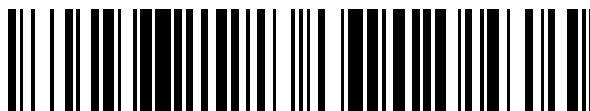


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 761 631**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.04.2016 PCT/EP2016/059518**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2016 WO16174151**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2016 E 16721390 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2019 EP 3289100**

54 Título: **Detección específica de secuencia y determinación del fenotipo**

30 Prioridad:

30.04.2015 US 201562155011 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.05.2020

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

REY, DIEGO ARIEL

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 761 631 T3

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

DESCRIPCIÓN

Detección específica de secuencia y determinación del fenotipo

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los sistemas indicadores celulares pueden presentar reactividad cruzada e interferencia microbiana con organismos distintos de la diana. Por ejemplo, si se usa un indicador de enterobacteriáceas para detectar *E. coli* en una muestra de heces; otras especies de enterobacteriáceas tales como *K. pneumoniae* pueden producir una señal de reacción cruzada que da como resultado un resultado positivo falso. Además, las especies de otra familia de bacterias, tales como *P. aeruginosa*, *A. baumannii* y *S. maltophilia*, que pueden estar presentes en una muestra, pueden dar como resultado interferencias microbianas que dan como resultado un resultado negativo falso.

Los antibiogramas (AST) miden la respuesta de un microorganismo a un antimicrobiano y se usan para determinar si el microorganismo es sensible o no es sensible al antimicrobiano. La respuesta de un microorganismo a un antimicrobiano se puede deber a una variedad de mecanismos, de los que todos dan la misma respuesta o fenotipo. Por ejemplo, en enterobacteriáceas resistentes al carbapenem (CRE), la resistencia a los antibióticos de carbapenem se puede deber a una variedad de carbapenemasas codificadas por diferentes genes y variantes de genes que incluyen *blan_{DM-1}*, *bla_{KPC}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{CMY}*, etc., así como situaciones que dan como resultado un fenotipo no sensible al carbapenem a pesar de la falta de una carbapenemasa tal como la hiperexpresión de β -lactamasa distinta de carbapenemasa y mutaciones que dan como resultado la captación disminuida de un carbapenem en una célula (por ejemplo, mutaciones de porina).

El AST no puede discriminar entre diferentes mecanismos de resistencia que imparten una respuesta fenotípica común. Cuando se somete a prueba la respuesta de una enterobacteriácea al meropenem, por ejemplo, si se descubre que la enterobacteriácea es resistente al meropenem, no se puede determinar a partir de este ensayo si la resistencia se debe a *blan_{DM-1}* o *bla_{KPC}*, u otros mecanismos de resistencia al carbapenem.

Se han desarrollado extensiones del AST para proporcionar información limitada acerca del mecanismo que imparte un fenotipo de resistencia en un microorganismo. Por ejemplo, cuando se llevan a cabo pruebas de AST en enterobacteriáceas usando amoxicilina, si se descubre que el organismo es resistente a la amoxicilina pero sensible a la amoxicilina en presencia de ácido clavulánico, un inhibidor de la β -lactamasa, este resultado puede indicar que una β -lactamasa está ligada al fenotipo de resistencia a la amoxicilina. Sin embargo, esta técnica solo informa del papel de una β -lactamasa, pero no de la identidad de la β -lactamasa específica.

Se pueden emplear técnicas de amplificación de ácido nucleico tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para determinar la presencia de genes específicos que pueden impartir un fenotipo de resistencia en un organismo. Sin embargo, estas técnicas no pueden distinguir entre organismos viables y no viables lo que da lugar a posibles resultados positivos falsos y tampoco pueden determinar si el gen detectado se expresa y, por tanto, no pueden medir la respuesta fenotípica de un organismo a un antimicrobiano y, por tanto, en general no pueden determinar la sensibilidad antimicrobiana.

Debido a estas limitaciones, existe una necesidad de un medio de determinación del mecanismo subyacente que imparte una respuesta fenotípica en un organismo. La identidad del mecanismo subyacente específico que imparte un fenotipo dado puede ser información importante para el análisis epidemiológico y otros análisis relacionados.

SUMARIO DE LA INVENCION

En el presente documento se divulga un procedimiento para determinar un mecanismo para un fenotipo de sensibilidad antimicrobiana, que comprende: proporcionar una muestra que comprende al menos un microorganismo que no es sensible a al menos un agente antimicrobiano; poner en contacto la muestra con el agente antimicrobiano, en el que el agente antimicrobiano puede destruir, inhibir el crecimiento, o de otro modo alterar la viabilidad de uno o más microorganismos; poner en contacto la muestra con al menos un compuesto que comprende una molécula oligonucleotídica que selecciona al menos una secuencia de ácido nucleico específica que está implicada en un fenotipo no sensible al agente antimicrobiano, opcionalmente en el que la molécula oligonucleotídica inhibe la secuencia de ácido nucleico; y determinar el mecanismo para el fenotipo de sensibilidad antimicrobiana del microorganismo en base a la presencia o ausencia de una indicación detectable de viabilidad asociada con el microorganismo cuando el microorganismo está en contacto con el agente antimicrobiano y la molécula oligonucleotídica, en el que la presencia de la indicación detectable de viabilidad indica que la secuencia de ácido nucleico específica seleccionada por la molécula oligonucleotídica no está relacionada con el mecanismo para el fenotipo de sensibilidad antimicrobiana al agente antimicrobiano, y en el que la ausencia de la indicación detectable de viabilidad indica que la secuencia de ácido nucleico específica seleccionada por la molécula oligonucleotídica está relacionada con el mecanismo para el fenotipo de sensibilidad antimicrobiana al agente antimicrobiano. Otros procedimientos, composiciones, sistemas, cultivos, moléculas y kits se describen de forma similar en el presente documento.

En el presente documento también se divulga un procedimiento para determinar un mecanismo para un fenotipo de sensibilidad antimicrobiana que comprende: proporcionar una muestra que comprende al menos un microorganismo que no es sensible a al menos un agente antimicrobiano, y en el que la muestra comprende además: el agente antimicrobiano, en el que el agente antimicrobiano puede destruir, inhibir el crecimiento, o de otro modo alterar la viabilidad de uno o más microorganismos; y al menos un compuesto que comprende una molécula oligonucleotídica que selecciona al menos una secuencia de ácido nucleico específica que está implicada con un fenotipo no sensible al agente antimicrobiano; y determinar el mecanismo para el fenotipo no sensible para el microorganismo en base a la presencia o ausencia de una indicación detectable de viabilidad asociada con el microorganismo cuando el microorganismo está en contacto con el agente antimicrobiano y la molécula oligonucleotídica, en el que la presencia de la indicación detectable de viabilidad indica que la secuencia de ácido nucleico específica seleccionada por la molécula oligonucleotídica no está relacionada con el mecanismo del fenotipo no sensible al agente antimicrobiano, y en el que la ausencia de la indicación detectable de viabilidad indica que la secuencia de ácido nucleico específica seleccionada por la molécula oligonucleotídica está relacionada con el mecanismo para el fenotipo no sensible al agente antimicrobiano.

En algunos aspectos, el compuesto es un APN (ácido peptidonucleico). En algunos aspectos, el compuesto es un péptido-APN. En algunos aspectos, el péptido facilita la captación de la molécula oligonucleotídica en el microorganismo. En algunos aspectos, el APN selecciona una región de inicio de la traducción (TIR) de un gen. En algunos aspectos, el péptido-APN selecciona un gen de resistencia a la β -lactama o un gen de resistencia a la vancomicina. En algunos aspectos, el péptido-APN selecciona un gen *blaKPC-3*, un gen *blaNDM-1*, un gen *blaSHV-18*, un gen *vanC*.

En el presente documento también se divulga un procedimiento para determinar un mecanismo implicado en un fenotipo no sensible, que comprende: proporcionar una muestra que comprende una enterobacteriácea que no es sensible al carbapenem; poner en contacto la muestra con carbapenem; poner en contacto la muestra con una molécula oligonucleotídica que selecciona un gen asociado con resistencia al carbapenem; y determinar el mecanismo de no sensibilidad a carbapenem para la enterobacteriácea en base a la presencia o ausencia de una indicación detectable de viabilidad asociada con la enterobacteriácea cuando la enterobacteriácea está en contacto con el carbapenem y la molécula oligonucleotídica, en el que la presencia de la indicación detectable de viabilidad indica que el gen seleccionado por la molécula oligonucleotídica no está relacionado con el mecanismo de no sensibilidad a carbapenem, y en el que la ausencia de la indicación detectable de viabilidad indica que el gen seleccionado por la molécula oligonucleotídica está relacionado con el mecanismo de no sensibilidad a carbapenem.

En el presente documento también se divulga un procedimiento para determinar la presencia de un organismo de interés, que comprende: proporcionar una muestra que potencialmente comprende al menos un organismo de interés; poner en contacto la muestra con al menos un compuesto que comprende una molécula oligonucleotídica que selecciona al menos una secuencia de ácido nucleico específica que está implicada con la viabilidad del organismo, en el que la secuencia de ácido nucleico específica es única para el organismo; y determinar la presencia del organismo en base a la presencia o ausencia de una indicación detectable de viabilidad asociada con el organismo cuando el organismo está en contacto con la molécula oligonucleotídica, en el que la presencia de la indicación detectable de viabilidad indica que el organismo de interés no está presente en la muestra, y en el que la ausencia de la indicación detectable de viabilidad indica que el organismo de interés puede estar presente en la muestra.

En el presente documento también se divulga un procedimiento para determinar una presencia de un organismo de interés, que comprende: proporcionar una muestra que potencialmente comprende al menos un organismo de interés y al menos un compuesto que comprende una molécula oligonucleotídica que selecciona al menos una secuencia de ácido nucleico específica que está implicada con la viabilidad del organismo, en el que la secuencia de ácido nucleico específica es única para el organismo; y determinar la presencia del organismo en base a la presencia o ausencia de una indicación detectable de viabilidad asociada con el organismo cuando el organismo está en contacto con la molécula oligonucleotídica, en el que la presencia de la indicación detectable de viabilidad indica que el organismo de interés no está presente en la muestra, y en el que la ausencia de la indicación detectable de viabilidad indica que el organismo de interés puede estar presente en la muestra. En el presente documento también se divulga un procedimiento para determinar la presencia de un organismo de interés, que comprende: proporcionar una muestra que potencialmente comprende al menos un organismo de interés; poner en contacto una primera porción de la muestra con al menos un compuesto que comprende una molécula oligonucleotídica que selecciona al menos una secuencia de ácido nucleico específica que está implicada con la viabilidad del organismo, en el que la secuencia de ácido nucleico específica es única para el organismo; determinar la presencia del organismo en la primera porción de la muestra en base a la presencia o ausencia de una indicación detectable de viabilidad asociada con el organismo cuando el organismo está en contacto con la molécula oligonucleotídica, en el que la presencia de la indicación detectable de viabilidad indica que el organismo de interés no está presente en la muestra, y en el que la ausencia de la indicación detectable de viabilidad indica que el organismo de interés puede estar presente en la muestra; y determinar la presencia del organismo en una segunda porción de la muestra que no contiene la molécula oligonucleotídica en base a la presencia o ausencia de una indicación detectable de viabilidad asociada con el organismo, en el que la presencia de la indicación detectable de viabilidad indica que el organismo de interés puede estar presente en la muestra, y en el que la ausencia de la

indicación detectable de viabilidad indica que el organismo de interés no está presente en la muestra.

En el presente documento también se divulga un procedimiento para reducir la cantidad de organismos potencialmente interferentes o de reactividad cruzada en un ensayo diseñado para detectar un organismo diana, que comprende: obtener una muestra que potencialmente comprende al menos un organismo que es potencialmente interferente o de reactividad cruzada en un ensayo diseñado para detectar un organismo diana; poner en contacto el organismo interferente o de reactividad cruzada con al menos un compuesto que comprende una molécula oligonucleotídica que selecciona al menos una secuencia de ácido nucleico específica que está implicada con la viabilidad del organismo potencialmente interferente o de reactividad cruzada, en el que la secuencia de ácido nucleico específica es única para el organismo; y provocar que el organismo pierda viabilidad. En algunos aspectos, la al menos una secuencia de ácido nucleico específica que está implicada con la viabilidad del organismo potencialmente interferente o de reactividad cruzada es el gen *murA*.

Los aspectos particulares de todos los procedimientos descritos en el presente documento son como sigue:

En algunos aspectos, el compuesto es un APN (ácido peptidonucleico). En algunos aspectos, el compuesto es un péptido-APN. En algunos aspectos, el péptido facilita la captación de la molécula oligonucleotídica en el microorganismo. En algunos aspectos, el APN selecciona una región de inicio de la traducción (TIR) de un gen. En algunos aspectos, el péptido-APN selecciona un gen de resistencia a la β -lactama o un gen de resistencia a la vancomicina. En algunos aspectos, el péptido-APN selecciona un gen *blaKPC-3*, un gen *blaNDM-1*, un gen *blaSHV-18*, un gen *vanC*.

En algunos aspectos, poner en contacto la muestra con al menos un compuesto que comprende una molécula oligonucleotídica comprende introducir en el microorganismo un vector que comprende la molécula oligonucleotídica.

En algunos aspectos, la molécula oligonucleotídica es un ARN CRISPR (ARNcr). En algunos aspectos, el ARNcr se expresa a partir de un sistema CRISPR/Cas dentro del microorganismo. En algunos aspectos, el ARNcr selecciona un gen *blaNDM-1* o un gen *blaSHV-18* o transcrito.

En algunos aspectos, la molécula oligonucleotídica es un oligonucleótido antisentido.

En algunos aspectos, el compuesto es un ARN bicatenario (ARNbc) que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en el que la hebra antisentido comprende la molécula antisentido. En algunos aspectos, cada hebra del ARNbc tiene una longitud de 8 a 49 nucleótidos (por ejemplo, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos de longitud), y opcionalmente en el que cada hebra comprende un T o TT en 3'. En algunos aspectos, al menos una de las hebras comprende al menos un nucleótido químicamente modificado. En algunos aspectos, el nucleótido químicamente modificado es un nucleótido modificado en 2'. En algunos aspectos, el nucleótido modificado en 2' es un nucleótido sustituido con 2'-metilo o un nucleótido sustituido con 2'-amino.

En algunos aspectos, la secuencia de ácido nucleico específica es una secuencia de ADN o una secuencia de ARNm.

En algunos aspectos, la presencia de la indicación detectable de viabilidad indica que el microorganismo es viable. En algunos aspectos, la ausencia de la indicación detectable de viabilidad indica que el microorganismo no es viable.

En algunos aspectos, un procedimiento divulgado en el presente documento comprende además poner en contacto la muestra con un segundo compuesto que comprende una molécula oligonucleotídica que selecciona una segunda secuencia de ácido nucleico específica implicada con la no sensibilidad antimicrobiana al agente antimicrobiano en el microorganismo.

En algunos aspectos, el microorganismo es un procariota o un eucariota.

En algunos aspectos, la indicación detectable de viabilidad es el crecimiento del microorganismo, un marcador asociado con el microorganismo o una señal detectable asociada con el microorganismo.

En algunos aspectos, un procedimiento divulgado en el presente documento comprende además poner en contacto la muestra con una molécula de ácido nucleico indicadora que codifica una molécula indicadora, en condiciones tales que la molécula indicadora se introduce en el microorganismo y proporcione la indicación detectable de viabilidad. En algunos aspectos, el sistema indicador es un sistema indicador basado en liposomas, un sistema indicador basado en fagos o un sistema indicador basado en partículas de transducción no replicativa.

En algunos aspectos, el al menos un microorganismo comprende una molécula de ácido nucleico indicadora que codifica una molécula indicadora.

