secuencia diana en ausencia del agente.

Las bacterias dentro del espécimen pueden lisarse utilizando una de las preparaciones de lisis que se describe en este documento. En una modalidad, la preparación de lisis comprende el tampón de lisis universal que contiene 1% Tritón X-100, 0.1 M KH_2PO_4 , 2 mM EDTA y 1 mg/ml de lisozima. El uso del tampón de lisis universal evita la necesidad de utilizar un tampón de lisis separado para bacterias gram positivas y gram negativas. En esta modalidad, los pasos lentos de purificación del ARN y/o el ADN bacteriano no son necesarios, permitiendo la aplicación directa de una muestra de orina sometida a lisis a las sondas de captura, mejorando la velocidad y eficacia del ensayo. Por consiguiente, el método puede llevarse a cabo mediante primero la lisis de un espécimen de interés para liberar moléculas de ácido nucleico del patógeno.

Alternativamente, el lisado puede ser preparado poniendo en contacto el espécimen ya sea con un primer tampón de lisis que comprende un detergente desnaturizante (por ejemplo, Tritón X-100) y lisozima, o un segundo tampón de lisis que comprende NaOH. Normalmente, se utiliza el Tritón X-100 en 0.1%, la lisozima en 1 mg/ml y NaOH a 1M. En otra modalidad, la lisis comprende poner en contacto el espécimen con ambos tampones en serie, por ejemplo, con el segundo tampón de lisis, antes o después de poner en contacto al espécimen con el primer tampón de lisis. El contacto del espécimen con el(los) tampón(es) normalmente ocurre a temperatura ambiente. Normalmente, el espécimen está en contacto con el tampón de lisis por un total de alrededor de 10 minutos. Cuando se utiliza un primer y un segundo tampón de lisis, el contacto con cada tampón es normalmente de aproximadamente 5 minutos. Aquellos expertos en la materia están conscientes de que pueden variarse el tiempo y la temperatura bajo los cuales se produce el contacto con el tampón de lisis (por ejemplo, temperaturas más altas acelerarán la lisis) y también ser optimizados para un espécimen en particular, el patógeno diana y otras condiciones del ensayo.

El método comprende poner en contacto un espécimen con una o más sondas de detección de la invención bajo condiciones que permitan la hibridación de moléculas de ácido nucleico diana de los patógenos (por ejemplo, bacterias) presentes en el espécimen con las sondas de detección, lo que resulta en moléculas de ácido nucleico diana hibridadas. Una o más sondas diana hibridadas se ponen en contacto con una o más sondas de captura, bajo condiciones que permitan hibridación de sondas de captura con moléculas de ácido nucleico diana.

Por consiguiente, el ácido nucleico diana en última instancia se hibrida con ambas sonda(s) de captura y sonda(s) de detección. Aunque estos dos pasos de hibridación pueden realizarse en cualquier orden, en una modalidad, la sonda de detección se hibrida primeramente con el ácido nucleico diana, después de lo cual el material hibridado se pone en contacto con una sonda de captura inmovilizada. Después de un lavado, la combinación detector:diana:captura se inmoviliza sobre una superficie a la cual se ha unido la sonda de captura. La detección de la sonda unida al ácido nucleico diana es indicativa de la presencia de un patógeno.

Para el uso con sensor electroquímico, tal como el arreglo de sensores disponible de GeneFluidics, Inc. (Monterey Park, CA), el método comprende la detección de la corriente asociada con la unión de sonda a la diana. En una modalidad ilustrada en el siguiente ejemplo, la sonda de captura es etiquetada con biotina e inmovilizada sobre una superficie tratada con estreptavidina. La sonda de detección en este ejemplo está etiquetada con fluoresceína, proporcionando un antígeno al cual se une un anticuerpo etiquetado con peroxidasa de rábano. Esta peroxidasa, en presencia de su sustrato (por lo general, el peróxido de hidrógeno y tetrametilbencidina), cataliza una reacción redox bien caracterizada y genera una corriente de electroreducción medible bajo un potencial de voltaje fijo, proporcionando así una señal electroquímica para detectar la presencia del ácido nucleico diana. Aquellos expertos en la materia están conscientes de las etiquetas alternativas y enzimas que pueden utilizarse en un ensayo electroquímico.

Preferiblemente, el método para la detección de la resistencia a los antibióticos se realiza después de primero identificar y cuantificar el patógeno de interés. El método para detectar la presencia de un patógeno señalado en la Patente de EEUU Núm. 7 763 426 puede utilizarse para identificar el patógeno. La identificación del patógeno orienta la selección del antibiótico cuya resistencia se va a probar. La cuantificación del patógeno orienta en la selección de una proporción adecuada de antibiótico al patógeno para pruebas posteriores. El método se realiza entonces por inoculación del espécimen que contiene el patógeno en un medio de crecimiento. La inoculación se realiza en una dilución determinada por los resultados de la cuantificación. Esta inoculación se realiza preferiblemente tanto en la presencia como en la ausencia de antibióticos. La presencia o cantidad del patógeno se determina entonces, normalmente mediante la comparación de los especímenes inoculados en presencia y en ausencia de antibiótico. Una mayor cantidad de patógeno en presencia del antibiótico es indicativa de resistencia al

antibiótico. La comparación generalmente se basa en comparar la cantidad de oligonucleótidos etiquetados (sonda de detección) complejados con el sustrato para inoculaciones en medio de cultivo en presencia y en ausencia de antibiótico.

Métodos de Seguimiento de la Tasa de Crecimiento Bacteriano

5 La invención también proporciona un método para el seguimiento de la tasa de crecimiento de un cultivo bacteriano según se describe en las reivindicaciones adjuntas a esta descripción. El método comprende poner en contacto un espécimen obtenido del cultivo con una sonda o par de sondas que hibrida específicamente a la secuencia diana sobre toda la longitud de la secuencia diana, en donde la secuencia diana comprende 25-35 nucleótidos contiguos de ARN ribosómico (rARN) bacteriano que abarcan un sitio de empalme entre una cola de ARN pre-ribosómica (prARN) y ARN ribosómico maduro (mrARN). El método además comprende detectar la cantidad de hibridación de la sonda a la secuencia diana en el espécimen con respecto a un punto de tiempo anterior; y/o en relación con un control que carece o incluye un componente de medio de crecimiento para ser probado. El cultivo se identifica como en crecimiento, o en una fase log de crecimiento, si la cantidad de hibridación de la sonda a la secuencia diana en el punto de tiempo posterior aumenta en relación con la cantidad de hibridación de la sonda a la secuencia diana en el punto de tiempo anterior.

Kits y Dispositivos

20 La invención proporciona además un dispositivo para detectar pre-rARN en una muestra bacteriana según se define en las reivindicaciones adjuntas a esta descripción. El dispositivo comprende una sonda de oligonucleótidos inmovilizada en un soporte sólido, en donde la sonda de oligonucleótidos es de entre aproximadamente 10 a 50 nucleótidos en longitud y es capaz de hibridar selectivamente a una secuencia diana sobre toda la longitud de la secuencia diana. La secuencia diana comprende de 25-35 nucleótidos contiguos de ARN ribosómico (rARN) bacteriano que abarca un sitio de empalme entre la cola del ARN prerribosómico (prARN) y el ARN ribosómico maduro (mrARN). El soporte sólido es generalmente un electrodo o una membrana. También se contempla un pocillo ELISA o una superficie óptica.

25 La invención además comprende un kit que se puede utilizar en la práctica de los métodos descritos en este documento, es decir, un kit para determinar si una muestra de bacterias es susceptible a un agente antibiótico. El kit comprende una sonda de oligonucleótidos o un par de sondas de oligonucleótidos seleccionadas de las que se describen en este documento, a saber:

30 (e) sondas de E. Coli (todas las enterobacterias): 5'-AAGCCTCACGGTTCATT (SEQ ID NO: 5) y GGCGTTGTAAGGTT (SEQ ID NO: 6);

(f) Sondas de Pseudomonas aeruginosa: 5'-AAGCCTCACGGGCAATT (SEQ ID NO: 7) y GGTGTTATATGGTC (SEQ ID NO: 8);

(g) Sondas de Streptococcus pyogenes: AAGTCCTCGAGCTATT (SEQ ID NO: 9) y ATTTCTTTTGGAT (SEQ ID NO: 10); y

35 (h) Sondas de Staphylococcus aureus: AAGTCTTCGATCGATT (SEQ ID NO: 11) y CATTTATTTGATT (SEQ ID NO: 12).

40 Las sondas pueden ser etiquetadas opcionalmente con un marcador detectable. El kit además puede comprender de uno o varios recipientes para alojar la(s) sonda(s) y otros reactivos para uso con el método. La invención proporciona además un kit de ensayo para su uso al llevar a cabo el método de la invención. El kit comprende una o más de las sondas que se describen en este documento y, opcionalmente, un recipiente o sustrato. El kit puede comprender un sustrato al que se unen una o más sondas de captura descritas en este documento o están inmovilizadas de otra manera. Opcionalmente, el kit además comprende un contenedor y una o más sondas de detección correspondientes a las sondas de captura. En una modalidad, el sustrato es un arreglo de sensor de electroquímicos.

45 **Ejemplos**

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar la presente invención y ayudar a un experto a hacerlo y usar el mismo. Los ejemplos no pretenden en ningún modo limitar de otro modo el alcance de la invención.

Ejemplo 1: Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana Rápidas por la Detección Sensible del rARN Precursor Utilizando una Plataforma de Biosensores Electroquímicos Novedosa

50 El ARN ribosómico es una molécula diana excelente para sistemas de detección de patógenos debido a su abundancia en la célula bacteriana y a la accesibilidad de secuencias de firma específicas de las especies para la hibridación de la sonda (6). Cuando se combina con métodos de la química de superficies sensibles para reducir al mínimo las señales de fondo no específicas, tales sensores de hibridación de sondas rARN son capaces de detectar

hasta sólo 100 bacterias por ml (2, 8, 17). Las estimaciones de densidad bacteriana son posibles porque, dentro de la gama dinámica del análisis, existe una correlación log-log entre la concentración de moléculas de rARN diana en el lisado bacteriano y la amplitud de corriente amperométrica generada por el ensayo de sensor electroquímico (10, 12). La exactitud de los métodos de cuantificación bacteriana basados en la detección de rARN es mitigada por las variaciones en el número de moléculas de rARN por célula según el tipo de la célula y la fase de crecimiento bacteriano. En *E. coli*, se ha estimado que el número de copias de rARN por célula varía desde tan elevado como 72 000 durante la fase log hasta menos de 6800 durante la fase estacionaria (1).

Los sensores electroquímicos tienen el potencial para determinar rápidamente la susceptibilidad al antibiótico mediante el seguimiento de la respuesta fenotípica de las bacterias a los antibióticos. Se espera que los niveles celulares pre-rARN caigan conforme los antibióticos cambien el metabolismo celular de las bacterias susceptibles a los antibióticos de la fase log a la fase estacionaria. El tamaño de la reserva de pre-rARN en la célula es determinado por las tasas de síntesis y degradación, que son directa o indirectamente afectadas por los antibióticos (3). Por esta razón, desarrollamos y validamos un ensayo electroquímico para la determinación del pre-rARN. Mediante la calibración de la intensidad de la señal del sensor con un estándar interno, y correlacionando estas señales con la densidad bacteriana, fuimos capaces de estimar el número de copias de rARN y pre-rARN por célula. Nuestros estudios proporcionan la nueva percepción en la cinética de niveles de rARN y pre-rARN durante las fases de crecimiento bacteriano, y en la respuesta a ciertos antibióticos. De interés, se determinó que los niveles pre-rARN y/o rARN responden rápidamente a los antibióticos de quinolona, ciprofloxacina y el antibiótico aminoglucósido, gentamicina, en *E. coli* susceptible.

20 Materiales y Métodos

Cepas Bacterianas y Medios. El aislado de orina clínica de *E. coli* EC103 (Amp^R) fue obtenido del Laboratorio de Microbiología Clínica de la Universidad de California-Los Ángeles (UCLA), con la aprobación de la UCLA y las Juntas de Revisión Institucional de Asuntos de Veteranos y exenciones apropiadas del Acta de Responsabilidad y Portabilidad de Seguros Médicos. La EC103 se inoculó en caldo Mueller Hinton (MH) con 12% de glicerol (Becton Dickinson, Sparks, MD) y se almacenó a -80°C. La EC103 fue cultivada durante la noche en caldo MH con 64 µg/ml de ampicilina (Sigma, St. Louis, MO). La EC103 se sembró en agar Caldo Luria (LB) (MOBIO Laboratories Inc., Carlsbad, CA) para el recuento de unidades formadoras de colonias (UFCs).

Experimentos del Número de Copias de la Diana y del Crecimiento de EC103. Los cultivos durante la noche de EC103 se prepararon añadiendo 5 µl de caldo de glicerol de EC103 a 5 ml de caldo MH con ampicilina y se incubó a 37°C toda la noche con agitación. Al día siguiente, el cultivo de EC103 se diluyó agregando 10 µl del cultivo de la noche a 100 ml de caldo MH precalentado y preagitado en un matraz de 500 ml, seguido por la incubación a 37°C con agitación a 250 rpm. Cada 30 minutos, incluyendo en el minuto 0 y el mismo cultivo de la noche, se tomó una muestra de 1 ml para la medición de OD₆₀₀ y se realizaron diluciones seriadas 10 veces (100 µl en 900 µl) en caldo MH a temperatura ambiente. La densidad celular se determinó mediante siembra de diluciones seriadas por triplicado. En cada punto de tiempo, las muestras del cultivo fueron transferidas a un baño de agua helada o centrifugadas inmediatamente a 4°C durante 3 minutos a 14 000 rpm. Posteriormente los sobrenadantes fueron retirados por aspiración, ultracongelados en un baño de hielo seco-etanol y se almacenaron a -80°C.