En algunos aspectos, un procedimiento divulgado en el presente documento comprende además poner en contacto la muestra con una partícula de transducción no replicativa (NRTP) que comprende una molécula de ácido nucleico indicadora que codifica una molécula indicadora, en condiciones tales que la NRTP inserte en el microorganismo la molécula de ácido nucleico indicadora y tales que la molécula indicadora proporcione la indicación detectable de viabilidad.

En algunos aspectos, la NRTP se produce a partir de un sistema de encapsidación de células bacterianas que comprende una célula de bacteria huésped, una primera construcción de ácido nucleico en el interior de la célula de bacteria huésped que comprende un genoma de bacteriófago que tiene una secuencia de sitio de inicio de encapsidación no funcional, en la que la secuencia de sitio de inicio de encapsidación no funcional evita la encapsidación del genoma de bacteriófago en la NRTP, y una segunda construcción de ácido nucleico en el interior de la célula de bacteria huésped y separada de la primera construcción de ácido nucleico que comprende la molécula de ácido nucleico indicadora que tiene un gen indicador y una secuencia de sitio de inicio de encapsidación funcional para facilitar la encapsidación de un replicón de la molécula de ácido nucleico indicadora en la NRTP, en la que la segunda secuencia de sitio de inicio de encapsidación funcional en la segunda construcción de ácido nucleico complementa la secuencia de sitio de inicio de encapsidación no funcional en el genoma de bacteriófago en la primera construcción de ácido nucleico.

En algunos aspectos, la molécula de ácido nucleico indicadora es un gen que codifica una molécula emisora de luz. En algunos aspectos, el gen es un gen luciferasa.

En algunos aspectos, detectar la indicación detectable de viabilidad comprende detectar una presencia o ausencia de la molécula indicadora. En algunos aspectos, detectar la indicación detectable de viabilidad comprende detectar una presencia o ausencia de una reacción mediada por la molécula indicadora. En otros aspectos, detectar la indicación detectable de viabilidad comprende detectar una conformación, actividad u otra característica de la molécula indicadora (por ejemplo, fluorescencia o capacidad para unirse a o de otro modo interactuar con otra molécula).

En algunos aspectos, el microorganismo es de la familia *Enterobacteriaceae*, el género *Enterococcus* o el género *Candida*.

En algunos aspectos, el microorganismo es del género *Escherichia*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Helicobacter*, *Rickettsia*, *Haemophilus*, *Xenorhabdus*, *Acinetobacter*, *Bordetella*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Actinobacillus*, *Pasteurella*, *Vibrio*, *Legionella*, *Bacillus*, *Calothrix*, *Methanococcus*, *Stenotrophomonas*, *Chlamydia*, *Neisseria*, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* o *Yersinia*.

En algunos aspectos, el antimicrobiano es una β -lactama o vancomicina.

En algunos aspectos, el agente antimicrobiano es del grupo o clase de penicilinas, cefalosporina, carbapenems, aminoglucósidos, fluoroquinolona, lincosamida, polimixina, tetraciclina, macrólido, oxazolidinona, estreptograminas, rifamicina o glucopéptido.

En algunos aspectos, el antimicrobiano es ampicilina, ampicilina-sulbactam, piperacilina-tazobactam, oxacilina, penicilina, cefazolina, cefepima, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefarolina fosamilo, ertapenem, imipenem, meropenem, amikacina, gentamicina, sinergia gentamicina, sinergia estreptomycin, tobramicina, ciprofloxacina, levofloxacina, clindamicina, colistina, daptomicina, doxiciclina, eritromicina, linezolid, nitrofurantoína, quinupristina-dalfopristina, rifampicina, tigeciclina, trimetoprima-sulfametoxazol, fosfomicina, cefoxitina, tetraciclina, moxifloxacina o tedizolid.

En determinados aspectos, el microorganismo es de la familia *Enterobacteriaceae* y el agente antimicrobiano es carbapenem.

En algunos aspectos, detectar la indicación detectable de viabilidad comprende observar el crecimiento del microorganismo, opcionalmente en el que el crecimiento se observa usando un cultivo celular.

En algunos aspectos, el compuesto comprende además un liposoma.

En algunos aspectos, la muestra se pone en contacto con el agente antimicrobiano antes de poner en contacto la muestra con el compuesto. En algunos aspectos, la muestra se pone en contacto con el compuesto antes de poner en contacto la muestra con el agente antimicrobiano, o en los que la muestra se pone en contacto con el compuesto y el agente simultáneamente.

En algunos aspectos, la muestra, el compuesto y un ácido nucleico indicador se ponen en contacto entre sí en cualquier permutación secuencial o simultáneamente.

En el presente documento también se divulga un kit para determinar un mecanismo para un fenotipo no sensible

para un microorganismo que no es sensible a un agente antimicrobiano, que comprende: un agente antimicrobiano, en el que el agente antimicrobiano puede destruir, inhibir el crecimiento, o de otro modo alterar la viabilidad de uno o más microorganismos; un compuesto que comprende una molécula oligonucleotídica que selecciona una secuencia de ácido nucleico específica que está implicada con un fenotipo no sensible al agente antimicrobiano; e instrucciones para usar el agente antimicrobiano y la molécula oligonucleotídica para determinar el mecanismo para el fenotipo no sensible para el microorganismo que no es sensible al agente antimicrobiano en base a la presencia o ausencia de una indicación detectable de viabilidad asociada con el microorganismo cuando el microorganismo está en contacto con el agente antimicrobiano y la molécula oligonucleotídica, en el que la presencia de la indicación detectable de viabilidad indica que la secuencia de ácido nucleico específica seleccionada por la molécula oligonucleotídica no está relacionada con el mecanismo para el fenotipo no sensible al agente antimicrobiano, y en el que la ausencia de la indicación detectable de viabilidad indica que la secuencia de ácido nucleico específica seleccionada por la molécula oligonucleotídica está relacionada con el mecanismo para el fenotipo no sensible al agente antimicrobiano.

En el presente documento también se divulga un kit para determinar la presencia de un organismo de interés, que comprende: un compuesto que comprende una molécula oligonucleotídica que selecciona una secuencia de ácido nucleico específica que está implicada con la viabilidad del organismo, en el que la secuencia de ácido nucleico específica es única para el organismo; e instrucciones para usar la molécula oligonucleotídica para determinar la presencia del organismo en base a la presencia o ausencia de una indicación detectable de viabilidad asociada con el organismo cuando el organismo está en contacto con la molécula oligonucleotídica, en el que la presencia de la indicación detectable de viabilidad indica que el organismo de interés no está presente en la muestra, y en el que la ausencia de la indicación detectable de viabilidad indica que el organismo de interés puede estar presente en la muestra.

En el presente documento también se divulga un microorganismo aislado que no es sensible a al menos un agente antimicrobiano que comprende: el agente antimicrobiano, en el que el agente antimicrobiano puede destruir, inhibir el crecimiento, o de otro modo alterar la viabilidad de uno o más microorganismos; al menos un compuesto que comprende una molécula oligonucleotídica que selecciona al menos una secuencia de ácido nucleico específica que está implicada con un fenotipo no sensible al agente antimicrobiano; y un indicador, opcionalmente en el que el indicador es un marcador, una señal detectable, una molécula de ácido nucleico indicadora que codifica una molécula indicadora, o una partícula de transducción no replicativa (NRTP) que comprende una molécula de ácido nucleico indicadora que codifica una molécula indicadora.

En el presente documento también se divulga un procedimiento para producir un microorganismo divulgado en el presente documento, que comprende: poner en contacto el microorganismo con un agente antimicrobiano; poner en contacto el microorganismo con un compuesto que comprende una molécula oligonucleotídica; y poner en contacto el microorganismo con un indicador.

En el presente documento también se divulga un cultivo celular *in vitro* que comprende un microorganismo que no es sensible a al menos un agente antimicrobiano, y que comprende además: el agente antimicrobiano, en el que el agente antimicrobiano puede destruir, inhibir el crecimiento, o de otro modo alterar la viabilidad de uno o más microorganismos; al menos un compuesto que comprende una molécula oligonucleotídica que selecciona al menos una secuencia de ácido nucleico específica que está implicada con un fenotipo no sensible al agente antimicrobiano; y un indicador, opcionalmente en el que el indicador es un marcador, una señal detectable, una molécula de ácido nucleico indicadora que codifica una molécula indicadora, o una partícula de transducción no replicativa (NRTP) que comprende una molécula de ácido nucleico indicadora que codifica una molécula indicadora.

En el presente documento también se divulga un procedimiento de producción de un cultivo celular, que comprende poner en contacto el cultivo con un agente antimicrobiano; poner en contacto el cultivo con un compuesto que comprende una molécula oligonucleotídica; y poner en contacto el cultivo con un indicador.

En el presente documento también se divulga un organismo aislado que comprende: al menos un compuesto que comprende una molécula oligonucleotídica que selecciona al menos una secuencia de ácido nucleico específica que está implicada con la viabilidad del organismo, en el que la secuencia de ácido nucleico específica es única para el organismo; y un indicador, opcionalmente en el que el indicador es un marcador, una señal detectable, una molécula de ácido nucleico indicadora que codifica una molécula indicadora, o una partícula de transducción no replicativa (NRTP) que comprende una molécula de ácido nucleico indicadora que codifica una molécula indicadora.

En el presente documento también se divulga un procedimiento de producción de un organismo aislado, que comprende: poner en contacto el organismo con un compuesto que comprende una molécula oligonucleotídica; y poner en contacto al organismo con un indicador.

En el presente documento también se divulga un cultivo celular *in vitro* que comprende un organismo y que comprende además: al menos un compuesto que comprende una molécula oligonucleotídica que selecciona al menos una secuencia de ácido nucleico específica que está implicada con la viabilidad del organismo, en el que la secuencia de ácido nucleico específica es única al organismo; y un indicador, opcionalmente en el que el indicador

es un marcador, una señal detectable, una molécula de ácido nucleico indicadora que codifica una molécula indicadora, o una partícula de transducción no replicativa (NRTP) que comprende una molécula de ácido nucleico indicadora que codifica una molécula indicadora.

- 5 En el presente documento también se divulga un procedimiento de producción de un cultivo celular *in vitro*, que comprende: poner en contacto el cultivo con un compuesto que comprende una molécula oligonucleotídica; y poner en contacto el cultivo con un indicador.

10 Los aspectos particulares de todos los kits y todos los microorganismos aislados divulgados en el presente documento son como sigue: En algunos aspectos, el compuesto es un APN (ácido peptidonucleico). En algunos aspectos, el compuesto es un péptido-APN. En algunos aspectos, el péptido facilita la captación de la molécula oligonucleotídica en el microorganismo. En algunos aspectos, el APN selecciona una región de inicio de la traducción (TIR) de un gen. En algunos aspectos, el péptido-APN selecciona un gen de resistencia a la β -lactama o un gen de resistencia a la vancomicina. En algunos aspectos, el péptido-APN selecciona un gen *bla_{KPC-3}*, un gen *bla_{NDM-1}*, un gen *bla_{SHV-18}*, un gen *vanC*.

15 En algunos aspectos, la molécula oligonucleotídica es un ARN CRISPR (ARNcr). En algunos aspectos, el ARNcr se expresa a partir de un sistema CRISPR/Cas dentro del microorganismo. En algunos aspectos, el ARNcr selecciona un gen *bla_{NDM-1}* o un gen *bla_{SHV-18}* o transcrito.

20 En algunos aspectos, la molécula oligonucleotídica es un oligonucleótido antisentido.

25 En algunos aspectos, el compuesto es un ARN bicatenario (ARNbc) que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en el que la hebra antisentido comprende la molécula antisentido. En algunos aspectos, cada hebra del ARNbc tiene una longitud de 8 a 49 nucleótidos (por ejemplo, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos de longitud), y opcionalmente en el que cada hebra comprende un T o TT en 3'. En algunos aspectos, al menos una de las hebras comprende al menos un nucleótido químicamente modificado. En algunos aspectos, el nucleótido químicamente modificado es un nucleótido modificado en 2'. En algunos aspectos, el nucleótido modificado en 2' es un nucleótido sustituido con 2'-metilo o un nucleótido sustituido con 2'-amino.

30 En algunos aspectos, la secuencia de ácido nucleico específica es una secuencia de ADN o una secuencia de ARNm.

35 En algunos aspectos, la presencia de la indicación detectable de viabilidad indica que el microorganismo es viable. En algunos aspectos, la ausencia de la indicación detectable de viabilidad indica que el microorganismo no es viable.

40 En algunos aspectos, el microorganismo es un procariota o un eucariota.

En algunos aspectos, la indicación detectable de viabilidad es el crecimiento del microorganismo, un marcador asociado con el microorganismo o una señal detectable asociada con el microorganismo.

45 En algunos aspectos, el al menos un microorganismo comprende una molécula de ácido nucleico indicadora que codifica una molécula indicadora.

En algunos aspectos, los kits comprenden además una partícula de transducción no replicativa (NRTP) que comprende una molécula de ácido nucleico indicadora que codifica una molécula indicadora.

50 En algunos aspectos, la NRTP se produce a partir de un sistema de encapsidación de células bacterianas que comprende una célula de bacteria huésped, una primera construcción de ácido nucleico en el interior de la célula de bacteria huésped que comprende un genoma de bacteriófago que tiene una secuencia de sitio de inicio de encapsidación no funcional, en la que la secuencia de sitio de inicio de encapsidación no funcional evita la encapsidación del genoma de bacteriófago en la NRTP, y una segunda construcción de ácido nucleico en el interior de la célula de bacteria huésped y separada de la primera construcción de ácido nucleico que comprende la molécula de ácido nucleico indicadora que tiene un gen indicador y una secuencia de sitio de inicio de encapsidación funcional para facilitar la encapsidación de un replicón de la molécula de ácido nucleico indicadora en la NRTP, en la que la segunda secuencia de sitio de inicio de encapsidación funcional en la segunda construcción de ácido nucleico complementa la secuencia de sitio de inicio de encapsidación no funcional en el genoma de bacteriófago en la primera construcción de ácido nucleico.

55 En algunos aspectos, la molécula de ácido nucleico indicadora es un gen que codifica una molécula emisora de luz. En algunos aspectos, el gen es un gen luciferasa.

60 En algunos aspectos, detectar la indicación detectable de viabilidad comprende detectar una presencia o ausencia de la molécula indicadora. En algunos aspectos, detectar la indicación detectable de viabilidad comprende detectar

una presencia o ausencia de una reacción mediada por la molécula indicadora. En otros aspectos, detectar la indicación detectable de viabilidad comprende detectar una conformación, actividad u otra característica de la molécula indicadora (por ejemplo, fluorescencia o capacidad para unirse a o de otro modo interactuar con otra molécula).

En algunos aspectos, el microorganismo es de la familia *Enterobacteriaceae*, el género *Enterococcus* o el género *Candida*.

En algunos aspectos, el microorganismo es del género *Escherichia*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Helicobacter*, *Rickettsia*, *Haemophilus*, *Xenorhabdus*, *Acinetobacter*, *Bordetella*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Actinobacillus*, *Pasteurella*, *Vibrio*, *Legionella*, *Bacillus*, *Calothrix*, *Methanococcus*, *Stenotrophomonas*, *Chlamydia*, *Neisseria*, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* o *Yersinia*.

En algunos aspectos, el antimicrobiano es una β -lactama o vancomicina.

En algunos aspectos, el agente antimicrobiano es del grupo o clase de penicilinas, cefalosporina, carbapenems, aminoglucósidos, fluoroquinolona, lincosamida, polimixina, tetraciclina, macrólido, oxazolidinona, estreptograminas, rifamicina o glucopéptido.

En algunos aspectos, el antimicrobiano es ampicilina, ampicilina-sulbactam, piperacilina-tazobactam, oxacilina, penicilina, cefazolina, cefepima, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, ceftarolina fosamilo, ertapenem, imipenem, meropenem, amikacina, gentamicina, sinergia gentamicina, sinergia estreptomycin, tobramicina, ciprofloxacina, levofloxacina, clindamicina, colistina, daptomicina, doxiciclina, eritromicina, linezolid, nitrofurantoína, quinupristina-dalfopristina, rifampicina, tigeciclina, trimetoprima-sulfametoxazol, fosfomicina, ceftioxitina, tetraciclina, moxifloxacino o tedizolid.

En determinados aspectos, el microorganismo es de la familia *Enterobacteriaceae* y el agente antimicrobiano es carbapenem.

En algunos aspectos, detectar la indicación detectable de viabilidad comprende observar el crecimiento del microorganismo, opcionalmente en el que el crecimiento se observa usando un cultivo celular.

En algunos aspectos, el compuesto comprende además un liposoma.

En el presente documento también se divulga una molécula de ácido peptidonucleico (APN) para inhibir la expresión de un gen implicado con la no sensibilidad a carbapenem en enterobacteriáceas, comprendiendo la molécula de APN la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

En el presente documento también se divulga una molécula de APN para inhibir la expresión de un gen implicado con la no sensibilidad a vancomicina en enterococos, comprendiendo la molécula de APN la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 6.

En el presente documento también se divulga una molécula antisentido para inhibir la expresión de una región espaciadora transcrita interna en *Candida*, comprendiendo la molécula antisentido la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Estos y otros rasgos característicos, aspectos y ventajas de la presente divulgación se entenderán mejor con respecto a la siguiente descripción y los dibujos adjuntos, donde:

La fig. 1 muestra el efecto del péptido-APN específico de *E. coli* sobre el crecimiento de *E. coli*.

La fig. 2 muestra el efecto del péptido-APN específico de *E. coli* sobre el crecimiento de *K. pneumoniae*.

La fig. 3 muestra el efecto del péptido-APN específico de *E. coli* sobre la señal de luminiscencia de *E. coli* y *K. pneumoniae* usando un indicador de luminiscencia de enterobacteriáceas.

La fig. 4 representa un ejemplo de los resultados típicos de difusión en disco de meropenem/péptido-APN para *E. coli* 1289011, 1289012, 1289014 y 1289018.

La fig. 5 representa un ejemplo de resultados de un ensayo de AST de indicador celular de péptido y APN donde + indica que el ensayo de indicador produjo un resultado positivo y - indica que el ensayo de indicador produjo un resultado negativo.

La fig. 6 representa un ejemplo de resultados de un ensayo de AST de indicador celular de CRISPR Cas9 donde +

indica que el ensayo de indicador produjo un resultado positivo y - indica que el ensayo de indicador produjo un resultado negativo.

La fig. 7 representa un ejemplo de resultados de un ensayo de indicador celular de VRE donde + indica que el ensayo de indicador produjo un resultado positivo y - indica que el ensayo de indicador produjo un resultado negativo.

La fig. 8 incluye una lista de secuencias de ITS2 que se pueden usar para producir oligonucleótidos antisentido (AON) modificados con 2'-OMe que seleccionan cada especie.

La fig. 9 representa una configuración de ensayo para la combinación de AON usada para la identificación de *Candida spp.*

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los términos usados en las reivindicaciones y la memoria descriptiva se definen como se establece a continuación, a menos que se especifique de otro modo.

Como se usa en el presente documento, "molécula de ácido nucleico indicadora" se refiere a una secuencia de nucleótidos que comprende una molécula de ADN o ARN. La molécula de ácido nucleico indicadora puede ser natural o una molécula artificial o sintética. En algunos modos de realización, la molécula de ácido nucleico indicadora es exógena a una célula huésped y se puede introducir en una célula huésped como parte de una molécula de ácido nucleico exógena, tal como un plásmido o vector. En otros modos de realización, la molécula de ácido nucleico indicadora comprende un gen indicador que codifica una molécula indicadora (por ejemplo, enzima indicadora, proteína). En algunos modos de realización, la molécula de ácido nucleico indicadora se denomina "construcción indicadora" o "construcción indicadora de ácido nucleico".

Una "molécula indicadora" o "indicador" se refiere a una molécula (por ejemplo, derivada de ácido nucleico o derivada de aminoácido) que confiere a un organismo un fenotipo detectable o seleccionable. El fenotipo detectable puede ser colorimétrico, fluorescente o luminiscente, por ejemplo. Las moléculas indicadoras se pueden expresar a partir de genes indicadores que codifican enzimas que median reacciones de luminiscencia (luxA, luxB, luxAB, luc, ruc, nluc), genes que codifican enzimas que median reacciones colorimétricas (lacZ, HRP), genes que codifican proteínas fluorescentes (GFP, eGFP, YFP, RFP, CFP, BFP, mCherry, proteínas fluorescentes en el infrarrojo cercano), moléculas de ácido nucleico que codifican péptidos de afinidad (marca His, 3X-FLAG) y genes que codifican marcadores seleccionables (ampC, tet(M), CAT, erm). La molécula indicadora se puede usar como un marcador para la captación exitosa de una molécula de ácido nucleico o secuencia exógena (plásmido) en una célula. La molécula indicadora también se puede usar para indicar la presencia de un gen diana, una molécula de ácido nucleico diana, una molécula intracelular diana o una célula. La molécula indicadora también se puede usar para indicar la viabilidad de una célula. De forma alternativa, la molécula indicadora puede ser un ácido nucleico, tal como un aptámero o una ribozima.

En algunos aspectos, la molécula de ácido nucleico indicadora está ligada de forma funcional a un promotor. En otros aspectos, el promotor se puede elegir o diseñar para contribuir a la reactividad y reactividad cruzada del sistema indicador en base a la actividad del promotor en células específicas (por ejemplo, especies específicas) y no en otras. En determinados aspectos, la molécula de ácido nucleico indicadora comprende un origen de replicación. En otros aspectos, la elección del origen de replicación puede contribuir de forma similar a la reactividad y reactividad cruzada del sistema indicador, cuando la replicación de la molécula de ácido nucleico indicadora dentro de la célula diana contribuye a o es necesaria para la producción de señales indicadoras en base a la actividad del origen de replicación en células específicas (por ejemplo, especies específicas) y no en otras. En algunos modos de realización, la molécula de ácido nucleico indicadora forma un replicón que se puede encapsidar (por ejemplo, como ADN concatámero) en un virus descendiente durante la replicación del virus. En otros aspectos, la molécula de ácido nucleico indicadora incluye factores que influyen en la transcripción o traducción del gen indicador (por ejemplo, sitios de unión a ribosomas específicos, uso de codones) que pueden contribuir de forma similar a la reactividad y reactividad cruzada del sistema indicador.

Como se usa en el presente documento, el término "transcrito" se refiere a una longitud de secuencia de nucleótidos (ADN o ARN) transcrita a partir de una secuencia molde o gen de ADN o ARN. El transcrito puede ser una secuencia de ADNc transcrito a partir de un molde de ARN o una secuencia de ARNm transcrito a partir de un molde de ADN. El transcrito puede ser codificante o no codificante de proteínas. El transcrito también se puede transcribir a partir de una construcción de ácido nucleico genomanipulado.

Como se usa en el presente documento, un "transcrito diana" se refiere a una porción de una secuencia de nucleótidos de una secuencia de ADN o un ARNm que está formada naturalmente por una célula diana incluyendo la formada durante la transcripción de un gen diana y un ARNm que es un producto del procesamiento de ARN de un producto de transcripción primaria. El transcrito diana también se puede denominar transcrito celular o transcrito natural.

"Introducir en una célula", cuando se refiere a una molécula de ácido nucleico o una secuencia exógena (por ejemplo, un plásmido, un vector, una construcción), significa facilitar la captación o absorción en la célula, como se entiende por los expertos en la técnica. La absorción o captación de construcciones o transcritos de ácido nucleico se puede producir a través de procesos celulares activos o difusivos sin ayuda, o mediante agentes o dispositivos auxiliares que incluyen por medio del uso de bacteriófagos, virus, partículas de transducción, liposomas, polímeros, partículas similares a virus y medios balísticos. El significado de este término no se limita a las células *in vitro*; una molécula de ácido nucleico también se puede "introducir en una célula", en la que la célula forma parte de un organismo vivo. En dicho caso, la introducción en la célula incluirá la entrega al organismo. Por ejemplo, para la entrega *in vivo*, las moléculas, construcciones o vectores de ácido nucleico se pueden inyectar en un sitio de tejido o administrarse sistémicamente. La introducción *in vitro* en una célula incluye procedimientos conocidos en la técnica, tales como transformación, electroporación, transducción y lipofección. En el presente documento se describen otros enfoques o se conocen en la técnica.

Un "mecanismo para el fenotipo de sensibilidad antimicrobiana" se refiere a uno o más mecanismos (por ejemplo, uno o más genes, ARNm y/o proteínas) que están implicados en impartir resistencia o sensibilidad de un organismo a un agente antimicrobiano.

Como se usa en el presente documento, el término "molécula" significa cualquier compuesto, incluyendo, pero sin limitarse a, una molécula pequeña, péptido, proteína, glúcido, nucleótido, ácido nucleico, lípido, etc., y un compuesto de este tipo puede ser natural o sintético.

Una "molécula oligonucleotídica" se refiere a una molécula que incluye ácidos nucleicos que se unen a una secuencia de ácido nucleico diana específica. Las moléculas oligonucleotídicas incluyen moléculas monocatenarias, moléculas bicatenarias, moléculas antisentido, ARN bicatenario, APN, ARN CRISPR, ADN_i, etc. Típicamente, una molécula oligonucleotídica se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, ADN o ARN). La unión de la molécula oligonucleotídica a una secuencia de ácido nucleico específica típicamente dará como resultado la inhibición de la secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, por medio de una reducción en la expresión de la secuencia de ácido nucleico. La unión de la molécula oligonucleotídica a una secuencia de ácido nucleico específica puede dar como resultado el bloqueo o la destrucción de la secuencia de ácido nucleico.

Una "molécula antisentido" se refiere a una molécula que presenta actividad antisentido al unirse específicamente a ADN o ARN para inhibir la expresión génica. Las moléculas antisentido en general incluyen un oligómero de ácido nucleico que tiene una secuencia complementaria a su ADN o ARN diana. Los ejemplos de moléculas antisentido incluyen oligonucleótidos antisentido (ADN o ARN), ácidos peptidonucleicos (APN) y oligómeros de fosforodiamidato morfolino (PMO).

Un "agente antimicrobiano" se refiere a un compuesto que puede destruir, inhibir el crecimiento o de otro modo alterar la viabilidad de uno o más microorganismos. Los agentes antimicrobianos incluyen antibióticos, antifúngicos, antiprotazoicos, antivíricos y otros compuestos.

Una "indicación detectable de viabilidad" se refiere a un indicador asociado con una célula que se puede observar y que demuestra que la célula es más o menos viable o si su viabilidad se ve afectada, por ejemplo, en relación con una célula de control, donde la célula de control puede ser la misma célula en un punto temporal diferente o una célula separada. Los ejemplos incluyen una o más señales, uno o más indicadores, uno o más marcadores, crecimiento o falta del mismo, luz (por ejemplo, luz emitida por una luciferasa) o falta de la misma, etc.

Un indicador basado en virus o un indicador basado en bacteriófagos se puede referir a un virus o bacteriófago, respectivamente, que se ha modificado de modo que se haya insertado un gen indicador en su genoma.

Una "partícula de transducción" se refiere a un virus que puede entregar una molécula de ácido nucleico no vírico a una célula. El virus puede ser un bacteriófago, adenovirus, etc. Un indicador de partículas de transducción puede ser sinónimo de un indicador basado en virus o bacteriófagos.

Una "partícula de transducción no replicativa" (NRTP) se refiere a un virus que puede entregar una molécula de ácido nucleico no vírico a una célula, pero no encapsida su propio genoma vírico replicado en la partícula de transducción. El virus puede ser un bacteriófago, un adenovirus, etc. Las NRTP y los procedimientos de preparación de las mismas se describen en detalle en el documento PCT/US2014/026536, presentado el 13 de marzo de 2014.

Un "plásmido" es una pequeña molécula de ADN que está físicamente separada de, y se puede replicar independientemente de, el ADN cromosómico dentro de una célula. Los plásmidos, que se encuentran más comúnmente como pequeñas moléculas circulares de ADN bicatenario en bacterias, a veces están presentes en arqueas y organismos eucariotas. Los plásmidos se consideran replicones, que se pueden replicar de forma autónoma dentro de un huésped adecuado.

Un "vector" es una molécula que incluye ácidos nucleicos que se pueden usar como vehículo para transportar

material genético a una célula, donde se puede integrar, replicar y/o expresar.

Un "virus" es un pequeño agente infeccioso que se replica solo en el interior de las células vivas de otros organismos. Las partículas de virus (conocidas como viriones) incluyen dos o tres partes: i) el material genético hecho de moléculas de ADN o bien ARN que transportan información genética; ii) una cubierta proteica que protege este ácido nucleico; y en algunos casos, iii) una envoltura de lípidos que rodea la cubierta proteica. Cuando se refiere a un virus que infecta bacterias, los términos "virus", "fago" y "bacteriófago" se usan de manera intercambiable en la memoria descriptiva.

"Unión específica" se refiere a la capacidad de dos moléculas para unirse entre sí en lugar de unirse a otras moléculas en el entorno. Típicamente, la "unión específica" discrimina sobre la unión accidental en una reacción en al menos dos veces, más típicamente en al menos 10 veces, a menudo al menos 100 veces o más. Típicamente, la afinidad o avidez de una reacción de unión específica, como se cuantifica por una constante de disociación, es de aproximadamente 10^{-7} M o más fuerte (por ejemplo, de aproximadamente 10^{-8} M, 10^{-9} M o incluso más fuerte).

El término "mejorar" se refiere a cualquier resultado terapéuticamente beneficioso en el tratamiento de un estado de enfermedad, por ejemplo, un estado de enfermedad, que incluye profilaxis, disminución de la gravedad o progresión, remisión o cura de la misma.

El término "*in situ*" se refiere a procesos que se producen en una célula viva que crece separada de un organismo vivo, por ejemplo, que crece en cultivo hístico.

El término "*in vivo*" se refiere a procesos que se producen en un organismo vivo.

El término "mamífero" como se usa en el presente documento incluye tanto humanos como no humanos e incluye, pero no se limita a, seres humanos, primates no humanos, caninos, felinos, murinos, bovinos, equinos y porcinos.

El término "microorganismo" significa especies microbianas procariotas y eucariotas de los dominios *Archaea*, *Bacteria* y *Eucarya*, este último incluye levaduras y hongos filamentosos, protozoos, algas o protistas superiores. Los términos "células microbianas" y "microbios" se usan de manera intercambiable con el término microorganismo.

Los términos "marcador" o "marcadores" engloban, sin limitación, lípidos, lipoproteínas, proteínas, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, péptidos, ácidos nucleicos, genes y oligonucleótidos, conjuntamente con sus complejos relacionados, metabolitos, mutaciones, variantes, polimorfismos, modificaciones, fragmentos, subunidades, productos de degradación, elementos y otros analitos o medidas derivadas de muestras. Un marcador también puede incluir proteínas mutadas, ácidos nucleicos mutados, variaciones en los números de copias y/o variantes de transcritos.

El término "muestra" puede incluir una única célula o múltiples células o fragmentos de células o una alícuota de líquido corporal, tomados de un entorno o sujeto, por medios que incluyen venopunción, excreción, eyaculación, masaje, biopsia, aspiración con aguja, muestra de lavado, raspado, incisión quirúrgica, frotis o intervención u otros medios conocidos en la técnica.

El término "sujeto" engloba una célula, tejido u organismo, humano o no humano, ya sea *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*, masculino o femenino.