En ciertos experimentos de crecimiento, un cultivo fue enriquecido con uno de los siguientes antibióticos ya sea a los 150 o 210 minutos: 25 µg/ml de rifampicina (Sigma, St. Louis, MO), 25 µg/ml de cloranfenicol (Sigma, St. Louis, MO), 4 µg/ml de ciprofloxacina (Sigma, St. Louis, MO) o 16 µg/ml gentamicina (Sigma, St. Louis, MO). Después de la adición de antibióticos en 150 minutos, se recolectaron muestras cada 15 minutos en vez de cada 30 minutos.

Para experimentos comparando la sensibilidad y especificidad de la sonda pre-ribosómica, se tomaron muestras del cultivo de la noche y el cultivo de EC103 en fase log (OD₆₀₀ = 0.1) y se centrifugaron inmediatamente a 4°C durante 5 minutos a 14 000 rpm. Los sobrenadantes fueron retirados por aspiración. Los pellets fueron ultracongelados en un baño de hielo seco-etanol y se almacenaron a -80°C.

Detección Electroquímica. La detección electroquímica de pre-rARN y rARN bacteriano se realizó como se describió anteriormente para sondas de captura de biotiniladas (12) y tioladas (2, 8) inmovilizadas sobre arreglos de electrodo de Au preparado fotolitográficamente, con modificaciones.

Se evaluó la respuesta del sensor con un ensayo de hibridación de tipo sándwich, usando fluoresceína (FITC) como rastreador en la sonda de detección y peroxidasa anti-FITC-rábano (HRP) como la molécula informante. 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB)-H₂O₂ fue el sustrato seleccionado para la medición electroquímica de la actividad del informante HRP capturado. Todos los oligonucleótidos sintéticos utilizados fueron comprados de Eurofins MWG Operon y se enumeran en la tabla 1. Para sondas de captura tioladas, se obtuvieron arreglos de electrodos de Au desnudos de 16 sensores desechables de GeneFluidics (Irwindale, CA). Cada sensor del arreglo consistió en un electrodo central en funcionamiento de 2.5 mm de diámetro, rodeado de un contraelectrodo de Au y un electrodo de Au de pseudoreferencia. El chip sensor fue impulsado por una estación de trabajo electroquímica Helios multicanal controlada por computadora (GeneFluidics, Irwindale, CA). Los pasos de lavado se llevaron a cabo después de cada aplicación de los reactivos mediante la aplicación de una corriente de H₂O desionizada a la superficie del sensor

durante aproximadamente 2-3 segundos seguido de 5 segundos de secado bajo corriente de nitrógeno. Antes de la adición del primer reactivo, se secaron los chips de oro desnudos como se describió anteriormente. Para funcionalizar la superficie del sensor de trabajo, se preparó una mezcla fresca de sonda de captura tiolada al 0.05 μM y 300 μM de 1,6-hexanoditiol (96%, Sigma, St. Louis, MO) en 10 mM de Tris-HCl, EDTA 1 mM y NaCl 0.3 M (pH 8.0) y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 min. Las alícuotas de 6 μl de esta mezcla fueron arrojadas sobre cada electrodo de Au de trabajo en el arreglo de 16 sensores y se incubaron durante la noche a 4°C en una cámara humidificada. A menos que se indique otra cosa, todos los pasos posteriores se realizaron a temperatura ambiente. Al día siguiente, los sensores de Au modificados con monocapa, mezclados, posteriormente fueron tratados con 6 μl de 6-mercapto-1-hexanol 1 mM (97%, Sigma, St. Louis, MO) en Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM y NaCl 0.3 M (pH 8.0) durante 50 minutos para obtener la interfaz de la monocapa ternaria.

Para las sondas de captura biotiniladas, se obtuvieron de GeneFluidics (Irwindale, CA) unos arreglos de electrodos de Au de 16 sensores precubiertos con un SAM binario que consiste en mercaptohexanol y ácido mercaptoundecanoico en una proporción 5:1. Los pasos de lavado se llevaron a cabo después de cada aplicación de reactivos mediante la aplicación de una corriente de H₂O desionizada sobre la superficie del sensor durante aproximadamente 2-3 segundos seguido de 5 segundos de secado bajo corriente de nitrógeno. Para funcionalizar la superficie del sensor, los grupos terminales carboxílicos del SAM binario se convirtieron en ésteres reactivos con aminos aplicando 4 μl de una solución de NHS/EDC (*N*-hidroxisuccinimida 50 mM, *N*-3-dimetilaminopropil-*N*-etilcarbodiimida 200 mM, Sigma, St. Louis, MO) en H₂O desionizada para el electrodo de trabajo durante 10 minutos. Los sensores activados se incubaron durante 10 min con 4 μl de EZ-Link Amina-PEG₂-Biotina (Pierce Rockford, IL) a una concentración de 5 mg/ml en acetato de sodio 50 mM, pH 5. Se aplicaron 30 μl de etanolamina 1 M, pH 8.5 (Sigma, St. Louis, MO) a los tres electrodos durante 10 minutos con el fin de bloquear los grupos reactivos restantes de la monocapa activada. Los sensores biotinilados se incubaron en 4 μl de estreptavidina 0.5 mg/ml (Pierce) en H₂O libre de RNasa (Cat. No. 821739, MP Biomedicals, Aurora, OH) durante 10 minutos. Los sensores recubiertos con estreptavidina se incubaron con sondas de captura biotiniladas (4 μl , 1 μM en tampón de fosfato 1 M, pH 7.2) durante 30 minutos. Los electrodos fueron bloqueados durante 10 min con 4 μl de polietilenglicol 3350 al 0.05% (PEG, Sigma, St. Louis, MO) en tampón fosfato 1M, pH 7.2. Todos estos pasos de incubación se realizaron en una placa Petri de vidrio.

Para ambos tipos de sondas de captura, la lisis de las células bacterianas se realizó mediante la resuspensión del pellet adecuado en 10 μl de NaOH 1M e incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos. Los lisados bacterianos se neutralizaron mediante la adición de 50 μl de sonda de detección modificada con fluoresceína (FITC) 0.25 μM en tampón de fosfato 1M pH 7.2 con albúmina de suero bovino (BSA) al 2.5% (Sigma, St. Louis, MO) y se les permitió reaccionar durante 10 minutos para una hibridación homogénea. Se arrojaron alícuotas (4 μl) de esta solución diana de lisado bacteriano crudo sobre cada sensor modificado por sonda de captura y se incubaron durante 15 min. Después del lavado y secado del arreglo, 4 μl de una solución de fragmentos Fab de peroxidasa de rábano anti-FITC (HRP) 0.5 U/ml (Roche, diluida en caseína al 0.5% en solución salina amortiguada con fosfatos 1M, pH 7.2) se depositaron en cada uno de los electrodos de trabajo durante 15 minutos. Después del lavado y secado, un colector plástico prefabricado de 16-pocillos (GeneFluidics, Irwindale, CA) se unió al arreglo del sensor. El arreglo de sensores fue puesto en el lector de chip y 50 μl de la solución de TMB-H₂O₂ (substrato de TMB K-Blue mejorado, Neogen, Lexington, KY) fue colocada en cada uno de los sensores en el arreglo, cubriendo el área de los tres electrodos. Se tomaron mediciones cronoamperométricas inmediata y simultáneamente para los 16 sensores escalonando el potencial a -200 mV (frente al electrodo de Au de cuasi referencia) y el muestreo de la corriente a los 60 s. Para cada arreglo, los sensores de control negativo (NC) fueron probados, incluyendo la sonda de captura, la sonda de detección de FITC, y el tampón (BSA al 2.5% en tampón de fosfatos 1M, pH 7.2) en lugar de la solución de lisado bacteriano. Los controles positivos (PC) fueron incluidos en todos los arreglos de sensores y consistieron en un oligonucleótido sintético diana ya fuera para los pares de sondas de rARN maduro o para los del pre-rARN Pre23S 3'Jxn a 1 nM con la sonda de detección correspondiente (ver tabla 1).

Incluir la molécula diana sintética sirvió para normalizar la intensidad de la señal electroquímica y determinar la concentración de la molécula diana ribosómica y pre-ribosómica porque existe una correlación log/log lineal entre la concentración del analito y la señal electroquímica. La relación entre la señal electroquímica generada y el número de moléculas diana sintéticas probadas fue usada para convertir la señal electroquímica de muestras en cada punto de tiempo en un número de moléculas diana por volumen sometido a prueba (concentración). Entonces esto fue combinado con los valores de UFC/ml determinados por placas para cada punto de tiempo para generar el número de molécula diana por mediciones de UFC.

Microscopía crio-electrónica (crio-EM) de *E. coli* congelado-hidratado. Los cultivos de *E. coli* (5 μl) fueron depositados en una rejilla de carbón con poros con una reciente descarga de resplandor, luego secados, y rápidamente congelados en etano líquido. Se tomaron imágenes de los especímenes congelados hidratados a -170°C utilizando un microscopio electrónico G2 Polara (FEI Company, Hillsboro, OR) equipado con una pistola de emisión de campo y un dispositivo acoplado a carga 4K x 4K (CCD; TVIPS, GMBH, Alemania). El microscopio fue operado a 300 kV y las imágenes cryo-EM se registraron en el aumento de 4700 x (3.76 nm/pixel) y 31 000 x (0.57nm/pixel), respectivamente. Se seleccionaron aleatoriamente 9-14 células para tomar medidas de longitud y anchura en diferentes momentos después de la inoculación.

Resultados

Desarrollo de Sondas de Captura y Detección para el Pre-rARN. Los pares de sondas fueron desarrollados para colas del pre-rARN que se retiraron durante el procesamiento del rARN (Figura 1). Inicialmente, los pares de sondas de varias longitudes fueron diseñados para una región en la cola 5' del pre-rARN 16S prevista para estar accesible para la unión a la sonda porque estaba relativamente libre de la estructura secundaria. Como se muestra en la figura 2, algunos de estos pares de sondas mostraron buena sensibilidad (alto cociente señal-a-ruido) para las muestras de *E. coli* obtenidas durante la fase de crecimiento log. Sin embargo, estas sondas de pre-rARN 16S generaron inesperadamente bajas proporciones de señales de fase log con respecto a la fase estacionaria cuando se probaron diferentes fases de crecimiento de *E. coli* (Figura 2). Estos resultados indicaron que esas sondas no eran marcadores confiables para las moléculas intactas pre-rARN.

Posteriormente, los pares de sondas fueron diseñados para hibridar con los sitios de empalme entre las colas del pre-rARN y el rARN maduro para que las secuencias diana sólo estuvieran presentes en el pre-rARN intacto (Figura 1). Estas secuencias diana son digeridas a dos piezas durante el procesamiento del pre-rARN a rARN maduro, de modo que después de la digestión, ninguna pieza de la secuencia diana se uniría a la sonda lo suficiente bien para generar una señal. Los pares de sondas se probaron para unir los sitios de empalme 5' y 3' de rARN 16S y el sitio de empalme 3' de rARN 23S. Se analizaron los pares de sondas en ambas orientaciones captura-detector y detector de captura. Como se muestra en la figura 2, los pares de sondas del pre-rARN dirigidos a los sitios de empalme dieron lugar a cocientes más altos de las señales de fase log a estacionaria. Estos resultados son consistentes con los de Cangelosi et al (3) quien utilizó un análisis de hibridación sándwich de pre-rARN en el cual su sonda de captura se unió a la cola del pre-rARN y su sonda de detección a la región rARN madura proporcionando especificidad para pre-rARN intacto. Uno de los dos pares de sonda para el sitio de empalme 3' de rARN 23S produjo una señal alta con un cociente de señales relativamente alto para la fase log, en comparación con células de la fase estacionaria. Este par de sondas de captura (Pre23S 14m 3' JxnC) y de detección (Pre23S 17m 3' JxnD) fue seleccionado para mediciones sucesivas del pre-rARN.

Para la determinación de rARN maduro se usaron sondas de captura y de detección FITC especificadas en la Tabla 1.

Comparación de Fase de Crecimiento de rARN Maduro frente a Pre-rARN. Comparamos las señales para rARN maduro frente a pre-rARN para un cultivo por una noche de *E. coli* antes y después de la inoculación en medio MH fresco. Las concentraciones de rARN y pre-rARN diana fueron estimadas mediante la inclusión de concentraciones conocidas de oligonucleótidos diana sintéticos artificiales como controles de calibración interna en cada chip de sensor electroquímico. Estos oligonucleótidos diana sintéticos funcionaron hibridándose con sondas de captura y de detección. Las copias por célula se calcularon a partir de las concentraciones del número de rARN diana y el número de células en el lisado bacteriano. Hemos encontrado que la variabilidad en las mediciones de pre-rARN y rARN podrían reducirse refrigerando las muestras en un baño de hielo y por centrifugación en una centrifuga refrigerada a 4°C. Por otra parte, las células fueron sensibles al choque frío particularmente durante las fases de crecimiento lag y log temprana. Por esta razón, la cuenta exacta de la placa fue obtenida por dilución del cultivo en un medio a temperatura ambiente en lugar de un medio frío.

Inmediatamente después de la inoculación de un cultivo durante la noche en un medio de cultivo fresco (tabla 2, tiempo 0), hubo un incremento de 55 veces en pre-rARN desde 2 copias por célula hasta 110 copias por célula, indicando una dramática inducción de la síntesis de rARN. En ese momento, la relación de rARN maduro a pre-rARN alcanzó un nadir de 54:1. Como se muestra en la figura 3, los niveles de pre-rARN continuaron aumentando durante las dos primeras horas de incubación, alcanzando un máximo a los 120 min después de la incubación de 1200 copias por célula. Como el pre-rARN se convirtió en rARN maduro, las copias de rARN maduro alcanzaron > 98 000 copias por célula a los 150 min después de la inoculación. A pesar de una gradual caída en rARN maduro y pre-rARN después de eso, la tasa de crecimiento alcanzó un punto máximo a los 210 minutos a un aumento de 1.1 unidades log en la concentración celular por hora, lo que equivale a un tiempo de duplicación de 16.5 min. Durante las fases posteriores de crecimiento, los números de copias del pre-rARN disminuyeron más rápidamente que los números de copias de rARN maduro, llevando eventualmente a un aumento en la proporción de rARN maduro a pre-rARN a >1000:1.