"G", "C", "A" y "U" en general representan cada uno un nucleótido que contiene guanina, citosina, adenina y uracilo como base, respectivamente. "T" y "dT" se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a un desoxirribonucleótido en el que la nucleobase es timina, por ejemplo, desoxirribotimina. Sin embargo, se entenderá que el término "ribonucleótido" o "nucleótido" o "desoxirribonucleótido" también se puede referir a un nucleótido modificado, como se detalla más adelante, o a un resto de reemplazo sustituto. El experto en la técnica sabe muy bien que la guanina, la citosina, la adenina y el uracilo se pueden reemplazar por otros restos sin alterar sustancialmente las propiedades de emparejamiento de bases de un oligonucleótido que comprende un nucleótido que lleva dicho resto de reemplazo. Por ejemplo, sin limitación, un nucleótido que comprende inosina como su base se puede emparejar con nucleótidos que contienen adenina, citosina o uracilo. Por lo tanto, los nucleótidos que contienen uracilo, guanina o adenina se pueden reemplazar en las secuencias de nucleótidos por un nucleótido que contiene, por ejemplo, inosina. Las secuencias que comprenden dichos restos de reemplazo son modos de realización.

Como se usa en el presente documento, el término "complementario", cuando se usa para describir una primera secuencia de nucleótidos en relación con una segunda secuencia de nucleótidos, se refiere a la capacidad de un oligonucleótido o polinucleótido que comprende la primera secuencia de nucleótidos para hibridarse y formar una estructura dúplex bajo determinadas condiciones con un oligonucleótido o polinucleótido que comprende la segunda secuencia de nucleótidos, como entenderá el experto en la técnica. Las secuencias complementarias también se describen como unidas entre sí y caracterizadas por afinidades de unión.

Por ejemplo, una primera secuencia de nucleótidos se puede describir como complementaria a una segunda secuencia de nucleótidos cuando las dos secuencias hibridan (por ejemplo, hibridación) en condiciones de hibridación rigurosas. Las condiciones de hibridación incluyen temperatura, fuerza iónica, pH y concentración de disolvente orgánico para las etapas de hibridación y/o lavado. El término condiciones de hibridación rigurosas se refiere a condiciones bajo las que una primera secuencia de nucleótidos hibridará preferentemente a su secuencia diana, por ejemplo, una segunda secuencia de nucleótidos, y en menor medida a, o en absoluto a, otras secuencias. Las condiciones de hibridación rigurosas dependen de la secuencia y son diferentes bajo diferentes parámetros ambientales. En general, se seleccionan las condiciones de hibridación rigurosas para que sean aproximadamente 5 °C más bajas que el punto de fusión térmico (T_f) para la secuencia de nucleótidos a una fuerza iónica y pH definidos. La T_f es la temperatura (bajo una fuerza iónica y pH definidos) a la que un 50 % de las primeras secuencias de nucleótidos hibrida con una secuencia diana perfectamente emparejada. Una guía extensa para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra, por ejemplo, en Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes*, parte I, cap. 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier, N.Y. ("Tijssen"). Se pueden aplicar otras condiciones, tales como las condiciones fisiológicamente pertinentes que se pueden encontrar en el interior de un organismo. El experto en la técnica podrá determinar el conjunto de condiciones más apropiadas para una prueba de complementariedad de dos secuencias de acuerdo con la aplicación final de los nucleótidos hibridados.

Esto incluye el emparejamiento de bases del oligonucleótido o polinucleótido que comprende la primera secuencia de nucleótidos con el oligonucleótido o polinucleótido que comprende la segunda secuencia de nucleótidos en toda la longitud de la primera y segunda secuencia de nucleótidos. Dichas secuencias se pueden denominar "completamente complementarias" entre sí en el presente documento. Sin embargo, cuando una primera secuencia se denomina "sustancialmente complementaria" con respecto a una segunda secuencia en el presente documento, las dos secuencias pueden ser completamente complementarias, o pueden formar uno o más, pero en general no más de 4, 3 o 2 pares de bases con emparejamiento erróneo tras la hibridación, mientras que conservan la capacidad de hibridarse en las condiciones más pertinentes para su aplicación final. Sin embargo, cuando dos oligonucleótidos se diseñan para formar, tras la hibridación, uno o más salientes monocatenarios, dichos salientes no se considerarán emparejamientos erróneos con respecto a la determinación de complementariedad. Por ejemplo, un ARNbc que comprende un oligonucleótido de 21 nucleótidos de longitud y otro oligonucleótido de 23 nucleótidos de longitud, en el que el oligonucleótido más largo comprende una secuencia de 21 nucleótidos que es completamente complementaria al oligonucleótido más corto, aún se puede denominar "completamente complementario" para los propósitos descritos en el presente documento.

Las secuencias "complementarias", como se usa en el presente documento, también pueden incluir, o estar formadas en su totalidad a partir de pares de bases distintas de Watson-Crick y/o pares de bases formadas a partir de nucleótidos no naturales y modificados, en la medida en que los requisitos anteriores con respecto a su capacidad de hibridación se cumplan. Dichos pares de bases distintas de Watson-Crick incluyen, pero sin limitarse a, el emparejamiento de bases de Wobble o Hoogsteen G:U.

Los términos "complementario", "completamente complementario" y "sustancialmente complementario" en el presente documento se pueden usar con respecto al emparejamiento de bases entre dos hebras de un ARNbc, o entre la hebra antisentido de un ARNbc y una secuencia diana, entre hebras complementarias de una secuencia de ARN monocatenario o una secuencia de ADN monocatenario, como se entenderá a partir del contexto de su uso.

Como se usa en el presente documento, una "estructura dúplex" comprende dos secuencias de ácido nucleico antiparalelas y sustancialmente complementarias. Las secuencias complementarias en una construcción de ácido nucleico, entre dos transcritos, entre dos regiones dentro de un transcrito, o entre un transcrito y una secuencia diana pueden formar una "estructura dúplex". En general, la mayoría de los nucleótidos de cada hebra son ribonucleótidos, pero como se describe en detalle en el presente documento, cada una o ambas hebras también pueden incluir al menos un no ribonucleótido, por ejemplo, un desoxirribonucleótido y/o un nucleótido modificado. Las dos hebras que forman la estructura dúplex pueden ser porciones diferentes de una molécula de ARN más grande, o pueden ser moléculas de ARN separadas. Cuando las dos hebras forman parte de una molécula más grande y, por lo tanto, están conectadas por una cadena ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3' de una hebra y el extremo 5' de la otra hebra respectiva que forma la estructura dúplex, la cadena de ARN de conexión se denomina "bucle de horquilla". Cuando las dos hebras están conectadas covalentemente por medios distintos de una cadena ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3' de una hebra y el extremo 5' de la otra hebra respectiva que forma la estructura dúplex, la estructura de conexión se denomina "conector". Las hebras de ARN pueden tener el mismo número o un número diferente de nucleótidos. El número máximo de pares de bases es el número de nucleótidos en la hebra más corta del dúplex menos cualquier saliente que esté presente en el dúplex. En general, la estructura dúplex tiene entre 15 y 30 o entre 25 y 30, o entre 18 y 25, o entre 19 y 24, o entre 19 y 21, o 19, 20 o 21 pares de bases de longitud. En un modo de realización, el dúplex tiene 19 pares de bases de longitud. En otro modo de realización, el dúplex tiene 21 pares de bases de longitud. Cuando se usan dos ARNip diferentes en combinación, las longitudes del dúplex pueden ser idénticas o pueden diferir.

Como se usa en el presente documento, el término "región de complementariedad" se refiere a la región en la hebra antisentido que es sustancialmente complementaria a una secuencia, por ejemplo, una secuencia diana, como se

define en el presente documento. Cuando la región de complementariedad no es completamente complementaria a la secuencia diana, los emparejamientos erróneos son más tolerados en las regiones terminales y, si están presentes, en general están en una región o regiones terminales, por ejemplo, dentro de 6, 5, 4, 3 o 2 nucleótidos del extremo 5' y/o 3'.

El término porcentaje de "identidad" en el contexto de dos o más secuencias de ácido nucleico o polipeptídicas, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen un porcentaje especificado de nucleótidos o residuos de aminoácido que son iguales, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, como se mide usando uno de los algoritmos de comparación de secuencias descritos a continuación (por ejemplo, BLASTP y BLASTN u otros algoritmos disponibles para los expertos) o por inspección visual. Dependiendo de la aplicación, el porcentaje de "identidad" puede existir en una región de la secuencia que se está comparando, por ejemplo, en un dominio funcional, o, de forma alternativa, existir en toda la longitud de las dos secuencias que se van a comparar.

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencias. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad de secuencia para la(s) secuencia(s) de prueba en relación con la secuencia de referencia, en base a los parámetros del programa designados.

Se puede llevar a cabo la alineación óptima de secuencias para su comparación, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante la búsqueda del procedimiento de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o mediante inspección visual (véase en general Ausubel *et al.*, más abajo).

Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990). El programa informático para realizar los análisis por BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

El término "cantidad suficiente" significa una cantidad suficiente para producir un efecto deseado, por ejemplo, una cantidad suficiente para producir una señal detectable de una célula.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad que es eficaz para mejorar un síntoma de una enfermedad. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser una "cantidad profilácticamente eficaz", ya que la profilaxis se puede considerar un tratamiento.

Se debe tener en cuenta que, como se usan en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo.

Ensayos de NRTP e indicadores

Las partículas de transducción no replicativa (NRTP) y los procedimientos de producción de NRTP se describen en el documento WO 2014/160418 y en el documento US 2015/0104787. En algunos modos de realización, las NRTP se producen en un sistema de encapsidación de células bacterianas usando procedimientos basados en interrupción/complementación. Este sistema de encapsidación de partículas de transducción no replicativa se basa en la introducción de una mutación, mutación sinónima, inserción o una delección en un componente del genoma de un virus/bacteriófago que se reconoce por la maquinaria de encapsidación vírica/de fagos como el elemento a partir del que se inicia la encapsidación genómica durante la producción vírica/de fagos. Los ejemplos de un elemento de este tipo incluyen la secuencia del sitio pac de bacteriófagos de tipo pac y la secuencia del sitio cos de bacteriófagos de tipo cos.

Debido a que estos sitios de inicio de encapsidación a menudo se encuentran dentro de las regiones de codificación de genes que son esenciales para la producción de virus/bacteriófagos, la mutación, mutación sinónima, inserción o una delección se introduce de modo que el sitio pac ya no se reconoce como un sitio de inicio de encapsidación por la maquinaria de encapsidación vírica/de fagos. Al mismo tiempo, en el caso de una mutación sinónima, la mutación no interrumpe el gen en el que se codifica el sitio. Al hacer la secuencia del sitio de encapsidación no funcional, el virus/bacteriófago mutado puede experimentar un ciclo lítico, pero no puede encapsidar su ADN genómico en su unidad de encapsidación.

Se puede introducir una molécula de ácido nucleico indicadora exógena, tal como el ADN plasmídico, en una célula de bacteria huésped que se ha lisogenizado con un genoma vírico/de fago con una secuencia de sitio de inicio de

encapsidación no funcional. La molécula de ácido nucleico indicadora exógena puede incluir una secuencia de sitio de inicio de encapsidación funcional natural y, en el caso donde el gen que codifica la secuencia de sitio de inicio de encapsidación se interrumpe, la molécula de ácido nucleico indicadora exógena también incluye un gen funcional natural correspondiente. La molécula de ácido nucleico indicadora exógena se puede introducir en la célula de bacteria huésped y replicarse en la célula. Cuando el virus/bacteriófago mutado está experimentando un ciclo lítico, la maquinaria de encapsidación vírica/de fagos expresada encapsida la molécula de ácido nucleico indicadora exógena con la secuencia de sitio de inicio de encapsidación funcional en la unidad de encapsidación vírica. El genoma vírico/de fago no se encapsida en la unidad de encapsidación porque su secuencia de sitio de inicio de encapsidación se ha interrumpido.

Por lo tanto, la presente invención contempla el uso de un sistema de encapsidación de células bacterianas para encapsidar una molécula de ácido nucleico indicadora en una NRTP para su introducción en una célula, que comprende una célula de bacteria huésped, una primera construcción de ácido nucleico en el interior de la célula de bacteria huésped, que comprende un genoma de bacteriófago que tiene una secuencia de sitio de inicio de encapsidación no funcional, en el que la secuencia de sitio de inicio de encapsidación no funcional evita la encapsidación del genoma de bacteriófago en la NRTP, y una segunda construcción de ácido nucleico en el interior de la célula de bacteria huésped y separada de la primera construcción de ácido nucleico, que comprende la molécula de ácido nucleico indicadora que tiene un gen indicador y una secuencia de sitio de inicio de encapsidación funcional para facilitar la encapsidación de un replicón de la molécula de ácido nucleico indicadora en la NRTP, en el que la segunda secuencia de sitio de inicio de encapsidación funcional en la segunda construcción de ácido nucleico complementa la secuencia de sitio de inicio de encapsidación no funcional en el genoma de bacteriófago en la primera construcción de ácido nucleico.

En algunos modos de realización, las construcciones (que incluyen las NRTP) comprenden una molécula de ácido nucleico indicadora que incluye un gen indicador. El gen indicador puede codificar una molécula indicadora, y la molécula indicadora puede ser un marcador detectable o seleccionable. En determinados modos de realización, el gen indicador codifica una molécula indicadora que produce una señal detectable cuando se expresa en una célula.

En determinados modos de realización, la molécula indicadora puede ser una molécula indicadora fluorescente, tal como, pero sin limitarse a, una proteína fluorescente verde (GFP), una GFP potenciada, una proteína fluorescente amarilla (YFP), una proteína fluorescente azul verdoso (CFP), una proteína fluorescente azul (BFP), una proteína fluorescente roja (RFP) o mCherry, así como proteínas fluorescentes de infrarrojo cercano.

En otros modos de realización, la molécula indicadora puede ser una enzima que media en reacciones de luminiscencia (luxA, luxB, luxAB, luc, ruc, nluc, etc.). Las moléculas indicadoras pueden incluir una luciferasa bacteriana, una luciferasa eucariota, una enzima adecuada para la detección colorimétrica (lacZ, HRP), una proteína adecuada para la inmunodetección, tal como péptidos de afinidad (marca His, 3X-FLAG), un ácido nucleico que funciona como un aptámero o que presenta actividad enzimática (ribozima), o un marcador seleccionable, tal como un gen de resistencia a los antibióticos (ampC, tet(M), CAT, erm). Se pueden usar otras moléculas indicadoras conocidas en la técnica para producir señales para detectar ácidos nucleicos o células diana.

En otros aspectos, la molécula indicadora comprende una molécula de ácido nucleico. En algunos aspectos, la molécula indicadora es un aptámero con actividad de unión específica o que presenta actividad enzimática (por ejemplo, aptazima, ADNzima, ribozima).

En el presente documento se divulgan sistemas para la detección de enzimas intracelulares dentro de células viables que emplean moléculas de sustrato enjauladas que se pueden desenjaular por una enzima intracelular diana.

La entrega de moléculas de ácido nucleico indicadoras celulares se puede conseguir por diversos medios que incluyen electroporación, transformación química, biolística y de perlas de vidrio, transducción, transfección, vectores, conjugación, incluyendo, pero sin limitarse a, entrega por medio de vehículos de entrega de ácido nucleico, incluyendo bacteriófagos, virus, esferoplasto, liposomas, partículas similares a virus, complejos de ADN-lípidos, lipoplexos, complejos de ADN-polímero, poliplexos, etc.

Determinación del mecanismo de sensibilidad antimicrobiana y de moléculas oligonucleotídicas

En el presente documento se divulgan procedimientos para determinar la identidad de un organismo y los mecanismos que imparten una resistencia o sensibilidad antimicrobiana a un organismo. Estos procedimientos incluyen suprimir la señal, la viabilidad y/o el crecimiento producido a partir de cepas y especies de organismos específicos en sistemas indicadores celulares suprimiendo una función específica de un organismo que está ligada a la viabilidad y/o capacidad del organismo para producir un marcador/señal seleccionable o detectable.