Como se muestra en la Figura 4A, hubo una buena correlación entre el volumen celular y las copias de rARN por célula durante las fases de crecimiento log y log tardía, lo que indica una densidad relativamente constante de rARN en el citoplasma. Esta correlación se perdió en las densidades celulares por arriba de $OD_{600nm} = 1.0$, momento en el que el volumen celular se estabilizó mientras que el número de copias de rARN siguió disminuyendo. La microscopia crio-electrónica fue realizada para medir volúmenes de células de *E. coli* en diferentes fases de crecimiento. Como se muestra en la Figura 4B, las células de *E. coli* se hicieron progresivamente más cortas y más delgadas conforme las células pasaron de fase log a fase estacionaria. El tamaño celular promedio máximo fue de $2.8 \mu m^3$ ($4.87 \mu m$ de largo x $0.85 \mu m$ de ancho) y el tamaño celular promedio mínimo fue de $0.45 \mu m^3$ ($1.35 \mu m$ de largo x $0.65 \mu m$ de ancho).

Efectos de los Antibióticos sobre los Niveles de rARN maduro y pre-rARN. Para confirmar que las sondas de pre-rARN de captura y de detección fueron selectivas para la diana deseada, se examinaron los efectos de la

rifampicina y el cloranfenicol sobre los niveles de pre-rARN con respecto al rARN maduro. De manera consistente con un informe anterior (3), la adición de la rifampicina provocó una disminución selectiva en el pre-rARN, mientras que el cloranfenicol provocó un aumento selectivo en el pre-rARN (figuras 5A y 5B). También se examinaron los efectos de la ciprofloxacina y gentamicina sobre los niveles de pre-rARN y rARN maduro. Como se muestra en la figura 5C, la ciprofloxacina tuvo un efecto similar al de rifampicina; los niveles de pre-rARN disminuyeron significativamente en 15 minutos mientras que el rARN maduro permaneció en los niveles de control hasta 45 minutos después de la adición del antibiótico. En cambio, no hubo ningún efecto de este antibiótico sobre los niveles de pre-rARN de organismos resistentes a ciprofloxacina (Figura 6). La adición de gentamicina resultó en una disminución de rARN maduro sin afectar el nivel del pre-rARN (Figura 5D).

10 **Tabla 1 Oligonucleótidos de ADN utilizados en este estudio**

Nombre de la Sonda ¹	Secuencia ²	SEQ ID NO:
Pre16S 15m 48D	5'-TTTTTCGTCTTGCGA-F	13
Pre16S 15m 63C	5'-B-GAGACTTGGTATTCA	14
Pre16S 15m R63D	5'-F-GAGACTTGGTATTCA	15
Pre16S 15m R48C	5'-TTTTTCGTCTTGCGA-B	16
Pre16S 17m R63D	5'-F-TTGAGACTTGGTATTCA	17
Pre16S 17m R46C	5'-TTTTTCGTCTTGCGACG-B	18
Pre16S 19m R63D	5'-F-TCTTGAGACTTGGTATTCA	19
Pre16S 19m R44C	5'-TTTTTCGTCTTGCGACGTT-B	20
Pre16S 21m R63D	5'-F-ACTCTTGAGACTTGGTATTCA	21
Pre16S 21m R42C	5'-TTTTTCGTCTTGCGACGTTAA-B	22
Pre16S 17m R60D	5'-F-AGACTTGGTATTCATTT	23
Pre16S 17m R43C	5'-TTCGTCTTGCGACGTTA-B	24
Pre16S 19m R60D	5'-F-TGAGACTTGGTATTCATTT	25
Pre16S 19m R41C	5'-TTCGTCTTGCGACGTTAAG-B	26
Pre16S 21m R60D	5'-F-CTTGAGACTTGGTATTCATTT	27
Pre16S 21m R39C	5'-TTCGTCTTGCGACGTTAAGAA-B	28
Pre16S 17m R66D	5'-F-CTCTTGAGACTTGGTAT	29
Pre16S 17m R49C	5'-TCATTTTTCGTCTTGCG-B	30
Pre16S 19m R66D	5'-F-CACTCTTGAGACTTGGTAT	31
Pre16S 19m R47C	5'-TCATTTTTCGTCTTGCGAC-B	32
Pre16S 21m R66D	5'-F-TTCACTCTTGAGACTTGGTAT	33
Pre16S 21m R45C	5'-TCATTTTTCGTCTTGCGACGT-B	34
Pre16S 19m 5'JxnD	5'-TTTGATGCTCAAAGAATTA-F	35
Pre16S 21m 5'JxnC	5-S-TCAAACCTTCAATTTAAAAG	36
Pre16S 21m R5'JxnD	5-F-TCAAACCTTCAATTTAAAAG	37
Pre16S 19m R5'JxnC	5'-TTTGATGCTCAAAGAATTA-S	38
Pre16S 17m 3'JxnD	5'-GAGGTGATCCAACCGCA-F	39
Pre16S 20m 3'JxnC	5-S-GAACGCTTCTTTAAGGTAAG	40
Pre16S 20m R3'JxnD	5-F-GAACGCTTCTTTAAGGTAAG	41
Pre16S 17m R3'JxnC	5'-GAGGTGATCCAACCGCA-S	42
*Pre23S 17m 3'JxnD	5'-AAGCCTCACGGTTCATT-F	5

*Pre23S 14m 3'JxnC	5'-S-GGCGTTGTAAGGTT	6
Pre23S 14m R3'JxnD	5'-F-GGCGTTGTAAGGTT	43
Pre23S 17m R3'JxnC	5'-AAGCCTCACGGTTCATT-S	44
rARN maduro 18m 1484D	5'-GTTACGACTTCACCCCAG-F	45
rARN maduro 19m 1502C	5'-S-GTTCCCCTACGGTTACCTT	46
Oligonucleótidos Sintéticos Diana:		
Pre-rRNA 31m 5'-AATGAACCGTGAGGCTTAACCTTACAACGCC		47
rARN maduro 37m 5'- CTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACCGTAGGGGAAC		48

¹Abreviaturas: Número de nucleótidos (m), sonda de captura (C), sonda de detección (D), sitio de empalme (Jxn), orientación inversa (R).

²Abreviaturas: FITC (F), biotina (B), tiol (S).

5 *Indica par de sondas de captura y detección seleccionadas con base en su alto cociente señal-a-sonido.

Tabla 2. Cuantificación de pre-rARN y ARN maduro durante las fases de crecimiento de *E. coli*

Punto de Tiempo (min)	OD ₆₀₀	CFU/ml	Tasa ^a	Duplicaciones ^b	Tiempo Gen. ^c	rARN ^d	pre-rARN	Proporción	FASE DE CRECIMIENTO
Cultivo Durante la Noche	2.307	6.67E+09	-	-	-	6,009	2	2,720	FASE DE ESTACIONARIA
0	0	5.90E+05	-	-	-	5,942	110	54	FASE DE RETRASO
30	0	5.70E+05	-	-	-	28,427	457	62	
60	0.003	8.63E+05	0.18	1.20	50.08	55,278	696	79	FASE LOG
90	0.008	2.30E+06	0.43	2.83	21.19	78,741	970	81	
120	0.024	6.20E+06	0.43	2.86	21.00	91,049	1200	76	
150	0.068	1.91E+07	0.49	3.24	18.51	98,782	523	189	
180	0.175	6.53E+07	0.53	3.55	16.88	61,571	235	262	
210	0.409	2.30E+08	0.55	3.64	16.50	38,033	208	183	
240	0.707	5.27E+08	0.36	2.39	25.14	29,801	114	260	FASE DE ESTACIONARIA TEMPRANA
270	1.095	1.17E+09	0.35	2.30	26.14	19,610	42	466	
300	1.466	2.33E+09	0.30	2.00	30.00	13,162	25	536	FASE DE ESTACIONARIA
330	1.686	3.23E+09	0.14	0.94	63.74	7,608	11	665	
360	1.834	4.43E+09	0.14	0.91	65.87	5,734	8	723	
390	1.957	5.03E+09	0.06	0.37	163.81	4,899	7	706	
420	2.051	5.73E+09	0.06	0.38	159.68	6,230	6	1,049	

^aTasa de crecimiento en unidades log durante 30 min.

25

^bDuplicaciones por hora.

^cTiempo de Generación (min).

^dCopias por célula.

Discusión

5 Se describe un ensayo de sensor electroquímico para la detección y cuantificación del pre-rARN. El pre-rARN representa una reserva lábil de moléculas precursoras de rARN producidas durante la transcripción del rARN. El pre-rARN difiere del rARN maduro por la presencia de colas 5' y 3' que se eliminan durante el proceso de maduración. Debido a que el pre-rARN representa una fracción relativamente pequeña (0.1%-10%) del rARN total, se requiere de un ensayo sensible para su detección. Para lograr la sensibilidad necesaria, nuestro análisis con sensor de Au electroquímico se basa en el uso de una interfaz ternaria que involucra hexaneditiol co-inmovilizada con una sonda de captura tiolada, seguida por la incorporación de 6-mercaptop-1-hexanol como diluyente. Se ha demostrado que esta nueva interfaz ofrece una superficie de bloqueo muy mejorada y eficiencia máxima de hibridación que permite detección electroquímica ultrasensible de los ácidos nucleicos diana (2, 8, 17). Los métodos de detección directa de ácido nucleico, tales como el ensayo de hibridación electroquímica de sándwich descrito en este documento, tienen ventajas inherentes sobre los métodos que requieren la amplificación de la diana, tal como qRT-PCR. Fuimos capaces de cuantificar el pre-rARN durante las diferentes fases de crecimiento de *E. coli*, y documentamos cambios dramáticos en el número de copias de 2 a 1200 copias por célula en las fases de crecimiento estacionaria y log, respectivamente. Esta es la primera vez que se han cuantificado electroquímicamente los números de copias del pre-rARN por célula. El aumento de 600 veces en el número de copias del pre-rARN que observamos es considerablemente mayor que el aumento de 50 veces reportado por Cangelosi et al (3) usando la detección por luminiscencia. Las posibles razones para esta diferencia incluyen un bajo límite de detección y el tipo de cepa de *E. coli*. Cangelosi et al examinaron la cepa de tipo *E. coli* ATCC 11775, que fue aislada en 1895 por Migula, y puede haber sufrido cambios metabólicos durante el paso del tiempo. Por el contrario, nuestros estudios fueron realizados en una cepa de *E. coli* uropatógena de tipo salvaje aislada recientemente con un pico relativamente rápido que duplica el tiempo de 16.5 minutos.

Los antibióticos difieren en sus efectos sobre el pre-rARN y el rARN maduro. La rifampicina es un inhibidor de la ARN polimerasa dependiente del ADN procariota. Debido a que el pre-rARN es procesado rápidamente para madurar al rARN, la inhibición de la transcripción rápidamente reduce la reserva del pre-rARN, especialmente durante la fase de crecimiento log. Por el contrario, el cloranfenicol y la gentamicina son inhibidores de la síntesis de proteínas. El cloranfenicol actúa uniéndose a la subunidad 23S de los ribosomas bacterianos para inhibir la síntesis de proteínas, mientras que la gentamicina actúa inhibiendo la función de corrección de los ribosomas, introduciendo de ese modo errores de traducción y eventos de terminación de cadena peptídica prematuros. En cualquier caso, estos inhibidores de la síntesis de proteína no deberían interferir directamente con la síntesis del pre-rARN. En consecuencia, se observó una disminución en la reserva del rARN maduro, probablemente debido a la pérdida de proteínas requeridas para la estabilidad y formación de ribosomas. En el caso del cloranfenicol, la inhibición del procesamiento del pre-rARN no sólo resultó en una disminución del rARN maduro, sino en un aumento de pre-rARN (Fig. 5B).

La ciprofloxacina es un antibiótico de quinolona que inhibe la actividad del ADN girasa, la topoisomerasa bacteriana que introduce y relaja los superenrollamientos del ADN. El relajante de superenrollamientos se requiere para el desempaquetamiento del ADN antes de la replicación no sólo del ADN, sino también transcripción del ARN (16). Como en el caso de la rifampicina, la inhibición de la transcripción del ARN por ciprofloxacina resultó en una disminución rápida de pre-rARN, detectable en los quince minutos posteriores a la adición del antibiótico. La resistencia de las quinolonas normalmente resulta de mutaciones de la girasa que impiden la unión de la quinolona a la girasa. Como se esperaba, la adición de la ciprofloxacina no tuvo un efecto discernible de los niveles de pre-rARN en microorganismos resistentes a la ciprofloxacina (Fig. 6).

Hay un interés considerable en los métodos para determinar la susceptibilidad de las bacterias en los especímenes clínicos en un plazo suficiente para impactar en la toma de decisiones clínicas. Un gran inconveniente de los métodos actuales de bacteriología clínica es la necesidad de aislar bacterias en medios de agar sólidos cuando se procesa un espécimen clínico. En la ausencia de pruebas de sensibilidad antibiótica ágiles, los médicos comúnmente suelen iniciar tratamiento "empírico" con antibióticos, lo que significa que los antibióticos se eligen con base en conocimientos previos de los organismos potenciales y sus patrones de resistencia a los antibióticos. Los antibióticos empíricos para la bacteremia son generalmente de amplio espectro para tratar una amplia variedad de posibles patógenos bacterianos. Este enfoque es especialmente problemático en el manejo de infecciones del tracto urinario complejas donde las tasas de resistencia a quinolonas son típicamente del 20-30% (5). Además, el uso excesivo de antibióticos de amplio espectro contribuye a la aparición de resistencia a los antibióticos aplicando presión selectiva a la flora del paciente y favoreciendo la colonización por microorganismos resistentes.

Para abordar la necesidad de datos de resistencia a los antibióticos en el momento de la selección inicial del antibiótico, se necesitan métodos para analizar la susceptibilidad de organismos a antibióticos en especímenes

clínicos. El ensayo de sensor electroquímico ha sido validado en especímenes clínicos de orina humana de pacientes con infección del tracto urinario (9, 11). Se espera que los ensayos de sensor electroquímico para pre-rARN sean útiles para identificar bacterias que son susceptibles a antibióticos como la rifampicina y la ciprofloxacina que inhiben directa o indirectamente la transcripción del ARN. Es posible ampliar este enfoque de pruebas de susceptibilidad a antibióticos hacia otros fármacos primero agotando los niveles del pre-rARN y luego midiendo la capacidad del antibiótico para inhibir la reposición del pre-rARN (4). Sin embargo, debido a que los antibióticos actúan por mecanismos muy divergentes, diversos enfoques pueden ser necesarios para lograr pruebas completas de susceptibilidad a antibióticos. Por ejemplo, hemos aplicado con éxito la bioluminiscencia de ATP para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de uropatógenos en los 120 min posteriores a la inoculación de especímenes clínicos de orina en un medio de crecimiento con y sin antibióticos (7). La aplicación de estos ensayos a las bacterias en los especímenes clínicos en el punto de atención permitiría una terapia con antibiótico específico para el paciente.

Ejemplo 2: Uso del pre-rARN para Evaluar la Fase de Crecimiento de Bacterias

La correlación entre copias de pre-rARN por célula y la tasa de crecimiento bacteriano se representa en la figura 7. La tasa de crecimiento se basa en el volumen celular total medido por turbidez o el aumento en la densidad óptica a 600 nm, que tiene un pico a los 120 minutos, el mismo tiempo que el pico en número de copias de prARN por célula. La figura 8 ilustra la evaluación de pares de sonda del pre-rARN en bacterias Gram-negativas. La relación de las señales de pares de sondas específicos para el pre-rARN contra el rARN maduro se compararon en cultivos de fase estacionaria o durante la noche (O/N) y en cultivos en la fase log de crecimiento. Las señales pre-rARN fueron cuatro veces mayores en las células de *Klebsiella* en fase log que en las células *Klebsiella* en fase estacionaria, y seis veces mayores en células de *Pseudomonas* en fase log que en células de *Pseudomonas* en fase estacionaria. La figura 9 muestra la respuesta del pre-rARN a la cefazolina. La adición de cefazolina, un antibiótico betalactámico, a un cultivo de una cepa susceptible de *E. coli* en la fase de crecimiento log dio lugar a una caída de un log en la cantidad de pre-rARN en 30 minutos comparado con un cultivo sin el antibiótico. Las barras de error estimaron la desviación estándar.

Referencias

1. **Bremner, H., y P. P. Dennis.** 1996. Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate, p. 1553-1569. In F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli and Salmonella*, vol. 2. ASM Press, Washington, D. C.
2. **Campuzano, S., et al.** 2011. *Biosens Bioelectron* 26:3577-3584.
3. **Cangelosi, G. A., y W. H. Barbant.** 1997. *J Bacteriol* 179:4457-4463.
4. **Cangelosi, G. A., et al.** 1996. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 1790-1795.
5. **Cullen, et al.** 2011. *Br J Urol Int* [Epub ahead of print].
6. **Fuchs, B. M., et al.** 1998. *Appl Environ Microbiol* 64:4973-4982.
7. **Ivancic, V., et al.** 2008. *J Clin Microbiol* 46: 1213-1219.
8. **Kuralay, F., et al.** 2011. *Talanta* 85:1330-1337.
9. **Liao, J. C, et al.** 2006. *J Clin Microbiol* 44:561-570.
10. **Liao, J. C, et al.** 2007. *J Mol Diagn* 9:158-168.
11. **Mach, K. E., et al.** 2009. *J Urol* 182:2735-2741.
12. **Mastali, M., et al.** 2008. *J Clin Microbiol* 46:2707-2716.
13. **Sun, C. P., et al.** 2005. *Mol Genet Metab* 84:90-99.
14. **Wang, J.** 2006. *Analytical Electrochemistry*. J. Wiley, New York.
15. **Wang, J.** 2008. *Electrochemical glucose biosensors*. *Chem Rev* 108:814-825.
16. **Willmott, C. J., et al.** 1994. *J Mol Biol* 242:351-363.
17. **Wu, J., et al.** 2010. *Anal Chem* 82:8830-8837.
18. **Wu, J., et al.** 2009. *Anal Chem* 81 : 10007-10012.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Los regentes de la Universidad de California
Haake, David A
Halford, Colin
Babbitt, Jane T
Churchill, Bernard M

<120> Evaluación de la susceptibilidad a los antibióticos utilizando sondas para
ARN prerribosómico

<130> **UCLA.199**

<160> 50

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 51
<212> ADN
<213> **Escherichia coli**

<400> 1
aatgaaccgt gaggcttaac cttacaacgc cgaagctggt ttggcggatt g 51

<210> 2
<211> 50
<212> ADN
<213> **Pseudomonas aeruginosa**

<400> 2
aattgcccggt gaggcttgac catataacac ccaaacaatc tgacgattgt 50

<210> 3
<211> 53
<212> ADN
<213> **Streptococcus pyogenes**

<400> 3
aatagctcga ggacttatcc aaaaagaaat attgacaacg ttacggattc ttg 53

<210> 4
<211> 51
<212> ADN
<213> **Staphylococcus aureus**

<400> 4
aatcgatcga agacttaatc aaataaatg ttttgcaag caaatcact t 51

<210> 5
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sonda sintética

<400> 5
aagcctcacg gttcatt 17

ES 2 663 955 T3

<210> 6
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sonda sintética

<400> 6
ggcgttgtaa gggt

14

<210> 7
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sonda sintética

<400> 7
aagcctcacg ggcaatt

17

<210> 8
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sonda sintética

<400> 8
ggtgttatat ggtc

14

<210> 9
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sonda sintética

<400> 9
aagtcctcga gctatt

16

<210> 10
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sonda sintética

<400> 10
atttcctttt ggat

14

<210> 11

<211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda sintética

 <400> 11
 aagtcttcga tgcatt 16

<210> 12
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda sintética

 <400> 12
 catttatttt gatt 14

<210> 13
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda sintética

 <400> 13
 tttttcgtct tgcga 15

<210> 14
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda sintética

 <400> 14
 gagacttggg attca 15

<210> 15
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda sintética

 <400> 15
 gagacttggg attca 15

<210> 16
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>		
<223>	Sonda sintética	
<400>	16	
	tttttcgtct tgcga	15
<210>	17	
<211>	17	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	Sonda sintética	
<400>	17	
	ttgagacttg gtattca	17
<210>	18	
<211>	17	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	Sonda sintética	
<400>	18	
	tttttcgtct tgcgacg	17
<210>	19	
<211>	19	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	Sonda sintética	
<400>	19	
	tcttgagact tggattca	19
<210>	20	
<211>	19	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	Sonda sintética	
<400>	20	
	tttttcgtct tgcgacggt	19
<210>	21	
<211>	21	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	Sonda sintética	

<400> 21 actcttgaga cttggtattc a	21
<210> 22 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
<220> <223> Sonda sinética	
<400> 22 tttttcgtct tgcgacgtta a	21
<210> 23 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
<220> <223> Sonda sinética	
<400> 23 agacttggtta ttcattt	17
<210> 24 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
<220> <223> Sonda sinética	
<400> 24 ttcgtcttgc gacgtta	17
<210> 25 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
<220> <223> Sonda sinética	
<400> 25 tgagacttgg tattcattt	19
<210> 26 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
<220> <223> Sonda sinética	
<400> 26 ttcgtcttgc gacgttaag	19

<210>	27	
<211>	21	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	Sonda sintética	
<400>	27	
	cttgagactt ggtattcatt t	21
<210>	28	
<211>	21	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	Sonda sintética	
<400>	28	
	ttcgtcttgc gacgttaaga a	21
<210>	29	
<211>	17	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	Sonda sintética	
<400>	29	
	ctcttgagac ttggtat	17
<210>	30	
<211>	18	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	Sonda sintética	
<400>	30	
	tcatttttcg tcttgcb	18
<210>	31	
<211>	19	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	Sonda sintética	
<400>	31	
	cactcttgag acttggtat	19
<210>	32	

ES 2 663 955 T3

<211> 19
 <212> ADN
 <213> Sonda sintética

<220>
 <223> Secuencia artificial

<400> 32
 tcatttttcg tcttgcgac 19

<210> 33
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Sonda sintética

<220>
 <223> Secuencia artificial

<400> 33
 ttcactcttg agacttgga t 21

<210> 34
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Sonda sintética

<220>
 <223> Secuencia artificial

<400> 34
 tcatttttcg tcttgcgacg t 21

<210> 35
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial

<400> 35
 tttgatgctc aaagaatta 19

<210> 36
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Sonda sintética

<220>
 <223> Secuencia artificial

<400> 36
 tcaaactctt caatttaaaa g 21

<210> 37
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Sonda sintética

<220>
 <223> Sonda sintética

 <400> 37
 tcaaactctt caatttaaaa g 21

<210> 38
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda sintética

 <400> 38
 ttgatgctc aaagaatta 19

<210> 39
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda sintética

 <400> 39
 gagtgatcc aaccgca 17

<210> 40
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda sintética

 <400> 40
 gaacgcttct ttaaggtaag 20

<210> 41
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda sintética

 <400> 41
 gaacgcttct ttaaggtaag 20

<210> 42
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 663 955 T3

<p><400> 42 gaggtgatcc aaccgca</p>	17
<p><210> 43 <211> 14 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
<p><220> <223> Sonda sintética</p>	
<p><400> 43 ggcgttgtaa gggt</p>	14
<p><210> 44 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
<p><220> <223> Sonda sintética</p>	
<p><400> 44 aagcctcacg gttcatt</p>	17
<p><210> 45 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
<p><220> <223> Sonda sintética</p>	
<p><400> 45 gttacgactt caccocag</p>	18
<p><210> 46 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
<p><220> <223> Sonda sintética</p>	
<p><400> 46 gttcccctac gggtacctt</p>	19
<p><210> 47 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
<p><220> <223> Sonda sintética</p>	
<p><400> 47 aatgaaccgt gaggettaac cttacaacgc c</p>	31

ES 2 663 955 T3

<210>	48	
<211>	37	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	Sonda sintética	
<400>	48	
	ctggggtgaa gtcgtaacaa ggtaaccgta ggggaac	37
<210>	49	
<211>	155	
<212>	ADN	
<213>	Escherichia coli	
<400>	49	
	aguuugagaa guuaauuuuc aaacugcgag uuucuuauu ugaagcaua cuuaaugcac	60
	aagugagaac ucugaaccau aaguaaaag cagaacgcug caauucuag gcuaagaagc	120
	ucacgcguga uguuucaugc gaagaaauuc cauuc	155
<210>	50	
<211>	64	
<212>	ADN	
<213>	Escherichia coli	
<400>	50	
	cgaaucagcg aauuggagug ggcuucuaca aauuugucga agccgcauuc caauucggag	60
	ugcc	64

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar si una muestra de bacterias es susceptible a un agente antibiótico, comprendiendo el método los pasos de:
- 5 (a) (a) poner en contacto un espécimen obtenido a partir de la muestra con una sonda o un par de sondas de oligonucleótidos en ausencia del agente, en donde la sonda o el par de sondas hibrida específicamente a una secuencia diana sobre la longitud completa de la secuencia diana, en donde la secuencia diana comprende 25-35 nucleótidos contiguos de ARN ribosómico (rARN) bacteriano que abarca un sitio de empalme entre una cola de ARN prerribosómico (prARN) y ARN ribosómico maduro (mrARN)
- 10 (b) (b) poner en contacto un espécimen obtenido a partir de la muestra con la sonda o par de sondas en presencia del agente antibiótico;
- (c) (c) detectar las cantidades relativas de hibridación de la sonda a la secuencia diana en los especímenes de (a) y (b);
- 15 (d) (d) identificar la muestra como susceptible al tratamiento con antibiótico si la cantidad de hibridación de la sonda a la secuencia diana en el paso (b) se reduce al menos un 80% con relación a la cantidad de hibridación de la sonda a la secuencia diana en el paso (a).
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además la inoculación del espécimen en un medio de crecimiento antes de la puesta en contacto de los pasos (a) y (b).
3. El método de la reivindicación 1, en donde el rARN bacteriano es rARN 23S.
4. El método de la reivindicación 3, en donde la secuencia diana se selecciona de:
- 20 (a) La secuencia diana de *E. coli* (todas las enterobacterias):
 AATGAACCGTGAGGCTT|AACCTTACAACGCCGAAGCTGTTTTGGCGGAT TG (SEQ ID NO: 1);
 AATGAACCGTGAGGCTT|AACCTTACAACGCCGAAGCTGTTTTGGCGGAT TG (SEQ ID NO: 1);
- (b) La secuencia diana de *Pseudomonas aeruginosa*:
 AATTGCCCGTGAGGCTT|GACCATATAACACCCAAACAATCTGACGATTG T (SEQ ID NO: 2);
 25 AATTGCCCGTGAGGCTT|GACCATATAACACCCAAACAATCTGACGATG T (SEQ ID NO: 2);
- (c) La secuencia diana de *Streptococcus pyogenes*:
 AATAGCTCGAGGACTT|ATCCAAAAAGAAATATTGACAACGTTACGGATTC TTG (SEQ ID NO: 3);
 AATAGCTCGAGGACTT|ATCCAAAAAGAAATATTGACAACGTTACGGATTC TTG (SEQ ID NO: 3);
- (d) (d) La secuencia diana de *Staphylococcus aureus* *Staphylococcus aureus*:
 30 AATCGATCGAAGACTT|AATCAAATAAATGTTTTGCGAAGCAAATCACT T (SEQ ID NO: 4);
 AATCGATCGAAGACTT|AATCAAATAAATGTTTTGCGAAGCAAATCACT T (SEQ ID NO: 4);
- en donde | indica el sitio de empalme entre prARN y ARNm o en donde el par de sondas se selecciona de:
- (e) Sondas de *E. coli* (todas las enterobacterias): 5'-AAGCCTCACGGTTCATT (SEQ ID NO: 5) y GGCGTTGTAAGGTT (SEQ ID NO: 6);
- 35 (f) Sondas de *Pseudomonas aeruginosa*: 5'-AAGCCTCACGGGCAATT (SEQ ID NO: 7) y GGTGTTATATGGTC (SEQ ID NO: 8);
- (g) Sondas de *Streptococcus pyogenes*: AAGTCTCGAGCTATT (SEQ ID NO: 9) y ATTTCTTTTTGGAT (SEQ ID NO: 10); y
- (h) Sondas de *Staphylococcus aureus*: AAGTCTTCGATCGATT (SEQ ID NO: 11) y CATTATTTGATT (SEQ ID NO: 40 12).
5. El método de la reivindicación 1, en donde ningún tratamiento previo del espécimen para agotar el prARN se realiza antes de la puesta en contacto de los pasos (a) o (b).