En algunos modos de realización, la supresión de la señal, la viabilidad y/o el crecimiento producido a partir de cepas y especies de organismos específicos se consigue seleccionando el ADN o ARN en organismos distintos de la diana. La selección de las moléculas de ácido nucleico en organismos que no son la diana de un ensayo de

indicador para el propósito de suprimir la señal, la viabilidad y/o el crecimiento de estos organismos distintos de la diana se puede conseguir usando la regulación de oligonucleótidos en los que la cepa y la moléculas específicas de especie se seleccionan por diseño. En este sentido, la "selección" se consigue usando moléculas que se pueden hibridar con el ácido nucleico diana a través de una secuencia complementaria.

5

Las dianas ejemplares divulgadas en el presente documento son ejemplos no limitantes que se describen en la solicitud y se pueden extender más allá de estos ejemplos para incluir cualquier diana de secuencia a la que se puede unir una molécula oligonucleotídica incluyendo genes, transcritos, ARN no codificantes, etc.

10 Las moléculas oligonucleotídicas se pueden emplear para seleccionar una secuencia única o una pluralidad de secuencias incorporando múltiples moléculas oligonucleotídicas que seleccionan como diana a diferentes secuencias en un único ensayo. Como tal, un ensayo puede seleccionar un único gen, diferentes genes o diferentes variantes de un único gen.

15 Las moléculas oligonucleotídicas pueden ser de cualquier tipo, incluyendo, pero sin limitarse a oligonucleótidos de ácido nucleico, análogos de oligonucleótidos, imitadores de oligonucleótidos, poliamidas de unión al surco menor de ADN, APN, LNA, fosforotioato, 2'-metoxi-, 2'-metoxietoxi-, morfolino, fosforamidato, etc.

20 La entrega de moléculas oligonucleotídicas se puede conseguir por medio de la adición exógena de las moléculas o su expresión *in situ*. La entrega exógena se facilitará por la conjugación de la molécula con un péptido o por otros medios incluyendo, pero sin limitarse a, la entrega por medio de liposomas, etc. La expresión *in situ* mediada por ácido nucleico diseñado para expresar oligonucleótidos dentro de un organismo diana se puede conseguir por cualquier medio de entrega de ácido nucleico en el organismo diana, incluyendo electroporación, transformación química, biolística y de perlas de vidrio, transducción, transfección, conjugación, incluyendo, pero sin limitarse a, la entrega por medio de vehículos de entrega de ácido nucleico incluyendo bacteriófagos, virus, esferoplasto, liposomas, partículas similares a virus, complejos de ADN-lípidos, lipoplexos, complejos de ADN-polímero, poliplexos, etc.

30 La entrega de moléculas de ácido nucleico indicadoras celulares se puede conseguir por diversos medios que incluyen electroporación, transformación química, biolística y de perlas de vidrio, transducción, transfección, conjugación, incluyendo, pero sin limitarse a, entrega por medio de vehículos de entrega de ácido nucleico, incluyendo bacteriófagos, virus, esferoplasto, liposomas, partículas similares a virus, complejos de ADN-lípidos, lipoplexos, complejos de ADN-polímero, poliplexos, etc.

35 La regulación del ARN antisentido se produce en la naturaleza por medio de un proceso en el que el ARN antisentido se une a otra molécula de ARN (1). Los oligonucleótidos antisentido, el ácido peptidonucleico (APN) (2) y los oligómeros de fosfordiamidato morfolino (PMO) se han diseñado para unirse a dianas de ácido nucleico intracelular. Por ejemplo, los APN se han usado para regular la expresión génica en las células de manera análoga a la regulación del ARN antisentido natural (3-5). Las moléculas antisentido pueden ser de cualquier tipo, incluyendo, pero sin limitarse a oligonucleótidos, análogos de oligonucleótidos, imitadores de oligonucleótidos, poliamidas de unión al surco menor de ADN, APN, LNA, fosforotioato, 2'-metoxi-, 2'-metoxietoxi-, morfolino, fosforamidato, etc. La entrega de moléculas antisentido se puede facilitar por la conjugación de la molécula a un péptido o por otros medios incluyendo, pero sin limitarse a, la entrega por medio de liposomas, la conjugación a péptidos, la entrega por medio de vehículos de entrega de ADN diseñados para transcribir moléculas antisentido, etc. Los péptido-APN son APN que se conjugan con un péptido. Los péptido-APN se han usado para seleccionar moléculas de ARN en bacterias donde el péptido se diseña para facilitar la captación de la molécula en las bacterias (6).

50 Las moléculas antisentido se pueden diseñar para seleccionar cepas y especies de bacterias específicas (7). Analizando el genoma de las bacterias de interés, se puede identificar un conjunto de dianas de moléculas antisentido que seleccionan genes esenciales de una manera en que la selección sea específica para una especie de bacteria y no para otra. De esta manera, la molécula antisentido se puede ajustar para suprimir especies individuales de bacterias.

55 Los oligonucleótidos y los oligómeros se pueden entregar en las células por medio de una variedad de mecanismos que facilitan la captación en las células, incluyendo los liposomas y la conjugación a péptidos. Los péptido-APN son APN que se conjugan con un péptido. Los péptido-APN se han usado para seleccionar moléculas de ARN en bacterias, de modo que el péptido se diseña para facilitar la captación de la molécula en las bacterias (Good, L. y P.E. Nielsen, documento WO2002/0279467).

60 Las moléculas antisentido se pueden diseñar para seleccionar cepas y especies de bacterias específicas (Mondhe, M., *et al.*, *Species-Selective Killing of Bacteria by Antimicrobial Peptide-PNAs*. PLoS ONE, 2014. 9(2): p. e89082). Analizando el genoma de las bacterias de interés, se puede identificar un conjunto de dianas de moléculas antisentido que seleccionan genes esenciales de una manera en que la selección sea específica para una especie de bacteria y no para otra. De esta manera, la molécula antisentido se puede ajustar para suprimir especies individuales de bacterias.

65

En un modo de realización, un sistema se diseña para atenuar la expresión de un fenotipo diana tal como la expresión de un mecanismo de resistencia antimicrobiana. Las moléculas oligonucleotídicas se pueden diseñar para seleccionar los transcritos de genes de resistencia de modo que un microorganismo que normalmente es resistente a un compuesto antimicrobiano se vuelva sensible al compuesto tras la exposición al oligonucleótido seleccionado como diana.

Además de emplear oligonucleótidos exógenos, los oligonucleótidos seleccionados como diana se pueden producir *in vivo* a partir del ADN entregado en un organismo diana. En este modo de realización, el ADN se diseña para transcribir moléculas de ARN antisentido diseñadas para seleccionar transcritos de interés.

En otro modo de realización, se puede emplear la interferencia de ARN (ARNi); un proceso en el que los fragmentos de ARN bicatenario (ARNbc, también llamado ARN interferente pequeño (ARNip)) desencadenan la inactivación génica catalíticamente mediada, más típicamente seleccionando el complejo silenciador inducido por ARN (RISC) para unirse y degradar el ARNm. La hibridación de una hebra de la molécula de ARNbc a ARNm o ADN puede dar como resultado una degradación rápida de ARN dúplex, dúplex de ARN/ADN híbrido o ARN dúplex que se asemeja al ARNt precursor por ribonucleasas en la célula, o por escisión del ARN diana por el mismo compuesto antisentido.

La vía de ARNi se encuentra en muchos eucariotas y se inicia por la enzima Dicer, que escinde moléculas de ARN bicatenario (ARNbc) largo en fragmentos bicatenarios cortos de ~20 nucleótidos que se llaman ARNip. Cada ARNip se desenrolla en dos ARN monocatenarios (ARNmc), a saber, la hebra pasajera y la hebra guía. La hebra pasajera se degrada y la hebra guía se incorpora al complejo silenciador inducido por ARN (RISC). En el silenciamiento génico postranscripcional, la base de la hebra guía se empareja con una secuencia complementaria en una molécula de ARN mensajero, y la escisión se induce por una proteína llamada Argonauta, el componente catalítico del complejo RISC.

Las interacciones entre un oligonucleótido y un transcrito diana pueden depender de emparejamientos de bases entre bucles presentes en ambos transcritos (por ejemplo, "complejos bucle-bucle (*kissing complexes*)"), o entre un bucle y una región monocatenaria (mc). En algunos casos, la formación del complejo bucle-bucle es suficiente para mediar el efecto deseado de la interacción, y en otros casos, la propagación de los contactos primarios dará lugar a una interacción que da como resultado el efecto deseado.

Otro modo de realización que emplea la producción *in vivo* de oligonucleótidos seleccionados como diana se basa en el sistema de grupos de repeticiones palindrómicas cortas en intervalos regulares (CRISPR)/asociadas a CRISPR (Cas), que se encuentran en las bacterias como defensa frente al ADN exógeno (8). El sistema CRISPR/Cas se puede diseñar para seleccionar una secuencia de ADN de interés al incorporar secuencias diana que se transcriben y procesan en ARN CRISPR (ARNcr). El sistema también expresa un ARN pequeño transactivador (ARNtracr) y un complejo formado por Cas9, ARNtracr y ARNcr permiten que la endonucleasa Cas9 forme roturas bicatenarias en secuencias de ADN diana seleccionadas por el ARNcr. En este modo de realización, los oligonucleótidos de ARNcr se pueden diseñar en la dirección sentido o antisentido y, en lugar de seleccionar los transcritos, este sistema selecciona el ADN y, por tanto, se diseña para seleccionar secuencias de ADN específicas de organismos o genes de resistencia a los antibióticos codificados en el cromosoma o episómicamente.

Se han empleado técnicas similares a las descritas anteriormente en la técnica para el propósito de desarrollar agentes terapéuticos frente a infecciones por microorganismos (9-10). Como se describe adicionalmente en el presente documento, estas técnicas se usan para el propósito de habilitar sistemas de detección bacteriana y para determinar mecanismos específicos ligados a un(os) fenotipo(s) de resistencia antimicrobiana o sensibilidad.

Diseñando una molécula oligonucleotídica para seleccionar la secuencia de ADN o ARN específica de un gen de resistencia, se puede determinar el mecanismo específico ligado a un fenotipo. Por ejemplo, se realiza un AST en un microorganismo, si se determina que el microorganismo es resistente a un antimicrobiano en cuestión y es sensible al mismo antimicrobiano cuando está en presencia de la molécula oligonucleotídica, entonces este resultado indica que el gen antimicrobiano específico para el que se diseña que seleccione la molécula oligonucleotídica está ligado al fenotipo de resistencia a los antimicrobianos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: eliminación de la señal de *E. coli* en un indicador de enterobacteriáceas.

En este ejemplo, se usó un sistema indicador de enterobacteriáceas junto con un péptido-APN que selecciona *E. coli*. Sin el uso de péptido-APN, el sistema indicador de enterobacteriáceas produce una señal detectable de enterobacteriáceas, que incluye tanto *K. pneumoniae* como *E. coli*. Cuando se añadió el péptido-APN, el sistema indicador de enterobacteriáceas produjo una señal de enterobacteriáceas, excluyendo *E. coli*. El sistema se puede emplear con y sin el oligonucleótido y la presencia del organismo diana se puede determinar mediante la observación de que una señal está presente sin el péptido-APN y no está presente con el péptido-APN. De forma alternativa, en una muestra que puede contener *E. coli* y *K. pneumoniae*, la ejecución del ensayo en presencia del oligonucleótido permite determinar si *K. pneumoniae* está presente en la muestra. En este ejemplo, una muestra que

solo contiene *K. pneumoniae* producirá señal ya sea que *E. coli* también está presente en la muestra o no, mientras que una muestra que solo contiene *E. coli* no producirá una señal. De esta manera, se puede usar el péptido-APN para lograr la detección bacteriana específica de especie.

Se diseñó un péptido-APN para seleccionar un gen esencial de *E. coli* siguiendo (7). En resumen, se analizaron los genomas de *E. coli* y *K. pneumoniae* para identificar homólogos de genes esenciales presentes en la especie de interés. A partir de este análisis, se compiló una lista de la región de inicio de la traducción (TIR) para cada gen, es decir, veinte pares de bases (de -10 a +10 bases en relación con el codón de iniciación) de las TIR en los genomas. Las TIR de 20 de pares de bases de los homólogos de genes se alinearon y se determinó el número de emparejamientos erróneos de pares de bases entre especies. Se usaron secuencias antisentido de 9-12 pb que seleccionan una región dentro de la TIR para diseñar los APN. Se determinó la estabilidad térmica pronosticada de los dúplex de APN/ADN y se llevó a cabo un análisis genómico de los posibles sitios de unión de los APN dentro de las especies diana usando un valor de corte de emparejamientos erróneos mayor de 2 pares de bases.

A partir de este análisis, se pueden identificar sitios de unión potenciales de cada APN para un homólogo de gen, por ejemplo, en el que un APN se une al homólogo de una especie pero no de la otra y viceversa. Se identificó que el APN específico de *E. coli* que selecciona el gen *murA* era la secuencia establecida en SEQ ID NO 1. Se espera por tanto que un péptido-APN que selecciona esta secuencia se una a *murA* de *E. coli* pero no a *murA* de *K. pneumoniae*.

El APN se conjugó con el péptido KFFKFFKFFK (SEQ ID NO 10) siguiendo (11) puesto que se ha demostrado que este péptido facilita la penetración del APN en las células bacterianas. Por tanto, la secuencia del péptido-APN que selecciona *murA* de *E. coli* es como sigue: KFFKFFKFFK-eg-ccatttagtt (APN con *murA*), donde eg es un conector de etilenglicol derivado del ácido [2-[2-(Fmoc-amino)etoxi]etoxi]acético.

Efecto de APN con *murA* sobre el crecimiento de *E. coli* y *K. pneumoniae*:

Se examinó el efecto del APN con *murA* sobre el crecimiento de *E. coli* y *K. pneumoniae*. Cuando *E. coli* y *K. pneumoniae* se cultivaron en presencia de APN con *murA*, el crecimiento de *E. coli* se alteró mientras que el crecimiento de *K. pneumoniae* no.

Los aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae* se cultivaron durante la noche en LB a 37 °C y se subcultivaron al día siguiente a una dilución 1:100 en LB recién preparado y se cultivaron hasta una densidad óptica a 600 nm (DO600) de 0,2. Se añadieron inóculos de cada cepa de aproximadamente 10⁴ UFC de cada especie de bacteria a pocillos separados de una microplaca que contenía cada uno 50 µl de LB o LB con APN con *murA* a una concentración final de 4,5 µM. Se midieron las lecturas de DO600 durante un período de 8 horas para evaluar el crecimiento de células tratadas con APN y sin tratar con APN.

La fig. 1 representa los resultados del experimento de crecimiento para *E. coli*. En presencia de APN, el crecimiento de *E. coli* se alteró. La fig. 2 representa los resultados del experimento de crecimiento para *K. pneumoniae*. En presencia de APN, el crecimiento de *K. pneumoniae* no se alteró. Los resultados indican que el APN con *murA* inhibe específicamente el crecimiento de *E. coli* y no inhibe el crecimiento de *K. pneumoniae*.

Efecto de APN con *murA* sobre la luminiscencia de un indicador de enterobacteriáceas cuando se someten a prueba *E. coli* y *K. pneumoniae*:

Los aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae* se cultivaron durante la noche en LB a 37 °C y se subcultivaron al día siguiente a una dilución 1:100 en LB recién preparado y se cultivaron hasta una DO600 de 0,2. Se añadieron inóculos de cada cepa de aproximadamente 10⁴ UFC de cada especie de bacteria a pocillos separados de una microplaca que contenía cada uno 50 µl de LB o LB con APN con *murA* a una concentración final de 4,5 µM. Posteriormente, todos los pocillos recibieron 100 µl de una partícula de transducción no replicativa indicadora-luminiscente de enterobacteriáceas como se describe en el documento PCT/US2014/026536, ejemplo 1 y las muestras se incubaron a 30 °C durante 2 horas. Después del período de incubación, se sometieron a ensayo las placas para determinar la luminiscencia usando un luminómetro de microplacas Molecular Devices SpectraMax L en el que se inyectó una solución de tridecanal en cada pocillo a medida que se tomaban las lecturas de luminiscencia.