6. El método de la reivindicación 1, en donde la detección comprende un ensayo óptico, electroquímico o inmunológico, en donde, opcionalmente, la detección comprende un ensayo electroquímico.
7. El método de la reivindicación 1, que comprende además lisar las bacterias bajo condiciones que liberan rARN de las bacterias antes de la puesta en contacto de los pasos (a) y (b).
- 5 8. El método de la reivindicación 1, en donde la sonda o sondas de oligonucleótidos tiene cada una entre aproximadamente 10 a 50 nucleótidos de longitud.
9. El método de la reivindicación 1, en donde la sonda de oligonucleótidos está etiquetada con un marcador detectable, en donde, opcionalmente, el marcador se selecciona del grupo que comprende un marcador fluorescente, un marcador radiactivo, un marcador luminiscente, una enzima, biotina, tiol o un colorante.
- 10 10. El método de la reivindicación 1, en donde el agente antibiótico es rifampicina, cloranfenicol, aminoglicósidos, quinolonas, o antibióticos betalactámicos.
11. Un método para determinar la eficacia antibiótica de un agente antibiótico candidato, el método comprende los pasos de:
- (a) poner en contacto un espécimen obtenido a partir de la muestra con una sonda o par de sondas de oligonucleótidos en ausencia del agente, en donde la sonda o el par de sondas hibrida específicamente a una secuencia diana sobre la longitud total de la secuencia diana, donde la secuencia diana comprende 25-35 nucleótidos contiguos de ARN ribosómico (rARN) bacteriano que abarca un sitio de empalme entre la cola de ARN prerribosómico (prARN) y ARN ribosómico maduro (rARN);
- 15 (b) poner en contacto un espécimen obtenido a partir de la muestra con la sonda o par de sondas en presencia del agente;
- 20 (c) detectar las cantidades relativas de hibridación de la sonda a la secuencia diana en los especímenes de (a) y (b);
- (d) identificar el agente como eficaz si la cantidad de hibridación de la sonda a la secuencia diana en el paso (b) se reduce en al menos un 80% en relación a la cantidad de hibridación de la sonda a la secuencia diana en el paso (a).
- 25 12. Un dispositivo para detectar pre-rARN en una muestra bacteriana, comprendiendo el dispositivo una sonda de oligonucleótidos inmovilizada sobre un soporte sólido, en donde la sonda de oligonucleótidos tiene entre aproximadamente 10 y 50 nucleótidos de longitud y es capaz de hibridar selectivamente una secuencia diana sobre toda la longitud de la secuencia diana, en donde la secuencia diana comprende 25-35 nucleótidos contiguos de ARN ribosómico (rARN) bacteriano que abarca un sitio de empalme entre la cola de ARN prerribosómico (prARN) y el
- 30 ARN ribosómico maduro (mrARN).
13. El dispositivo de la reivindicación 12, en donde el soporte sólido es un electrodo, membrana, pocillo de ELISA o superficie óptica.
14. Un kit para determinar si una muestra de bacterias es susceptible a un agente antibiótico, comprendiendo el kit un par de sondas de oligonucleótidos en donde al menos un par de oligonucleótidos se selecciona del grupo compuesto por:
- 35 (a) sondas de *E. Coli* (todas las enterobacterias): 5'-AAGCCTCACGGTTCATT (SEQ ID NO: 5) y GGCGTTGTAAGGTT (SEQ ID NO: 6);
- (b) Sondas de *Pseudomonas aeruginosa*: 5'-AAGCCTCACGGGCAATT (SEQ ID NO: 7) y GGTGTTATATGGTC (SEQ ID NO: 8);
- 40 (c) Sondas de *Streptococcus pyogenes*: AAGTCCTCGAGCTATT (SEQ ID NO: 9) y ATTTCTTTTGGAT (SEQ ID NO: 10); y
- (d) Sondas de *Staphylococcus aureus*: AAGTCTTCGATCGATT (SEQ ID NO: 11) y CATTTATTTGATT (SEQ ID NO: 12).
15. Un método para el seguimiento de la tasa de crecimiento de un cultivo bacteriano, el método comprende:
- 45 (a) poner en contacto un espécimen obtenido a partir del cultivo con una sonda o par de sondas que se hibrida específicamente a una secuencia diana sobre la longitud total de la secuencia diana, en donde la secuencia diana comprende 25-35 nucleótidos contiguos de ARN ribosómico (rARN) bacteriano que abarca un sitio de empalme entre la cola del ARN prerribosómico (prARN) y el ARN ribosómico maduro (mrARN);
- (b) (b) detectar la cantidad de hibridación de la sonda a la secuencia diana en el espécimen de (a) con relación a un

punto de tiempo anterior u otro control.

(c) (c) identificar el cultivo como en crecimiento si la cantidad de hibridación de la sonda a la secuencia diana en el paso (b) está en aumento con respecto a la cantidad de hibridación de la sonda a la secuencia diana en el punto de tiempo anterior.

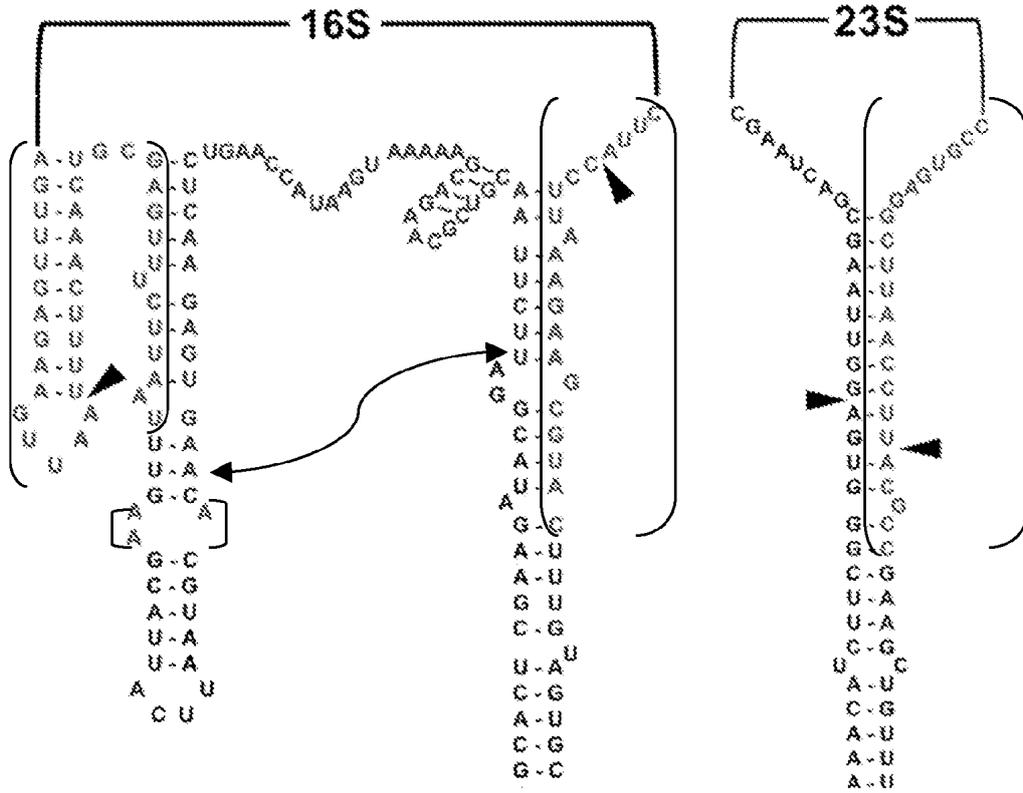


Fig. 1

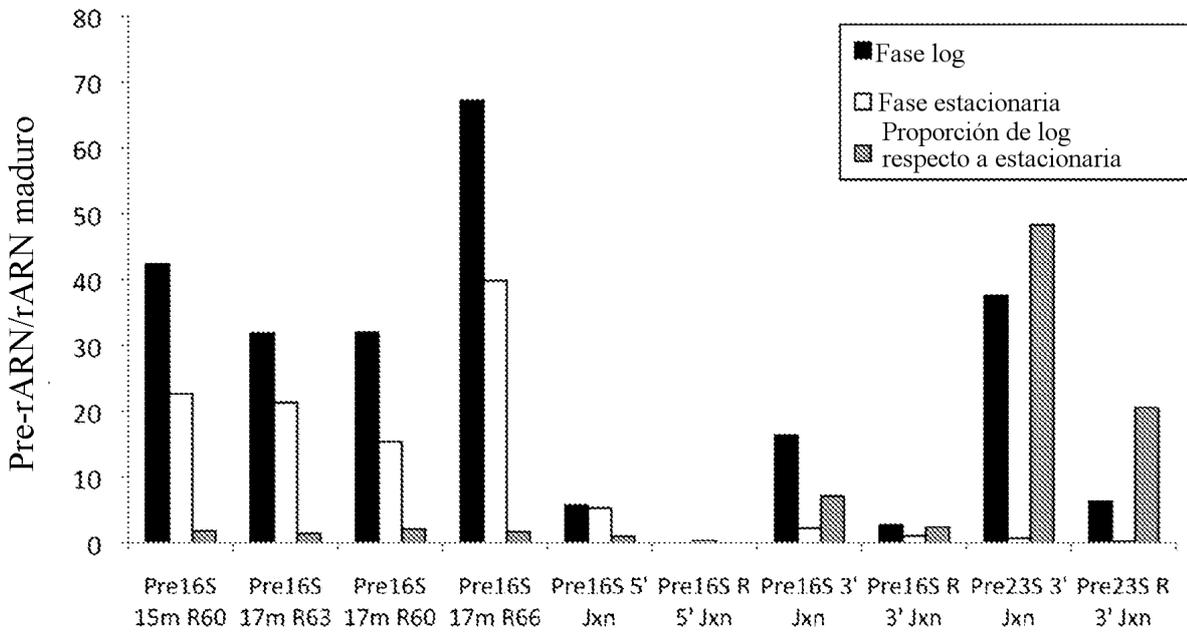
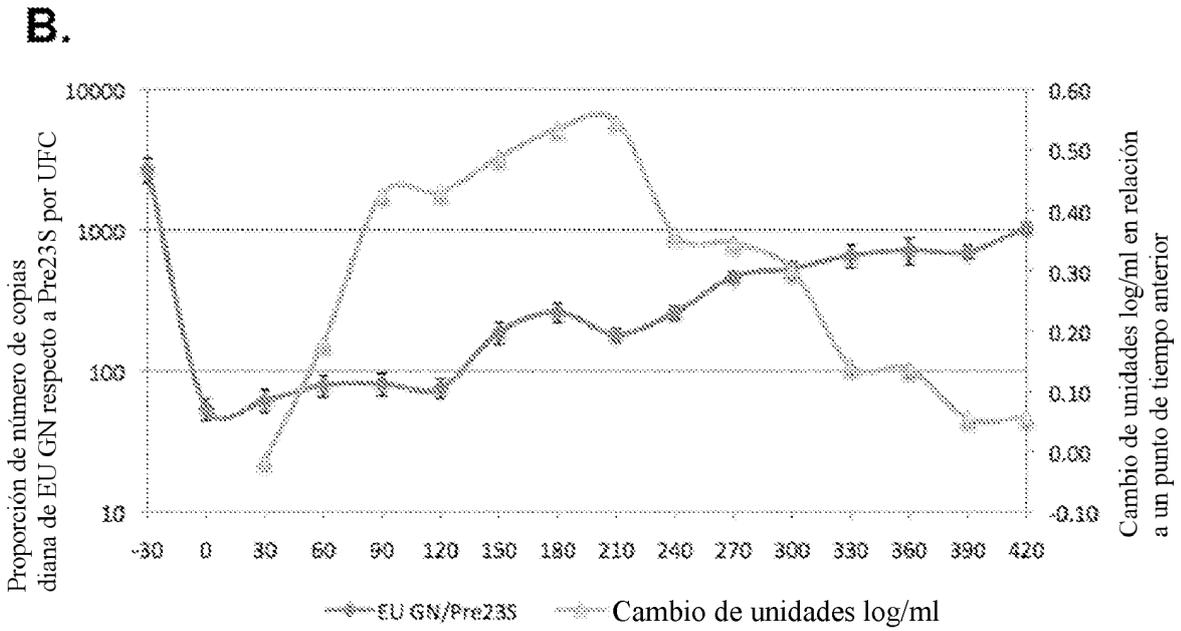
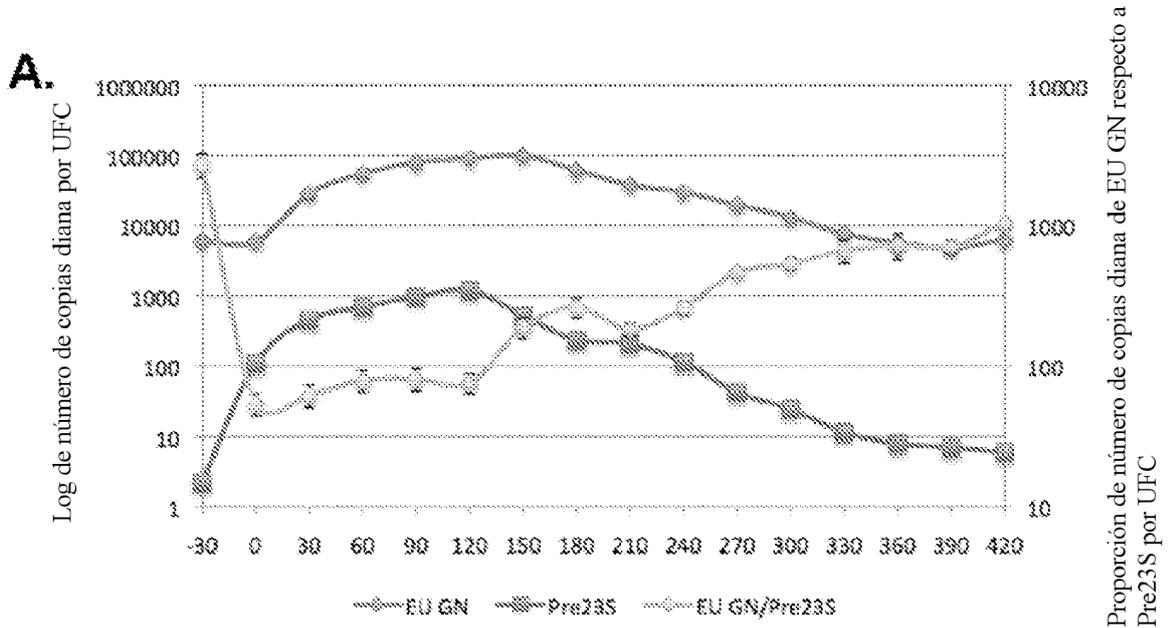
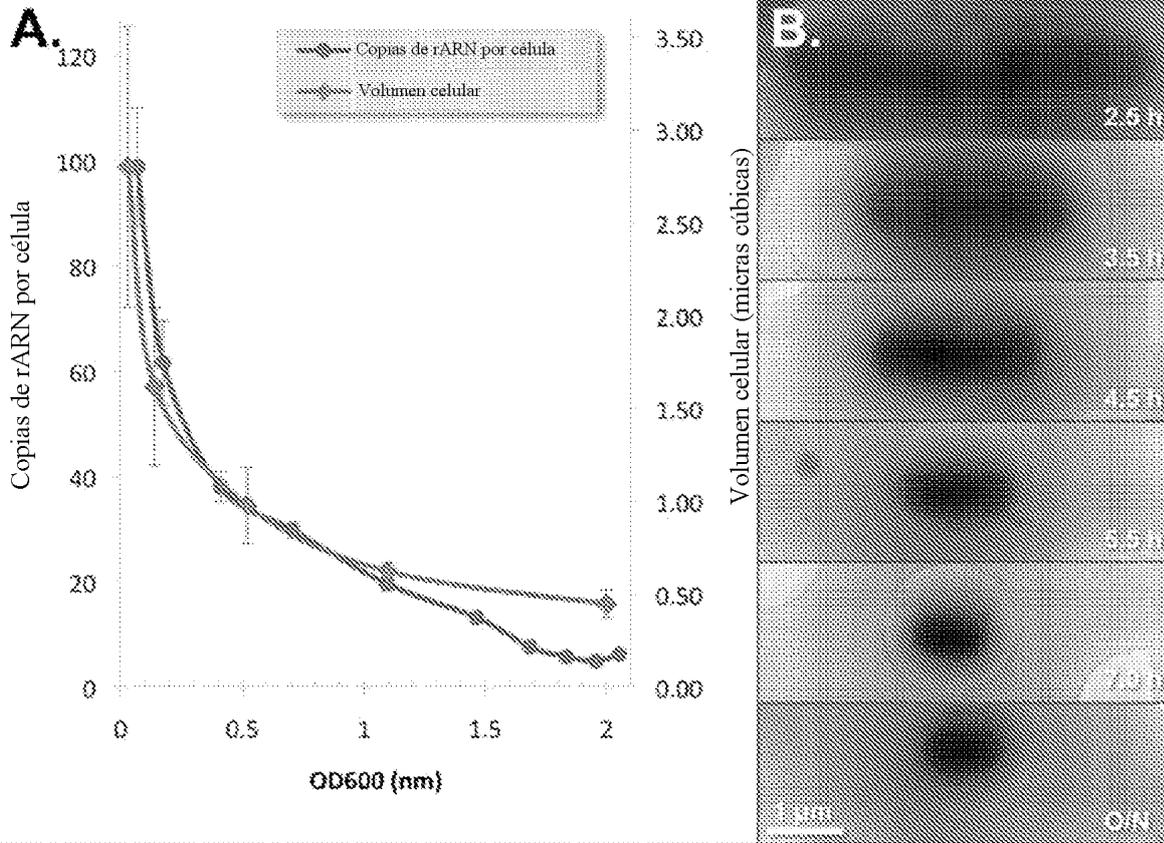