La fig. 3 representa los resultados del experimento de luminiscencia para *E. coli* y *K. pneumoniae*. En presencia de APN, la señal de luminiscencia producida por *E. coli* se alteró, mientras que la señal de luminiscencia producida por *K. pneumoniae* no. Los resultados indican que el APN con *murA* inhibe específicamente la producción de señales de *E. coli* y no inhibe la producción de señales de *K. pneumoniae*, lo que demuestra la capacidad de distinguir *E. coli* de *K. pneumoniae* usando un sistema indicador de enterobacteriáceas y un péptido-APN específico de *E. coli*.

Ejemplo 2: determinación de carbapenemasa específica ligada a un fenotipo CRE por medio de pruebas de difusión en disco antimicrobiana de AST usando péptido-APN.

En este ejemplo, se realiza la prueba de difusión en disco antimicrobiana de AST con la adición de péptido-APN en

una cepa de CRE para determinar el mecanismo específico ligado al fenotipo CRE. Sin el uso de péptido-APN, la CRE presenta un resultado resistente a carbapenem. Cuando se añade el péptido-APN diseñado para seleccionar un gen de carbapenemasa específico y el resultado de AST cambia a un fenotipo sensible a carbapenem (CSE), esto indica que el gen de carbapenemasa seleccionado por el péptido-APN es el mecanismo ligado al fenotipo CRE.

5 De esta manera, se puede usar el péptido-APN para determinar el mecanismo específico ligado al fenotipo de resistencia antimicrobiana de la bacteria.

Un péptido-APN se diseña para seleccionar los transcritos *bla_{KPC-3}* y *bla_{NDM-1}* de *E. coli*. En resumen, se analizan las secuencias de genes de los genes diana en *E. coli* 1289012 y *E. coli* 1289014, dos aislados clínicos de *E. coli* que expresan los genes *bla_{KPC-3}* y *bla_{NDM-1}*, respectivamente, para identificar la secuencia de la TIR para cada gen (tabla 1, SEQ ID NO 11 y 12). Las secuencias antisentido de 9-12 pb que seleccionan una región dentro de la TIR se usan para diseñar los APN potenciales. A partir de este análisis, se pueden identificar sitios de unión potenciales para APN para seleccionar los genes *bla_{KPC-3}* (SEQ ID NO 2) y *bla_{NDM-1}* (SEQ ID NO 3).

15 El APN se conjuga con el péptido KFFKFFKFFK siguiendo (11) puesto que se ha demostrado que este péptido facilita la penetración del APN en las células bacterianas.

Prueba de difusión en disco que somete a prueba el AST:

20 Las pruebas de difusión en disco se llevan a cabo siguiendo CLSI-M02 (12) y se interpretan siguiendo M100-S22 (13). En resumen, para someter a prueba cada bacteria para determinar la sensibilidad al meropenem, se inoculan placas de agar Mueller-Hinton (MHA) usando un hisopo de algodón estéril sumergido en una suspensión de un cultivo de bacterias a un estándar de McFarland de 0,5 de modo que toda la superficie del MHA esté cubierta. Se aplica un disco de 10 µg de meropenem a la superficie de la placa inoculada y se incuba la placa a 35 °C en aire ambiente durante de 16 a 18 horas. Se determina que la cepa de bacterias es sensible al meropenem si el diámetro de la zona de inhibición alrededor del disco de meropenem es ≥23 mm y resistente al meropenem si el diámetro de la zona es ≤19 mm.

30 *E. coli* 1289012, 1289014, una *E. coli* 1289018 de control que es CSE y no expresa una carbapenemasa, y *E. coli* 1289011, una cepa de control que es CRE y que expresa una carbapenemasa VIM se someten a prueba para determinar la resistencia al meropenem por medio de difusión en disco. La segunda fila de la fig. 4 representa los resultados típicos de difusión en disco de meropenem para las cepas de *E. coli* donde 1289011, 1289012 y 1289014 son CRE y 1289018 es CSE.

35 Para determinar el mecanismo específico ligado al fenotipo resistente a meropenem, se llevan a cabo pruebas de difusión en disco con discos de 10 µg de meropenem incluyendo *bla_{NDM-1}* y *bla_{KPC-3}*-péptido-APN. Si el péptido-APN inhibe la carbapenemasa específica ligada a la resistencia al meropenem en la cepa de *E. coli*, entonces el diámetro de la zona observado disminuirá cuando se compara con el diámetro de la zona de la cepa cuando se expone a un disco que contiene solo meropenem.

40 La fig. 4 representa los resultados típicos de difusión en disco de meropenem/péptido-APN para *E. coli* 1289011, 1289012, 1289014 y 1289018. En la figura, 401 representa una vista superior de una placa de Petri que contiene MHA y un césped de bacterias cultivadas en la superficie del agar, 402 representa un disco que se ha dispuesto en la superficie de 401, y 403 indica el diámetro de la zona que resulta en el césped de bacterias debido al contenido del disco 402.

45 La fila superior de la figura demuestra que el péptido-APN solo no tiene un efecto inhibitorio sobre las cepas de *E. coli*. La fila 3 demuestra que 1289011 es CRE puesto que el diámetro de la zona es ≥23 mm y el mecanismo ligado con el fenotipo CRE no es *bla_{KPC-3}* puesto que en presencia de péptido-APN con *bla_{KPC-3}*, el diámetro de la zona no se reduce cuando se compara con el de meropenem solo, 1289012 es CRE, donde *bla_{KPC-3}* es el mecanismo ligado al fenotipo CRE puesto que el diámetro de la zona se reduce, y 1289014 es CRE y el mecanismo ligado al fenotipo CRE no es *bla_{KPC-3}* puesto que el diámetro de la zona no se reduce. La fila 4 demuestra que 1289011 es CRE puesto que el diámetro de la zona es ≥23 mm y el mecanismo ligado al fenotipo CRE no es *bla_{NDM-1}* puesto que en presencia de péptido-APN con *bla_{NDM-1}*, el diámetro de la zona no se reduce cuando se compara con el de meropenem solo, 1289012 es CRE y el mecanismo ligado al fenotipo CRE no es *bla_{NDM-1}* puesto que el diámetro de la zona no se reduce, y 1289014 es CRE donde *bla_{NDM-1}* es el mecanismo ligado al fenotipo CRE puesto que el diámetro de la zona se reduce.

60 A partir de estos resultados, se puede determinar que el mecanismo subyacente ligado a la resistencia al carbapenem de cada cepa de *E. coli* es *bla_{KPC-3}* para 1289012, *bla_{NDM-1}* para 1289014, y ni *bla_{KPC-3}* ni *bla_{NDM-1}* en 1289011.

Ejemplo 3: determinación de carbapenemasa específica ligada a un fenotipo CRE por medio de pruebas de indicador celular de AST usando péptido-APN.

65 En este ejemplo, la técnica de AST descrita en el ejemplo 2 se extiende a las pruebas de AST en base a ensayos de

indicador celular. Se emplea un indicador celular de enterobacteriáceas como se describe en el documento PCT/US2014/026536, ejemplo 1 y el ensayo se ejecuta como sigue. En resumen, se preparan los cultivos de *E. coli* 1289011, 1289012, 1289014 y 1289018 y se usan para inocular pocillos de una placa de micropocillos que contiene 50 µl de LB con 50 µl de inóculo, de modo que cada pocillo reciba 10⁴ UFC de cada cepa de bacterias. Un conjunto de pocillos no contiene ningún aditivo adicional, otro conjunto de pocillos contiene 5 µg/ml de meropenem, otro conjunto de pocillos contiene 5 µg/ml de meropenem y *blaKPC-3*-péptido-APN, otro conjunto de pocillos contiene 5 µg/ml de meropenem y *blaNDM-1*-péptido-APN, y otros dos conjuntos de pocillos contienen solo péptido-APN con *blaKPC-3* o *blaNDM-1*, respectivamente. Todos los pocillos también reciben 100 µl del indicador de enterobacteriáceas. A continuación, se incuban las muestras a 30 °C durante 2 horas y a continuación se someten a ensayo las muestras para determinar la luminiscencia como se describe en el ejemplo 1.

La fig. 5 representa los resultados del ensayo de AST de indicador celular donde + indica que el ensayo de indicador produjo un resultado positivo y - indica que el ensayo de indicador produjo un resultado negativo.

La columna 1 indica que el indicador de enterobacteriáceas da una señal positiva para todas las cepas de *E. coli*. La columna 5 demuestra que el péptido-APN no inhibe un resultado positivo en ninguna de las cepas de *E. coli*. La columna 2 indica que todas las cepas de *E. coli* son CRE excepto 1289018 puesto que todas las cepas de *E. coli* excepto 1289018 continúan dando una señal positiva en presencia de meropenem. La columna 3 demuestra que 1289011 y 1289014 son CRE y el mecanismo ligado al fenotipo CRE no es *blaKPC-3* puesto que en presencia de meropenem y péptido-APN con *blaKPC-3* continúa produciendo una señal positiva, y 1289012 es CRE donde *blaKPC-3* es el mecanismo ligado al fenotipo CRE puesto que en presencia de meropenem y péptido-APN con *blaKPC-3* ya no produce una señal positiva. La columna 4 demuestra que 1289011 y 1289012 son CRE y el mecanismo ligado al fenotipo CRE no es *blaNDM-1* puesto que en presencia de meropenem y péptido-APN con *blaNDM-1* continúa produciendo una señal positiva, y 1289014 es CRE donde *blaNDM-1* es el mecanismo ligado al fenotipo CRE puesto que en presencia de meropenem y péptido-APN con *blaNDM-1* ya no produce una señal positiva.

A partir de estos resultados, se puede determinar que el mecanismo ligado al fenotipo de resistencia a carbapenem en cada cepa de *E. coli* es *blaKPC-3* para 1289012, *blaNDM-1* para 1289014, y ni *blaKPC-3* ni *blaNDM-1* en 1289011.

Ejemplo 4: determinación de β-lactamasa específica ligada a un fenotipo no sensible por medio de pruebas de indicador celular de AST usando CRISPR/Cas9.

En este ejemplo, la técnica de AST descrita en el ejemplo 3 se modifica para determinar la β-lactamasa específica ligada a un fenotipo CRE usando un sistema CRISPR/Cas9 diseñado para seleccionar genes de β-lactamasa codificados por plásmidos.

Los indicadores celulares de enterobacteriáceas como se describe en el documento PCT/US2014/026536, ejemplo 1, se diseñan con plásmidos indicadores que también transportan sistemas CRISPR/Cas9 de guía única[14] con locus de CRISPR que transportan secuencias que seleccionan los genes *blaNDM-1* y *blaSHV-18* (tabla 1, SEQ ID NO 11 y 13), una resistencia a carbapenem y un gen de resistencia a la β-lactama extendido, respectivamente. El plásmido indicador pGWP10001 se modifica para incluir el gen *cas9*, el *ARNtracr* bajo el control del activador P_{L(tetO-1)} y un sitio de clonación de CRISPR, y los locus de CRISPR se diseñan para seleccionar los genes *blaNDM-1* (SEQ ID NO 4) y *blaSHV-18* (SEQ ID NO 5) y cada uno se clona en vectores pGWP10001/CRISPR/Cas9 para generar plásmidos indicadores que seleccionan simultáneamente los genes *blaNDM-1* y *blaSHV-18*.

Los vectores se usan para generar partículas de transducción no replicativa que transportan cada plásmido y estos se emplean en un sistema indicador para determinar el mecanismo responsable de la no sensibilidad a la β-lactama. En resumen, se preparan cultivos de *E. coli* 1289018 (*blaNDM-1*, negativo para *blaSHV-18*), 1289023 (positivo para *blaNDM-1*), 1289027 (positivo para *blaSHV*) y 1289011 (positivo para *blaVIM*) y se usan para inocular los pocillos de una placa de micropocillos que contienen 50 µl de LB con 50 µl de inóculo de modo que cada pocillo reciba 10⁴ UFC de cada cepa de bacterias. A estos pocillos se añaden 100 µl de lo siguiente: un conjunto de pocillos contiene 5 µg/ml de meropenem y NRTP que seleccionan *blaNDM-1*, otro conjunto de pocillos contiene 5 µg/ml de meropenem y *blaSHV-18*-NRTP, otro conjunto de pocillos contiene 5 µg/ml de ceftazidima y NRTP que seleccionan *blaNDM-1*, y otro conjunto de pocillos contiene 5 µg/ml de ceftazidima y *blaSHV-18*-NRTP. A continuación, se incuban las muestras a 30 °C durante 2 horas y a continuación se someten a ensayo las muestras para determinar la luminiscencia como se describe en el ejemplo 1.

La fig. 6 representa los resultados del ensayo de AST de indicador celular donde + indica que el ensayo de indicador produjo un resultado positivo y - indica que el ensayo de indicador produjo un resultado negativo.

La fila 1 indica que la cepa 1289018 se inhibe por meropenem y ceftazidima independientemente de qué NRTP se incluye en el ensayo y, por tanto, probablemente no transporte ni *blaNDM-1* ni *blaSHV-18*. La fila 2 indica que la cepa 1289023 solo se inhibe por las β-lactamas cuando está en presencia de las NRTP que seleccionan *blaNDM-1* y por tanto, probablemente transporte el gen *blaNDM-1*. La fila 3 indica que la cepa 1289027 se inhibe en presencia de meropenem y se inhibe en presencia de ceftazidima solo cuando también está en presencia de las NRTP que seleccionan *blaSHV-18* y por tanto, probablemente transporte un gen *blaSHV-18*. La fila 4 indica que la cepa 1289011 no

se inhibe por ninguna de las β -lactamas independientemente de las NRTP incluidas en el ensayo y por tanto, probablemente transporte un mecanismo de resistencia a carbapenem que no está mediado solo por *bl_{NDM-1}*.

A partir de estos resultados, se puede determinar que el mecanismo ligado al fenotipo de resistencia a la β -lactama en la cepa 1289023 es *bl_{NDM-1}* y en la cepa 1289027 es *bla_{SHV-18}*.

Ejemplo 5: ensayo de enterococos resistentes a la vancomicina.

En otro modo de realización, se puede desarrollar un ensayo para la detección de enterococos resistentes a la vancomicina (VRE).

El VRE consiste en *Enterococcus spp.* que han adquirido resistencia a la vancomicina por medio de genes de resistencia, incluyendo los genes *vanA* y *vanB*. Los *Enterococcus spp.* que transportan otros genes de resistencia a la vancomicina y expresan otros fenotipos de resistencia a la vancomicina, incluyendo el fenotipo VanC codificado por genes que incluyen *vanC-1*, *vanC-2* y *vanC-3*, sin embargo, dichos organismos no se consideran VRE.

En este ejemplo, se emplea un indicador celular de enterococos en combinación con vancomicina y moléculas antisentido que seleccionan la expresión del gen *vanC-2*. El ensayo permite la detección de VRE y la discriminación de enterococos sensible a la vancomicina (VSE) y enterococos que expresan el gen *vanC-2* y no los genes *vanA* o *vanB*. El indicador de enterococos se diseña para provocar que los *Enterococcus spp.* produzcan una señal detectable. Un péptido-APN se diseña para seleccionar los transcritos de *vanC-2*. Las secuencias de genes de los genes diana en *E. casseliflavus* 1279015, un aislado clínico que expresa el gen *vanC-2* (tabla 1, SEQ ID NO 14), se analiza para identificar la secuencia de la TIR para el gen. Las secuencias antisentido de 9-12 pb que seleccionan una región dentro de la TIR se usan para diseñar los APN potenciales. A partir de este análisis, se pueden identificar los sitios de unión potenciales de APN para seleccionar el gen *vanC-2* (SEQ ID NO 6).