Fig. 2



Figs. 3A-3B



Figs. 4A-4B

Fig. 5A

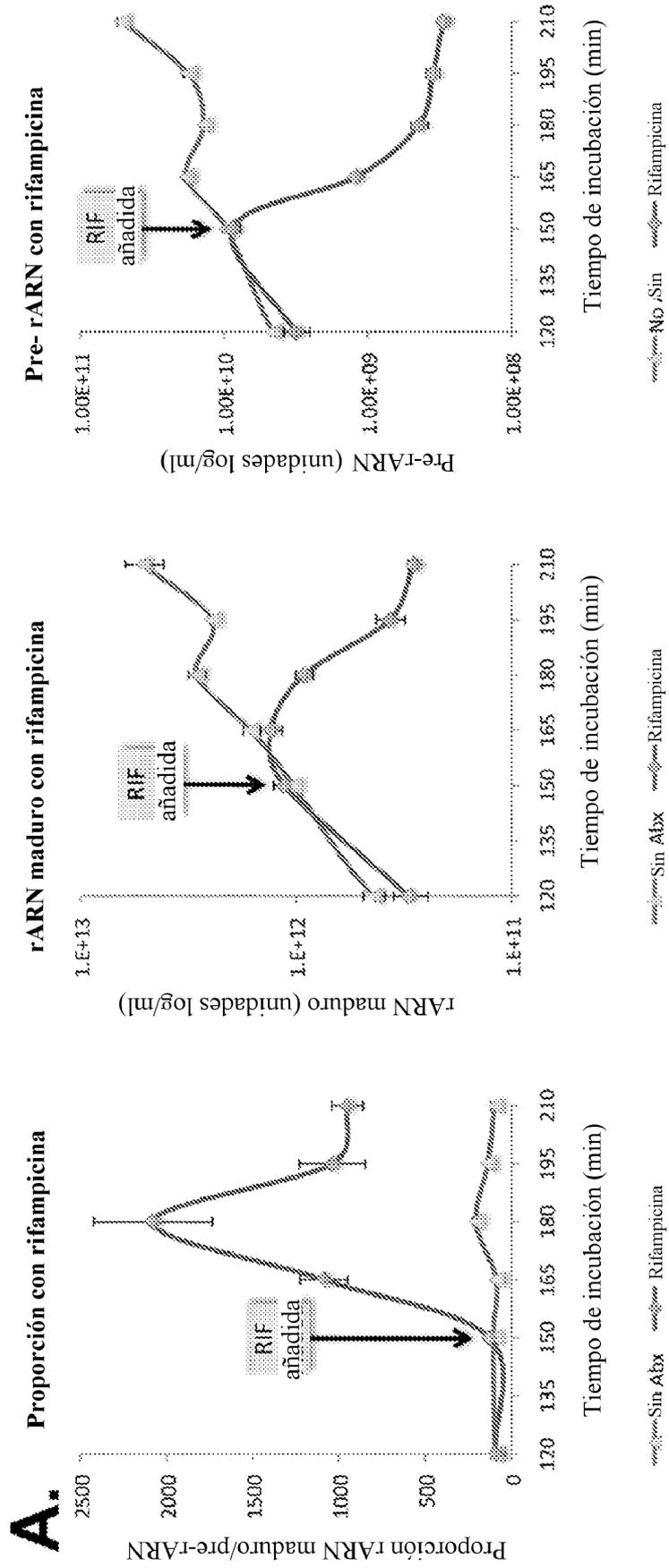


Fig. 5B

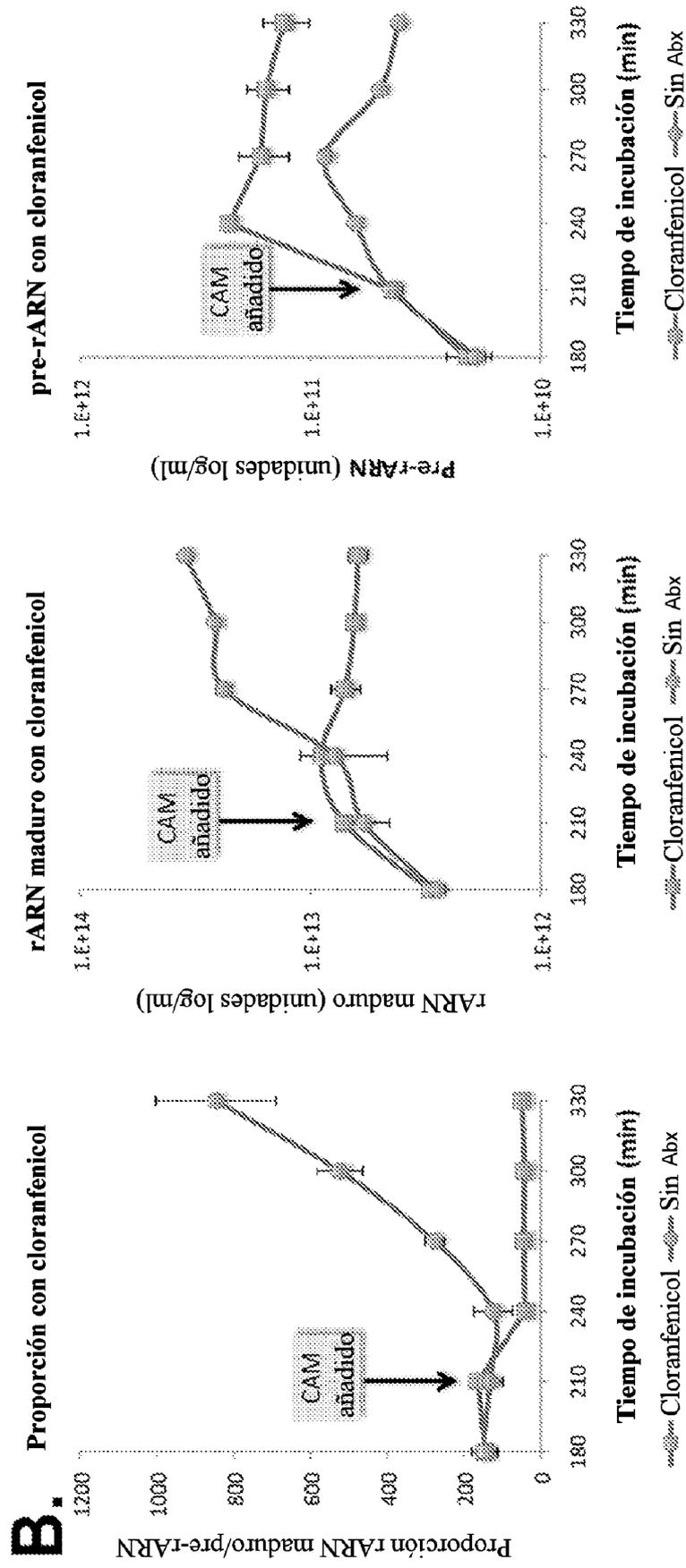


Fig. 5C

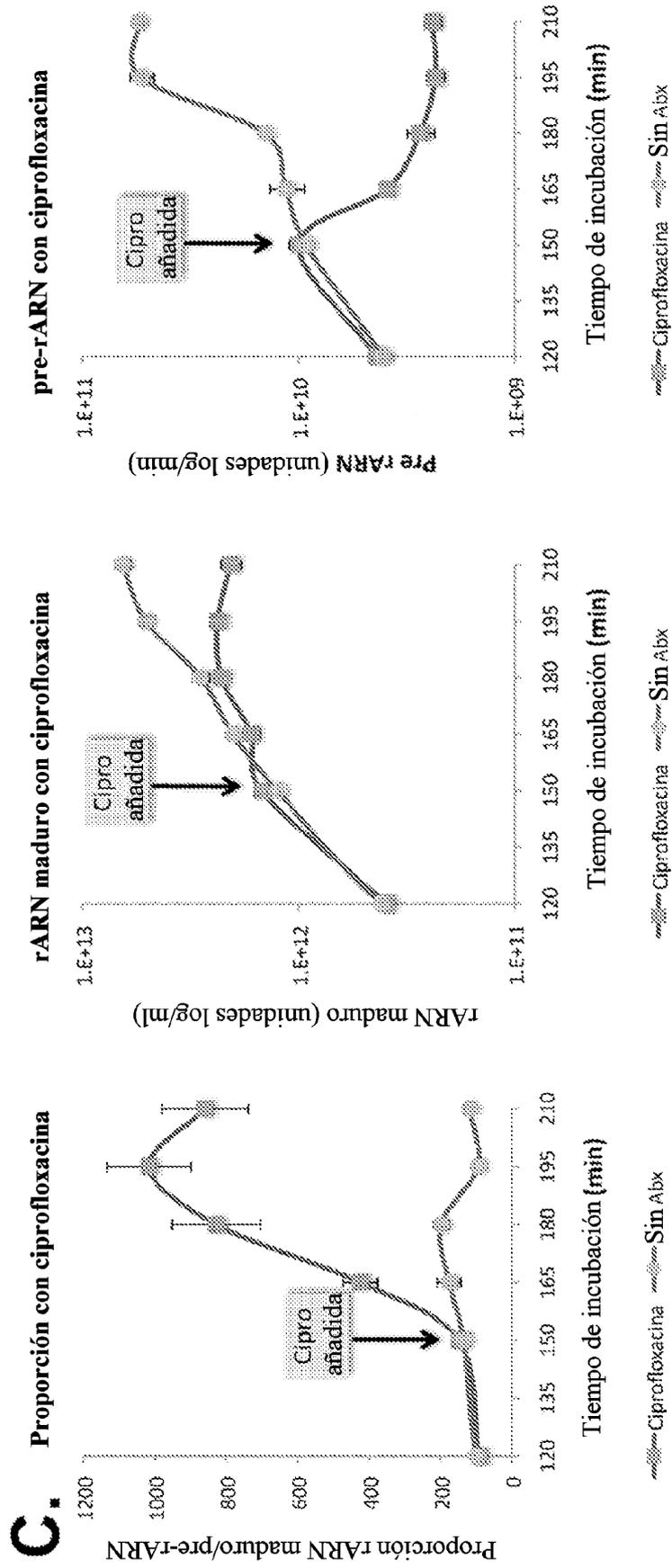
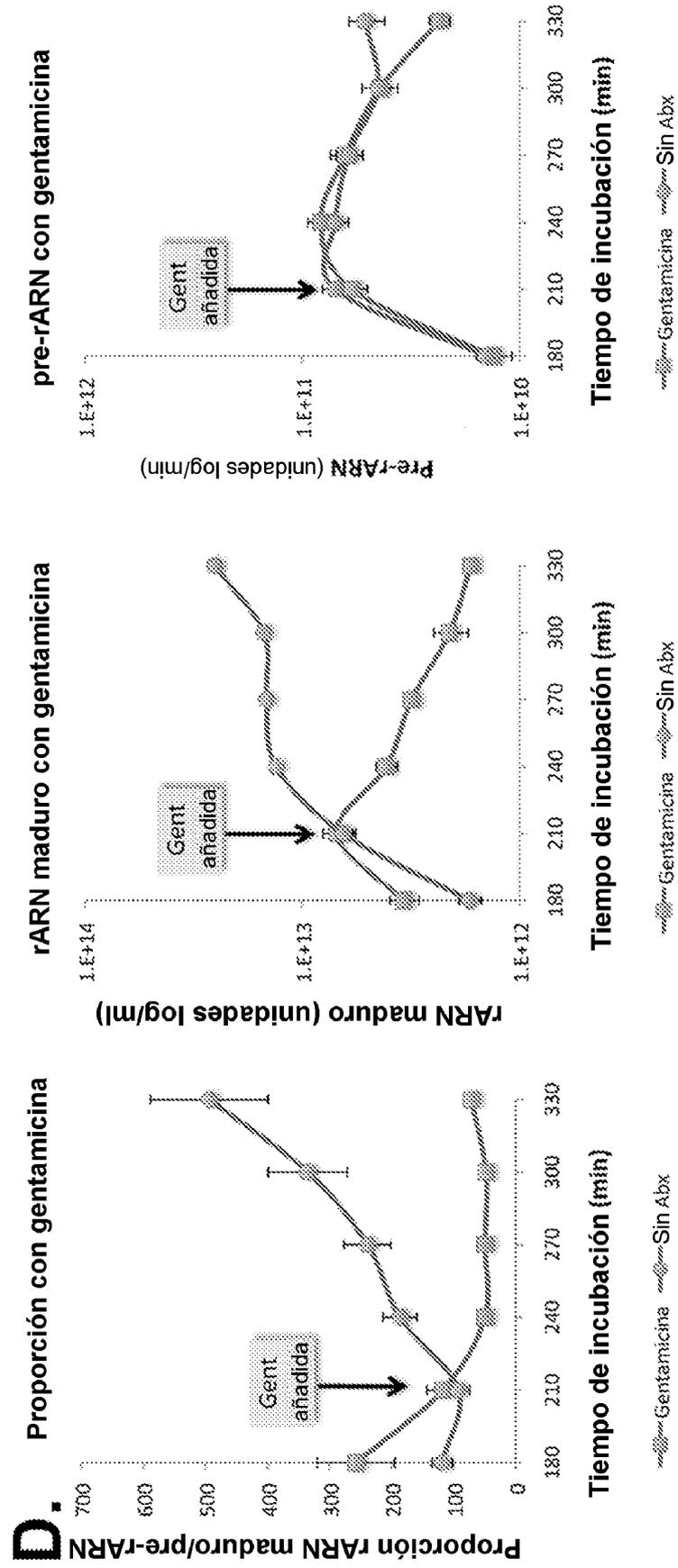


Fig. 5D



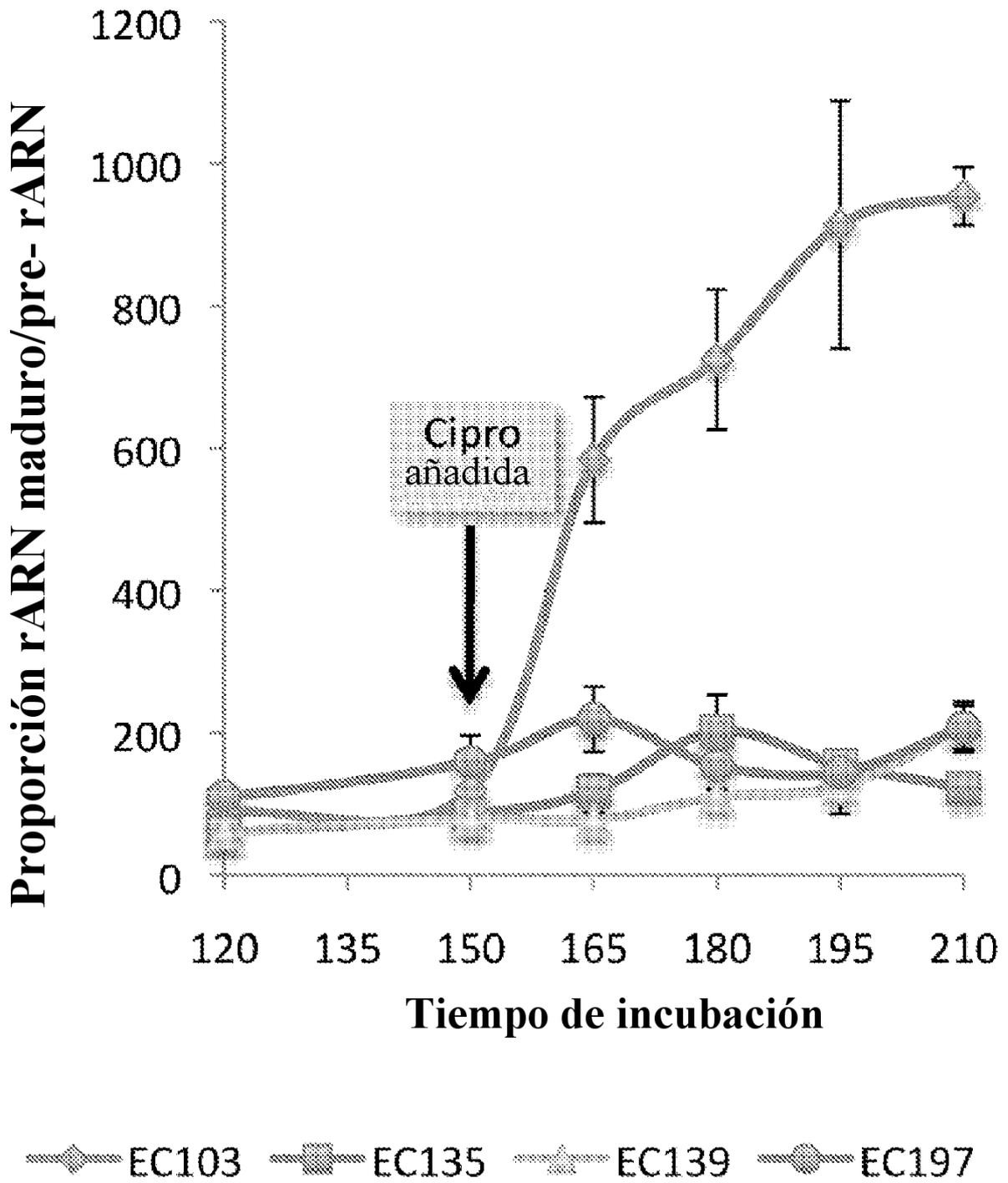


Fig. 6A

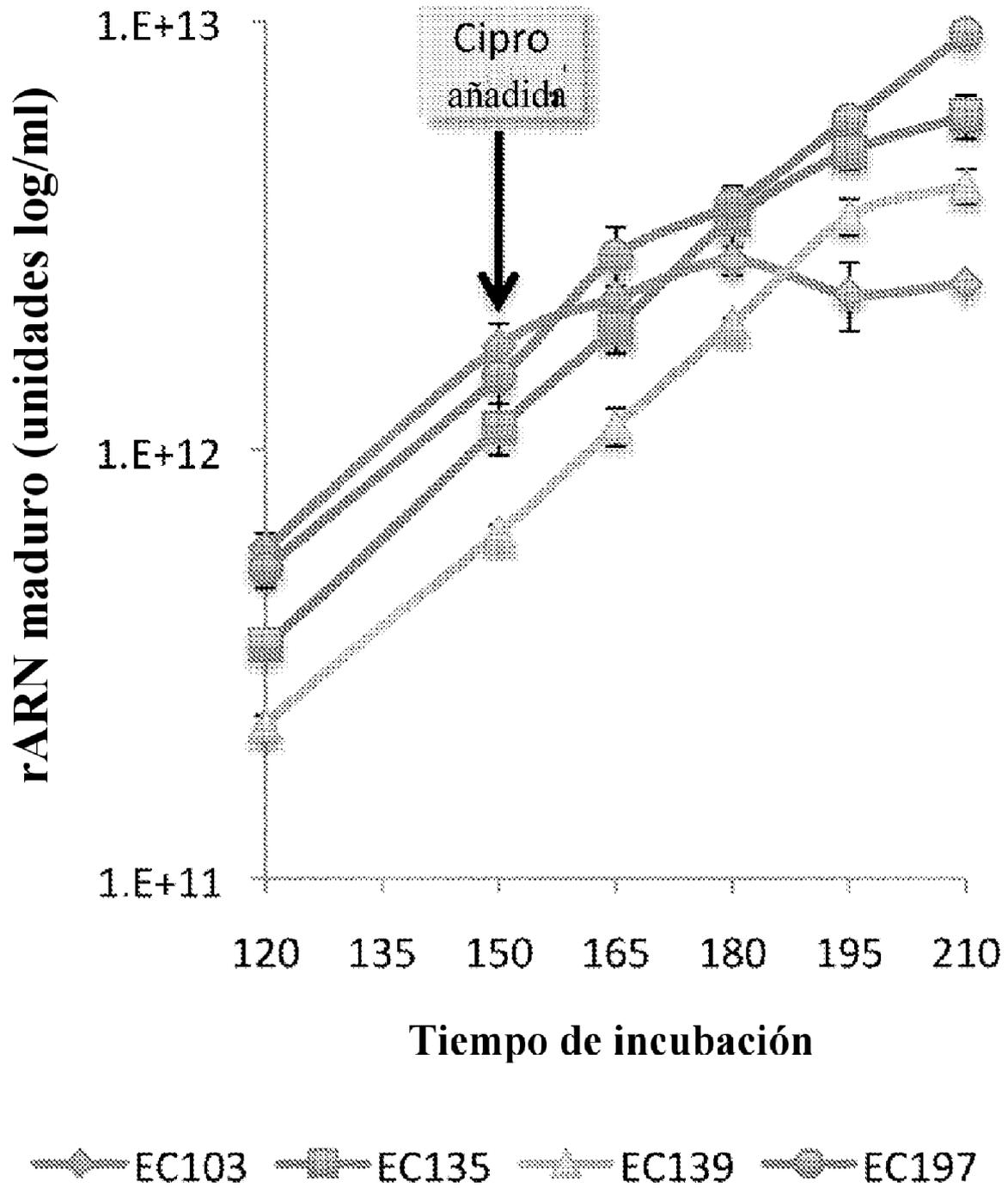


Fig. 6B

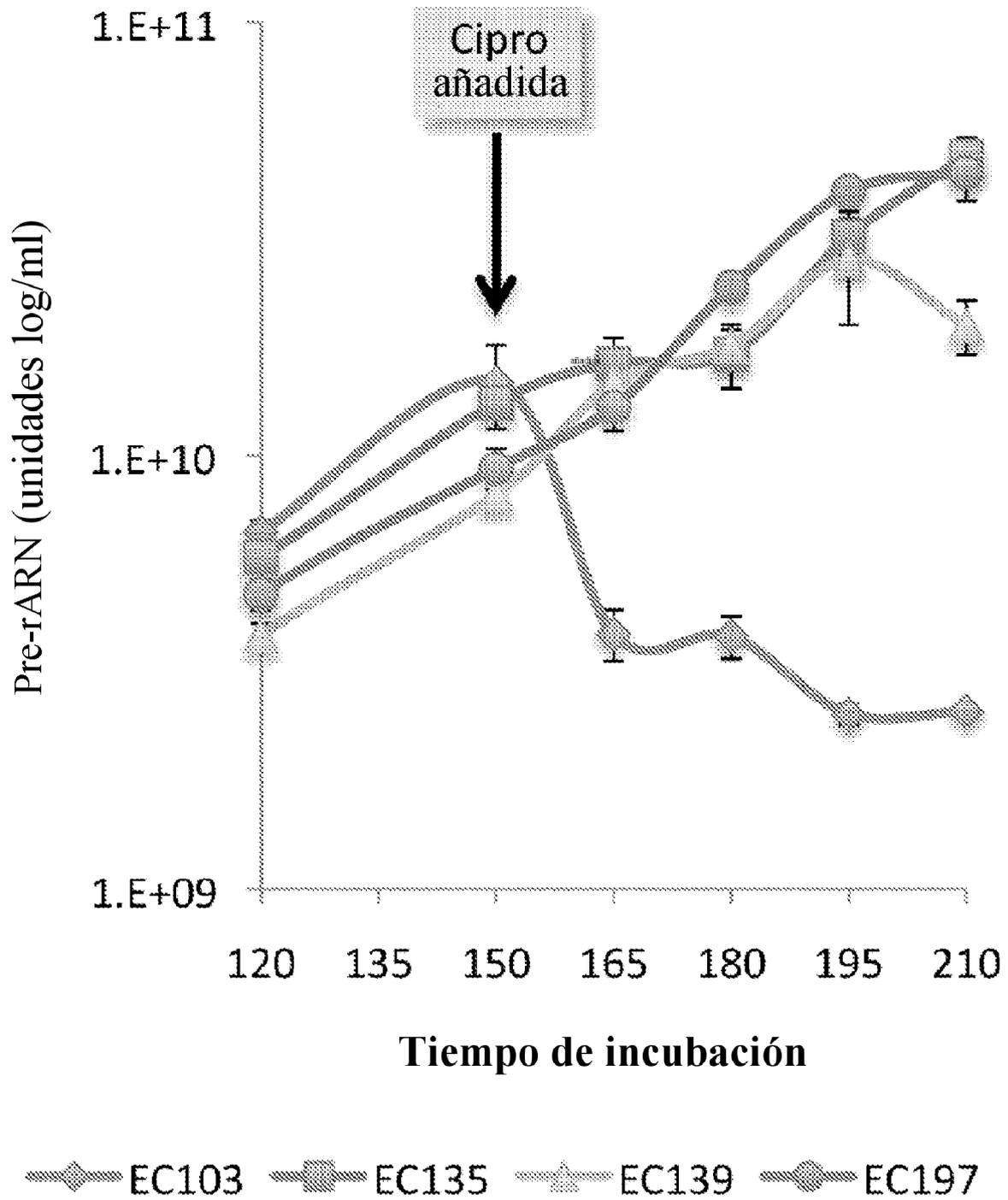
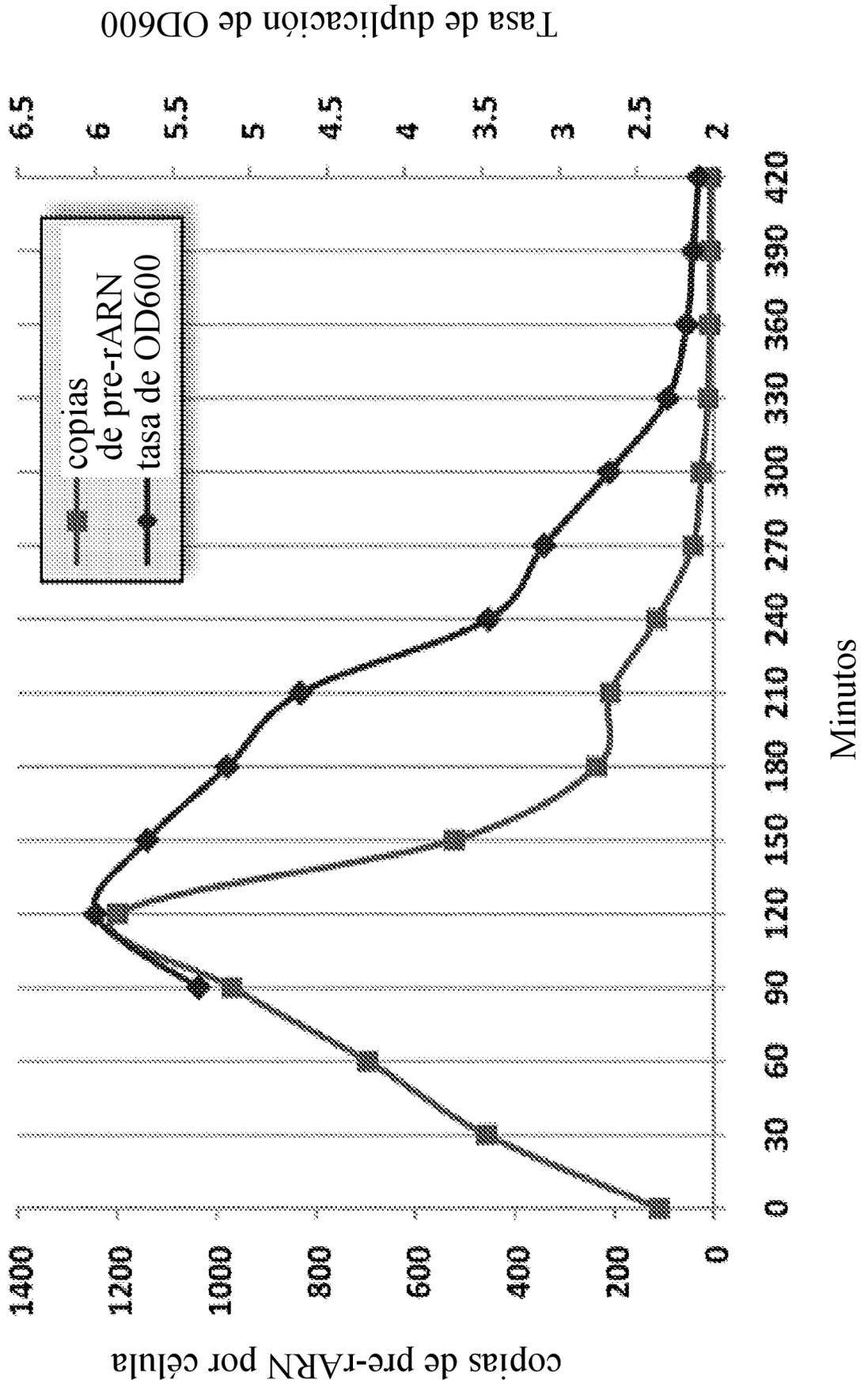


Fig. 6C

Fig. 7



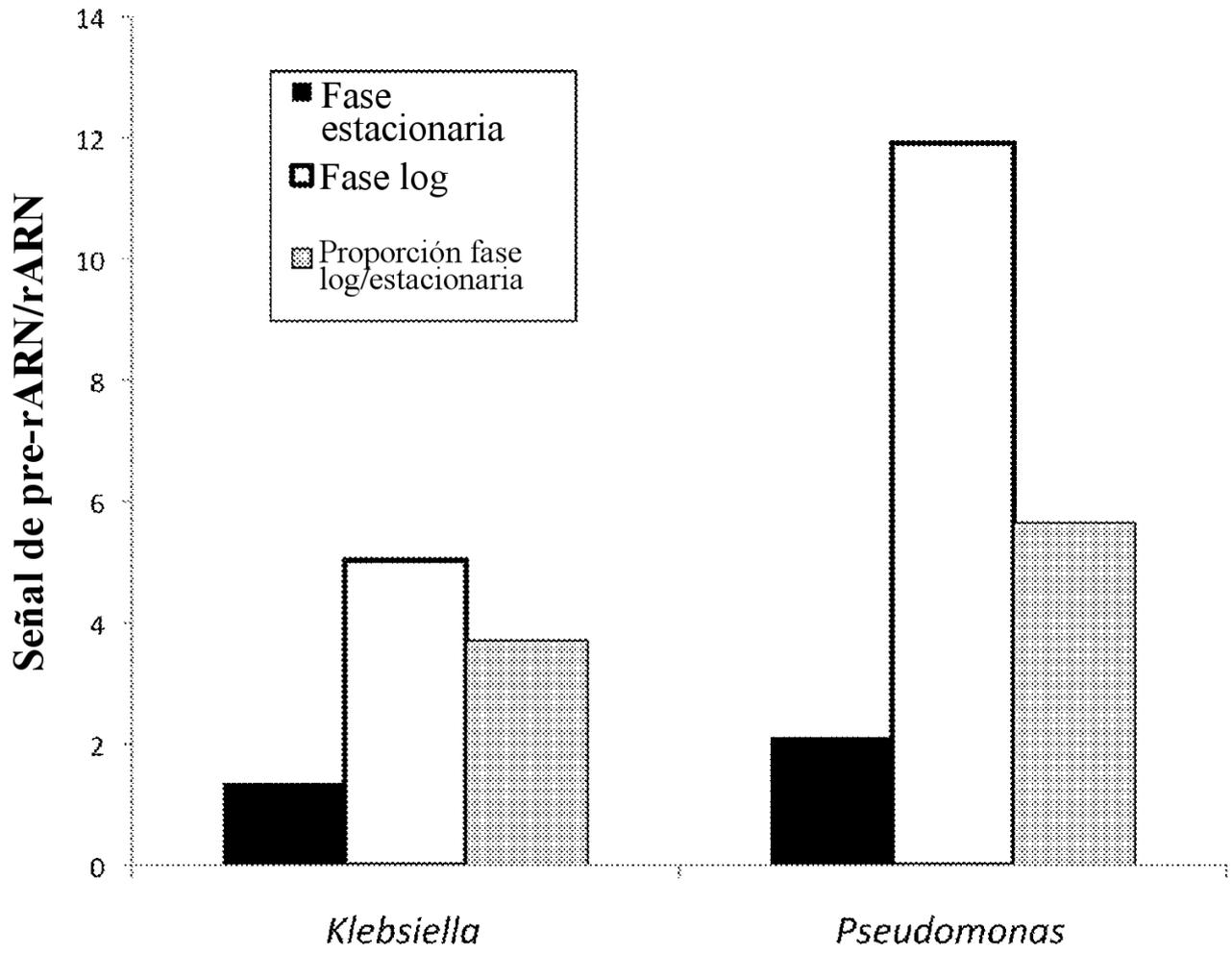


Fig. 8

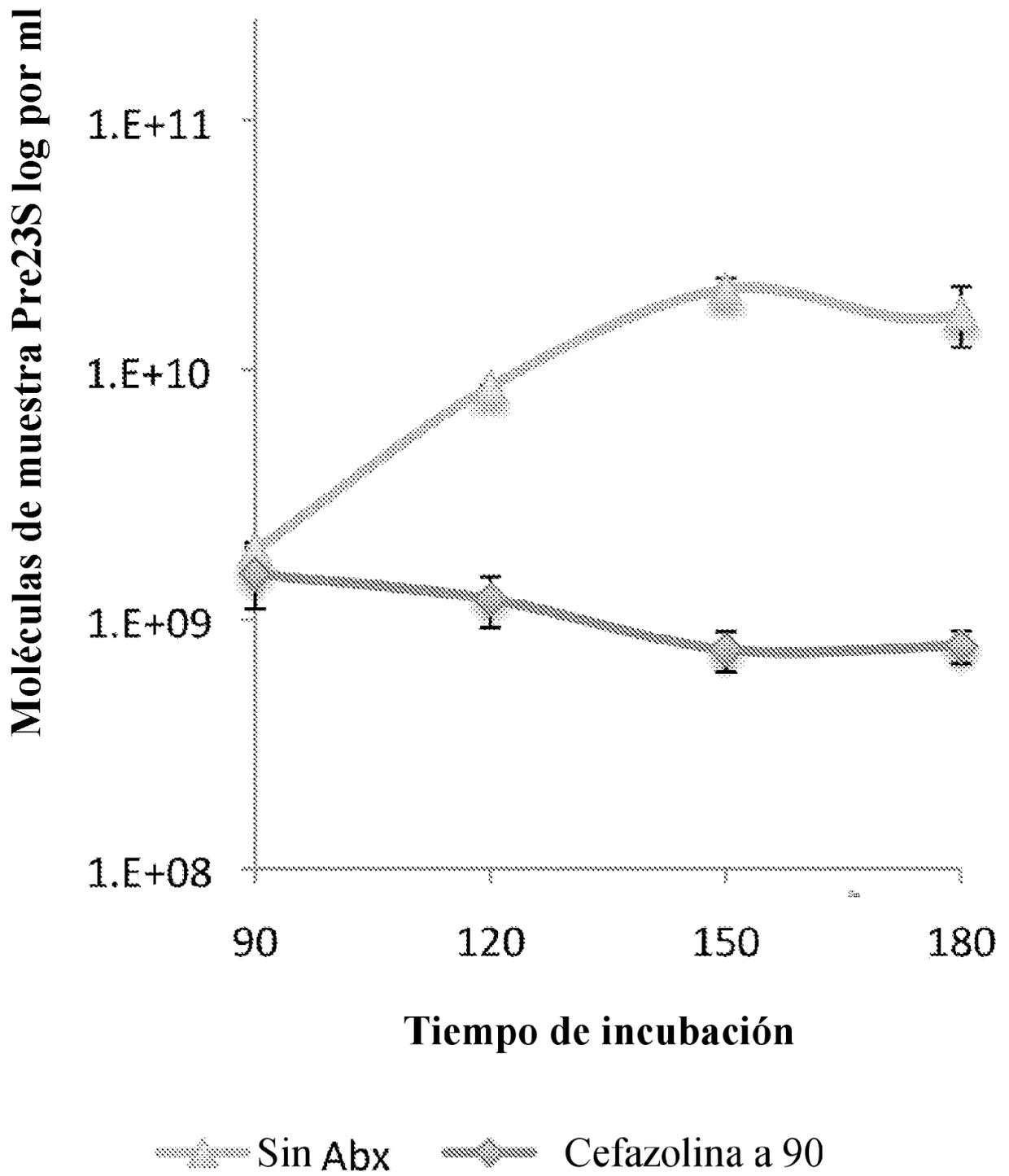


Fig. 9