En resumen, se preparan cultivos de *E. faecalis* 1259012 VSE, *E. faecalis* 1259016 VRE positivo para *vanA*, *E. faecium* 1269011 VSE, *E. faecium* 1269014 VRE positivo para *vanB* y *E. casseliflavus* 1279015 no sensible a la vancomicina positivo para *vanC-2* y se usan para inocular los pocillos de una placa de micropocillos que contienen 50 μ l de LB con 50 μ l de inóculo de modo que cada pocillo reciba 10^4 UFC de cada cepa de bacterias. Un conjunto de pocillos no contiene ningún aditivo adicional, otro conjunto de pocillos contiene 5 g/ml de vancomicina, y otro conjunto de pocillos contiene 5 μ g/ml de vancomicina y *vanC-2*-péptido-APN. Todos los pocillos también reciben 100 μ l del indicador de enterococos. A continuación, se incuban las muestras a 37 °C durante 2 horas y a continuación se someten a ensayo las muestras para determinar la luminiscencia como se describe en el ejemplo 1.

La fig. 7 representa los resultados del ensayo de indicador celular donde + indica que el ensayo de indicador produjo un resultado positivo y - indica que el ensayo de indicador produjo un resultado negativo.

La columna 1 indica que el indicador de enterococos da una señal positiva para todos los *Enterococcus spp.* La columna 4 demuestra que el péptido-APN no inhibe un resultado positivo en ninguna de las cepas. La columna 2 indica que todas las cepas que expresan un gen *van* continúan dando una señal positiva, mientras que las cepas que no transportan un gen *van* no lo hacen. La columna 3 indica que solo las cepas que expresan un gen *vanA* o *vanB* continúan dando una señal positiva. Estos resultados demuestran por tanto que se puede usar un ensayo de este tipo que combina un indicador de enterococos en combinación con vancomicina y moléculas antisentido que seleccionan la expresión del gen *vanC-2* para detectar VRE.

Ejemplo 6: ensayo de indicador de cándida.

En otro modo de realización, se puede desarrollar un ensayo de micología para la identificación de cándida.

Un sistema indicador de levadura diseñado para provocar que las células de levadura produzcan un marcador detectable o seleccionable se aplica en combinación con moléculas antisentido que seleccionan las secuencias específicas de especie. Cuando el sistema se aplica a una muestra que contiene la especie diana, la molécula antisentido provoca la supresión de la señal, la viabilidad y/o el crecimiento de la célula diana.

El plásmido indicador se basa en el vector pLG5 de *E. coli*/levadura que incluye luciferasa bacteriana de *V. harveyi* fusionada bajo el control del activador GAL1 (15, 16). Las moléculas antisentido específicas de especie se diseñan para seleccionar secuencias dentro de regiones espaciadoras transcritas internas (ITS) en levaduras. Las ITS consisten en segmentos de ARN no funcional localizados entre secuencias de ARN ribosómicos (ARNr) en un transcrito a partir del que se cortan las ITS durante la maduración del ARNr. La región espaciadora transcrita interna 2 (ITS2) en *Candida spp.* presenta especificidad de secuencia que se puede usar para identificar diferentes especies de cándida (17) y la interrupción de la maduración del ARNr por moléculas antisentido presenta efectos fungicidas (18). La fig. 8 incluye una lista de secuencias de ITS2 usadas para producir oligonucleótidos antisentido (AON) modificados con 2'-OMe que seleccionan cada especie.

Las secuencias antisentido para seleccionar cada especie se diseñan llevando a cabo una alineación de secuencia

entre las secuencias de ITS2 para cada especie. Se eligen secuencias de 9-12 pb que son únicas de cada especie en base a los datos de alineación y estos candidatos de secuencia se analizan para determinar su homología a través de los datos genómicos de una colección de organismos potencialmente de reactividad cruzada. A partir de estos análisis se pueden elegir candidatos de secuencia que son únicos para cada especie diana.

En base a este análisis, se diseñaron las secuencias de AON para *Candida albicans*, *Candida tropicalis* y *Candida parapsilosis* (SEQ ID NO 7, 8 y 9, respectivamente).

En resumen, *Candida albicans* 5120012, *Candida tropicalis* 5160014 y *Candida parapsilosis* 5150013 se transforman con el plásmido indicador y el AON por medio de una transformación celular inalterada (16). Las muestras se incuban durante un período de 24 horas y se someten a ensayo para determinar su luminiscencia usando como se describe en el ejemplo 1 (19).

La fig. 9 representa la configuración del ensayo para la combinación del AON usada para la identificación de *Candida spp.* Se muestran los resultados del ensayo de indicador celular donde + indica que el ensayo de indicador produjo un resultado positivo y - indica que el ensayo de indicador produjo un resultado negativo.

La columna 1 indica que el indicador da una señal positiva para todos los organismos sometidos a prueba en el ensayo. Las columnas 2-5 indican que cuando se incluyen AON que seleccionan especies específicas en el ensayo, las muestras que contienen esas especies a continuación producen un resultado negativo en el ensayo, mientras que las muestras que contienen especies para las que un AON que selecciona esa especie no está presente en el ensayo da como resultado un resultado positivo.

Estos resultados demuestran por tanto que un ensayo de este tipo que combina un indicador de levadura en combinación con moléculas oligonucleotídicas antisentido que seleccionan secuencias derivadas de ITS2 específicas de especie se puede usar para detectar especies específicas de cándida.

Tabla 1 Secuencias de genes de resistencia diana

<i>blaKPC-3</i>	AGCTGTAGCGGCCTGATTACATCCGGCCGCTACACCTAGCT CCACCTTCAAACAAGGAATATCGTTGATGTCACTGTATCGC CGTCTAGTTCTGCTGTCTTGTCTCTCATGGCCGCTGGCTGGC TTTTCTGCCACCGCGCTGACCAACCTCGTCGCGGAACCATT CGCTAAACTCGAACAGGACTTTGGCGGCTCCATCGGTGTGT ACGCGATGGATACCGGCTCAGGCGCAACTGTAAGTTACCGC GCTGAGGAGCGCTTCCCACTGTGCAGCTCATTCAAGGGCTT TCTTGCTGCCGCTGTGCTGGCTCGCAGCCAGCAGCAGGCCG GCTTGCTGGACACACCCATCCGTTACGGCAAAAATGCGCTG GTTCCGTGGTCACCCATCTCGGAAAAATATCTGACAACAGG CATGACGGTGGCGGAGCTGTCCGCGGCCCGCTGCAATACA GTGATAACGCCCGCCGAATTTGTTGCTGAAGGAGTTGGGC GGCCCCGGCCGGGCTGACGGCCTTCATGCGCTCTATCGGCGA TACCACGTTCCGTCTGGACCGCTGGGAGCTGGAGCTGAACT CCGCCATCCCAGGCGATGCGCGCGATACCTCATCGCCGCGC GCCGTGACGGAAAGCTTACAAAACTGACACTGGGCTCTGC ACTGGCTGCGCCGCGAGCGGCAGCAGTTTGTGATTGGCTAA AGGGAAACACGACCGGCAACCACCGCATCCGCGCGGCGGT GCCGGCAGACTGGGCAGTCGGAGACAAAACCGGAACCTGC GGAGTGTATGGCACGGCAAATGACTATGCCGTCGTCTGGCC CACTGGGCGCGCACCTATTGTGTTGGCCGTCTACACCCGGG CGCCTAACAAGGATGACAAGTACAGCGAGGCCGTCATCGC CGCTGCGGCTAGACTCGCGCTCGAGGGATTGGGCGTCAACG GGCAGTAAGGCTCTGAAAATCATCTATTGGCCCACACCGC CGCCCTTGCGGGCGGCATGGATTACCAACCACTGTAC	SEQ ID NO 11
-----------------	--	--------------

<i>bl_{NDM-1}</i>	AAAGCCCAGCTTCGCATAAAACGCCTCTGTCACATCGAAAT CGCGCGATGGCAGATTGGGGGTGACGTGGTCAGCCATGGCT CAGCGCAGCTTGTCTGGCCATGCGGGCCGTATGAGTGATTGC GGCGCGGCTATCGGGGGCGGAATGGCTCATCACGATCATGC TGGCCTTGGGGAACGCCGCACCAAACGCGCGCGCTGACGC GGCGTAGTGCTCAGTGTCGGCATCACCGAGATTGCCGAGCG ACTTGGCCTTGCTGTCCTTGATCAGGCAGCCACCAAAAGCG ATGTCGGTGCCGTCGATCCCAACGGTGATATTGTCACTGGT GTGGCCGGGGCCGGGGTAAAATACCTTGAGCGGGCCAAAG TTGGGCGCGGTTGCTGGTTCGACCCAGCCATTGGCGGCGAA AGTCAGGCTGTGTTGCGCCGCAACCATCCCCTCTTGCGGGG CAAGCTGGTTCGACAACGCATTGGCATAAGTCGCAATCCCC GCCGCATGCAGCGCGTCCATAACCGCCATCTTGTCTGATG CGCGTGAGTCACCACCGCCAGCGCGACCGGCAGGTTGATCT CCTGCTTGATCCAGTTGAGGATCTGGGCGGTCTGGTCATCG GTCCAGGCGGTATCGACCACCAGCACGCGGCCGCCATCCCT GACGATCAAACCGTTGGAAGCGACTGCCCCGAAACCCGGC ATGTCGAGATAGGAAGTGTGCTGCCAGACATTCGGTGCGAG CTGGCGGAAAACCAGATCGCCAAACCGTTGGTCGCCAGTTT CCATTTGCTGGCCAATCGTCGGGCGGATTCACCGGGCATG CACCCGCTCAGCATCAATGCAGCGGCTAATGCGGTGCTCAG CTTCGCGACCGGGTGCATAATATTGGGCAATTCCATCAAGT TTTCCTTTTATTCAGCATTA AAAACCCCGCAAATGCGAGGC CTAGTAAATAGATGATCTTAATTTGGTTCACTGTAGCAAAA ATATGGGGCGAATTCAAACATGAGGTGCGACAGTTTCAA	SEQ ID NO 12
---------------------------	--	--------------

<i>blashV-18</i>	TTGTGAATCAGCAAAACGCCGGGTATTCTTATTTGTCGCTT CTTTACTCGCCTTTATCGGCCCTCACTCAAGGATGTATTGTG GTTATGCGTTATTTTCGCCTGTGTATTATCTCCCTGTTAGCC ACCCTGCCGCTGGCGGTACACGCCAGCCCGCAGCCGCTTGA GCAAATTAACTAAGCGAAAGCCAGCTGTCGGGCAGCGTA GGCATGATAGAAATGGATCTGGCCAGCGGCCGCACGCTGA CCGCCTGGCGCGCCGATGAACGCTTTCCCATGATGAGCACC TTTAAAGTAGTGCTCTGCGGCGCAGTGCTGGCGCGGGTGGA TGCCGGTGACGAACAGCTGGAGCGAAAGATCCACTATCGC CAGCAGGATCTGGTGGACTACTCGCCGGTCAGCGAAAAAC ACCTTGCCGACGGCATGACGGTCGGCGAACTCTGTGCCGCC GCCATTACCATGAGCGATAACAGCGCCGCCAATCTGCTGCT GGCCACCGTCGGCGGCCCGCGCAGGATTGACTGCCTTTTGC GCCAGATCGGCGACAACGTCACCCGCCTTGACCGCTGGGAA ACGGAAGTGAATGAGGCGCTTCCCGGCGACGCCCGCGACA CCACTACCCCGGCCAGCATGGCCGCGACCCTGCGCAAGCTG CTGACCAGCCAGCGTCTGAGCGCCCGTTTCGCAACGGCAGCT GCTGCAGTGGATGGTGGACGATCGGGTCGCCGGACCGTTGA TCCGCTCCGTGCTGCCGGCGGGCTGGTTTATCGCCGATAAG ACCGGAGCTGCCAAACGGGGTGCGCGCGGGATTGTCGCCCT GCTTGCCCCGAATAACAAAGCAGAGCGGATTGTGGTGATTT ATCTGCGGGATACGCCGGCGAGCATGGCCGAGCGAAATCA GCAAATCGCCGGGATCGGCGCGGCGCTGATCGAGCACTGG CAACGCTAACCCGGCGGTGGCCGCGCGCGTTATCCGGCTCG TAG	SEQ ID NO 13
------------------	---	--------------

vanC-2	GACTGAATGTAGTAAGAATCGAAAAGCGGAAGGAAGAAAA ACATGAAAAAATCGCCATTATTTTTGGAGGCAATTCACCG GAATACACCGTTTCTTTAGCTTCAGCAACTAGCGCAATCGA AGCACTCCAATCATCTCCCTATGACTACGACCTCTCTTTGAT CGGGATCGCCCCAGATGCTATGGATTGGTACTTGTATACAG GAGAACTGGAAAACATCCGACAAGACACGTGGTTGTTGGA TACGAAACATAAACAGAAAATACAGCCGCTATTCGAAGGA AACGGCTTTTGGCTAAGTGAAGAGCAGCAAACGTTGGTACC TGATGTTTTATTTCCCATATGCATGGCAAATACGGGGAAG ATGGCAGTATCCAAGGATTGTTTGAATTGATGAAGCTGCCT TATGTAGGCTGCGGGGTGGCAAGTTCTGCCTTATGTATGAA CAAATGGCTGCTGCATCAAGCTGCAGCAGCCATTGGCGTAC AAAGTGCTCCTACGATTCTCTTGACAAATCAAGCCAACCAG CAAGAACAAATCGAAGCTTTTATCCAGACCCATGGCTTTCC AGTTTTCTTTAAGCCTAATGAAGCGGGCTCCTCAAAAGGGA TCACTAAAGTCACCTGCGTTGAAGAAATCGCTTCTGCCTTA AAAGAAGCCTTTACTTATTGTTCCGCAGTGCTCCTACAAAA AAATATTGTCGGTGTTGAGATCGGTTGCGGTATTTTGGGCA ACGACTCTTTGACTGTCGGTGCTTGTGACGCCATTTATTAG AAGACGGCTTTTTCGATTTTGAAGAAAAGTACCAGCTGATC AGCGCCAAAATCACCGTCCCTGCGCCATTGCCTGAAACGAT TGAAACCAAGGTCAAAGAACAAGCTCAGCTGCTCTATCGTA GTCTTGGTCTTAAAGGTCTTGCTCGCATCGATTTTTTTGTCA CGGATCAAGGAGAACTATACCTGAATGAAATCAATACTATG CCGGGCTTTACGAGTCACTCCCGCTATCCTGCCATGATGGC AGCGGTGCGCTTATCCTATCAAGAACTACTACAAAACTGC TTATCTTAGCAAAGGAGGAAGTCAAATGAATCCCTATCTAC AGTTAGTTAGCAAAAAATTTCCGTTAGAAAAAAACCAAGA ACCCCTCATTTAGTCCTTGCTGCCTTCAGCGAAGACGAGG TTTACTTGCAGC	SEQ ID NO 14
--------	--	--------------

BIBLIOGRAFÍA

1. Wagner, E.G.H. y R.W. Simons, *Antisense RNA Control in Bacteria, Phages, and Plasmids*. Annual Review of Microbiology, 1994. **48**(1): p. 713-742.
2. Nielsen, P.E., *et al.*, *Peptide nucleic acids*. 1998, Google Patents.
3. Good, L. y P.E. Nielsen, *Progress in Developing PNA as a Gene-Targeted Drug*. Antisense and Nucleic Acid Drug Development, 1997. **7**(4): p. 431-437.
4. Larsen, H.J., T. Bentin y P.E. Nielsen, *Antisense properties of peptide nucleic acid*. Biochimica et Biophysica

Acta (BBA) - Gene Structure and Expression, 1999. **1489**(1): p. 159-166.

5. Nielsen, P., *et al.*, *Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide*. Science, 1991. **254**(5037): p. 1497-1500.
6. Good, L. y P.E. Nielsen, *Antibiotic-free bacterial strain selection with antisense molecules*. 2002, Google Patents.
7. Mondhe, M., *et al.*, *Species-Selective Killing of Bacteria by Antimicrobial Peptide-PNAs*. PLoS ONE, 2014. **9**(2): p. e89082.
8. Garneau, J.E., *et al.*, *The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA*. Nature, 2010. **468**(7320): p. 67-71.
9. Rasmussen, C., H. Sperling-Petersen y K. Mortensen, *Hitting bacteria at the heart of the central dogma: sequence-specific inhibition*. Microbial Cell Factories, 2007. **6**(1): p. 1-26.
10. Citorik, R.J., M. Mimee y T.K. Lu, *Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases*. Nat Biotech, 2014. **32**(11): p. 1141-1145.
11. Eriksson, M., P.E. Nielsen y L. Good, *Cell Permeabilization and Uptake of Antisense Peptide-Peptide Nucleic Acid (PNA) into Escherichia coli*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(9): p. 7144-7147.
12. Institute, C.a.L.S., *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Tests; Approved Standard - Undécima edición*. 2012: Wayne, PA.
13. Institute, C.a.L.S., *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty Second Informational Supplement*. 2012: Wayne PA.
14. Jinek, M., *et al.*, *A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity*. Science, 2012. **337**(6096): p. 816-821.
15. Kawai, S., W. Hashimoto y K. Murata, *Transformation of Saccharomyces cerevisiae and other fungi: Methods and possible underlying mechanism*. Bioengineered Bugs, 2010. **1**(6): p. 395-403.
16. Yamakawa, M., F. Hishinuma y N. Gunge, *Intact Cell Transformation of Saccharomyces cerevisiae by Polyethylene Glycol*. Agricultural and Biological Chemistry, 1985. **49**(3): p. 869-871.
17. Leaw, S.N., *et al.*, *Identification of Medically Important Yeast Species by Sequence Analysis of the Internal Transcribed Spacer Regions*. Journal of Clinical Microbiology, 2006. **44**(3): p. 693-699.
18. Zhang, L., M.J. Leibowitz e Y. Zhang, *Antisense oligonucleotides effectively inhibit the co-transcriptional splicing of a Candida group I intron in vitro and in vivo: Implications for antifungal therapeutics*. FEBS Letters, 2009. **583**(4): p. 734-738.
19. Sztittner, R., *et al.*, *Bright stable luminescent yeast using bacterial luciferase as a sensor*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003. **309**(1): p. 66-70.

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> Geneweave Biosciences, Inc. F. Hoffmann-La Roche AG Roche Diagnostics GmbH	
	<120> DETECCIÓN ESPECÍFICA DE SECUENCIA Y DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO	
10	<130> P33171-WO-HS	
	<150> 62/155.011	
	<151> 30-04-2015	
15	<160> 14	
	<170> PatentIn versión 3.5	
20	<210> 1	
	<211> 10	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> secuencia de ácido peptidonucleico que selecciona murA en <i>E. Coli</i>	
	<400> 1	
	ccatttagtt	10
30	<210> 2	
	<211> 10	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> secuencia de ácido peptidonucleico que selecciona blaKPC-3	
	<400> 2	
	tcaacgatat	10
40	<210> 3	
	<211> 11	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> secuencia de ácido peptidonucleico que selecciona blaNDM-1	
50	<400> 3	
	tcaagttttc c	11
55	<210> 4	
	<211> 4549	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sistema CRISPR/Cas9 que selecciona blaNDM-1	
	<400> 4	
	tccctatcag tgatagagat tgacatccct atcagtgata gagatactga gcacatcagc	60
60	aggacgcact gaccgaattc attaaagagg agaaagggtgc ggccgcatgc atcaccatca	120

ccatcacatg gataagaaat actcaatagg cttagatatc ggcacaaata gcgtcggatg	180
ggcgggtgatc actgatgaat ataagggtcc gtctgttcaa gggtctggga aatacagacc	240
gccacagtat caaaaaaaat cttatagggg ctcttttatt tgacagtggg gagacagcgg	300
aagcgactcg tctcaaacgg acagctcgta gaagggtatac acgtcgggaag aatcgtatct	360
gttatctaca ggagatcttt tcaaatgaga tggcgaaagt agatgatagt ttctttcatc	420
gacttgaaga gtcttttttg gtggaagaag acaagaagca tgaacgtcat cctatctttg	480
gaaatatagt agatgaagtt gcttatcatg agaaatatcc aactatctat catctgcgaa	540
aaaaattggt agattctact gataaagcgg atttgcgctt aatctatttg gccttagcgc	600
atatgattaa gtttcgtggt ctttttttga ttgagggaga tttaaatcct gataatagt	660
atgtggacaa actattttatc cagttggtac aaacctacaa tcaattattt gaagaaaacc	720
ctattaacgc aagtggagta gatgctaaag cgattctttc tgcacgattg agtaaatcaa	780
gacgattaga aaatctcatt gctcagctcc ccggtgagaa gaaaaatggc ttatttggga	840
atctcattgc tttgtcattg gggttgacct ctaattttta atcaaatttt gatttggcag	900
aagatgctaa attacagctt tcaaaagata cttacgatga tgatttagat aattttattg	960
cgcaaattgg agatcaatat gctgatttgt ttttggcagc taagaattta tcagatgcta	1020
ttttactttc agatatccta agagtaaata ctgaaataac taaggctccc ctatcagctt	1080
caatgattaa acgctacgat gaacatcatc aagacttgac tcttttaaaa gcttttagttc	1140
gacaacaact tccagaaaag tataaagaaa tcttttttga tcaatcaaaa aacggatatg	1200
caggttatat tgatggggga gctagccaag aagaatttta taaattttatc aaaccaattt	1260
tagaaaaaat ggatggtact gaggaattat tggtgaaact aaatcgtgaa gatttgctgc	1320
gcaagcaacg gacctttgac aacggctcta ttcccatca aattcacttg ggtgagctgc	1380
atgctatttt gagaagacaa gaagactttt atccattttt aaaagacaat cgtgagaaga	1440
ttgaaaaaat cttgactttt cgaattcctt attatgttgg tccattggcg cgtggcaata	1500
gtcgttttgc atggatgact cggaagtctg aagaaacaat taccatggg aattttgaag	1560
aagttgtcga taaagggtgt tcagctcaat cattttattga acgcatgaca aactttgata	1620
aaaatcttcc aaatgaaaaa gtactacca aacatagttt gctttatgag tattttacgg	1680
tttataacga attgacaaag gtcaaatatg ttactgaagg aatgcgaaaa ccagcatttc	1740
tttcaggtga acagaagaaa gccattgttg atttactctt caaaacaaat cgaaaagtaa	1800

ccgttaagca attaaaagaa gattattttca aaaaaataga atgttttgat agtgttgaaa	1860
tttcaggagt tgaagataga tttaatgott cattaggtac ctacatgat ttgctaaaaa	1920
ttattaaaga taaagatttt ttggataatg aagaaaatga agatatctta gaggatattg	1980
ttttaacatt gacottattt gaagataggg agatgattga ggaaagactt aaaacatatg	2040
ctcacctctt tgatgataag gtgatgaaac agcttaaacg tcgccgttat actggttggg	2100
gacgtttgtc tcgaaaattg attaatggta ttagggataa gcaatctggc aaaacaatat	2160
tagatttttt gaaatcagat ggttttgcca atcgcaattt tatgcagctg atccatgatg	2220
atagtttgac atttaaagaa gacattcaaa aagcacaagt gtctggacaa ggcgatagtt	2280
tacatgaaca tattgcaaat ttagctggta gccctgctat taaaaaagggt attttacaga	2340
ctgtaaaagt tgttgatgaa ttggtcaaag taatggggcg gcataagcca gaaaatatcg	2400
ttattgaaat ggcacgtgaa aatcagacaa ctcaaaaggg ccagaaaaat tcgcgagagc	2460
gtatgaaacg aatogaagaa ggtatcaaag aattaggaag tcagattctt aaagagcatc	2520
ctggtgaaaa tactcaattg caaaatgaaa agctctatct ctattatctc caaaatggaa	2580
gagacatgta tgtggaccaa gaattagata ttaatcgttt aagtgattat gatgtcgatc	2640
acattgttcc acaaagtttc cttaaagacg attcaataga caataaggtc ttaacgcgtt	2700
ctgataaaaa tcgtggtaaa tcggataacg ttccaagtga agaagtagtc aaaaagatga	2760
aaaactattg gagacaactt ctaaacgcc agttaatcac tcaacgtaag tttgataatt	2820
taacgaaagc tgaacgtgga ggtttgagtg aacttgataa agctggtttt atcaaacgcc	2880
aattggttga aactcgccaa atcactaagc atgtggcaca aattttggat agtcgcatga	2940
atactaaata cgatgaaaat gataaactta ttogagaggt taaagtgatt accttaaaat	3000
ctaaattagt ttctgacttc cgaaaagatt tccaattcta taaagtacgt gagattaaca	3060
attaccatca tgccatgat gcgtatctaa atgccgctgt tggaactgct ttgattaaga	3120
aatatccaaa acttgaatcg gagtttgtct atggtgatta taaagtttat gatgttcgta	3180
aatgattgc taagtctgag caagaaatag gcaaagcaac cgcaaaatat ttcttttact	3240
ctaatatcat gaacttcttc aaaacagaaa ttacacttgc aaatggagag attcgcaaac	3300
gccctcta at cgaaactaat ggggaaactg gagaaattgt ctgggataaa ggcgagatt	3360
ttgccacagt gcgcaaagta ttgtccatgc cccaagtcaa tattgtcaag aaaacagaag	3420
tacagacagg cggattctcc aaggagtcaa ttttaccaaa aagaaattcg gacaagctta	3480
ttgctcgtaa aaaagactgg gatccaaaaa aatatggtgg ttttgatagt ccaacggtag	3540
cttattcagt cctagtgggt gctaagggtg aaaaagggaa atcgaagaag ttaaaatccg	3600
ttaaagagtt actagggatc acaattatgg aaagaagttc ctttgaaaaa aatccgattg	3660
actttttaga agctaaagga tataaggaag ttaaaaaaga cttaatcatt aaactaccta	3720

aatatagtct ttttgagtta gaaaacgggc gtaaaccggat gctgggctagt gccggagaat 3780
 tacaaaaagg aaatgagctg gctctgccaa gcaaatatgt gaatttttta tatttagcta 3840
 gtcattatga aaagttgaag ggtagtccag aagataacga acaaaaaacaa ttgtttgtgg 3900
 agcagcataa gcattattta gatgagatta ttgagcaaat cagtgaattt tctaagcgtg 3960
 ttatttttagc agatgccaat ttagataaag ttcttagtgc atataacaaa catagagaca 4020
 aaccaatacg tgaacaagca gaaaatatta ttcatattt tacgttgacg aatcttggag 4080
 ctcccgtgc ttttaaatat ttgatacaa caattgatcg taaacgatat acgtctacaa 4140
 aagaagtttt agatgccact cttatccatc aatccatcac tgggtctttat gaaacacgca 4200
 ttgatttgag tcagctagga ggtgactgac tcgagctaga ggcatcaaat aaaacgaaag 4260
 gctcagtcga aagactgggc ctttcgtttt atctgttggt tgcgggtgaa cgctctcctg 4320
 agtaggacaa atccgcgcgc ctagacctag caccctgcag ttgacagcta gctcagtcct 4380
 aggtataatg ctagcttcca acggtttgat cgtcagtttt agagctagaa atagcaagtt 4440
 aaaataaggc tagtccgtta tcaacttgaa aaagtggcac cgagtcgggtg ctttttttct 4500
 agatgatgat taaggatcta tttttttggg cggggccgcc caaaaaaat 4549

<210> 5
 <211> 4549
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sistema CRISPR/Cas9 que selecciona blaSHV-18

<400> 5
 tccctatcag tgatagagat tgacatccct atcagtgata gagatactga gcacatcagc 60
 aggacgcact gaccgaattc attaaagagg agaaagggtgc ggccgcacgc atcaccatca 120
 ccatcacatg gataagaaat actcaatagg cttagatatc ggcacaaaata gcgtcggatg 180
 ggcgggtgatc actgatgaat ataaggttcc gtctgttcaa ggttctggga aatacagacc 240
 gccacagtat caaaaaaat cttatagggg ctctttttatt tgacagtgga gagacagcgg 300
 aagcgactcg tctcaaacgg acagctcgta gaaggatatac acgtcggaag aatcgtattt 360
 gttatctaca ggagattttt tcaaatgaga tggcgaaagt agatgatagt ttctttcatc 420
 gacttgaaga gtcttttttg gtggaagaag acaagaagca tgaacgtcat cctatttttg 480
 gaaatatagt agatgaagtt gcttatcatg agaaatatcc aactatctat catctgcgaa 540
 aaaaattggg agattctact gataaagcgg atttgcgctt aatctatttg gccttagcgc 600
 atatgattaa gtttcgtggg ctttttttga ttgagggaga tttaaatcct gataatagtg 660
 atgtggacaa actattttatc cagttgggtac aaacctacaa tcaattattt gaagaaaacc 720

ctattaacgc aagtggagta gatgctaaag cgattctttc tgcacgattg agtaaataca	780
gacgattaga aaatctcatt gctcagctcc cgggtgagaa gaaaaatggc ttatttgga	840
atctcattgc tttgtcattg ggtttgacc ctaattttta atcaaatttt gatttggcag	900
aagatgctaa attacagctt tcaaaagata cttacgatga tgatttagat aatttattgg	960
cgcaaattgg agatcaatat gctgatttgt ttttggcagc taagaattta tcagatgcta	1020
ttttactttc agatatccta agagtaaata ctgaaataac taaggctccc ctatcagctt	1080
caatgattaa acgctacgat gaacatcatc aagacttgac tcttttaaaa gctttagttc	1140
gacaacaact tcagaaaaag tataaagaaa tcttttttga tcaatcaaaa aacggatatg	1200
caggttatat tgatggggga gctagccaag aagaatttta taaatttatc aaaccaattt	1260
tagaaaaaat ggatggtact gaggaattat tggtgaaact aaatcgtgaa gatttgctgc	1320
gcaagcaacg gacctttgac aacggctcta ttcccatca aattcacttg ggtgagctgc	1380
atgctatttt gagaagacaa gaagactttt atccattttt aaaagacaat cgtgagaaga	1440
ttgaaaaaat cttgactttt cgaattcctt attatgttgg tccattggcg cgtggcaata	1500
gtcgttttgc atggatgact cggaagtctg aagaaacaat taccocatgg aattttgaag	1560
aagttgtcga taaaggtgct tcagctcaat catttattga acgcatgaca aactttgata	1620
aaaatcttcc aaatgaaaa gtactaccaa aacatagttt gctttatgag tattttacgg	1680
tttataacga attgacaaag gtcaaatatg ttactgaagg aatgcgaaaa ccagcatttc	1740
tttcagggtga acagaagaaa gccattgttg atttactctt caaaacaaat cgaaaagtaa	1800
ccgttaagca attaaaagaa gattatttca aaaaaataga atgttttgat agtgttgaaa	1860
tttcaggagt tgaagataga tttaatgctt cattaggtac ctaccatgat ttgctaaaaa	1920
ttattaaaga taaagatttt ttggataatg aagaaaatga agatatotta gaggatattg	1980
ttttaacatt gaccttattt gaagataggg agatgattga ggaaagactt aaaacatatg	2040
ctcacctctt tgatgataag gtgatgaaac agcttaaacg tcgccgttat actggttggg	2100
gacgtttgtc tcgaaaattg attaatggta ttagggataa gcaatctggc aaaacaatat	2160
tagatttttt gaaatcagat ggttttgcc aatcgcaattt tatgcagctg atccatgatg	2220
atagtttgac atttaaagaa gacattcaaa aagcacaagt gtctggacaa ggcgatagtt	2280
tacatgaaca tattgcaaat ttagctggta gccctgctat taaaaaagggt attttacaga	2340
ctgtaaaagt tgttgatgaa ttggtcaaag taatggggcg gcataagcca gaaaatatcg	2400
ttattgaaat ggcacgtgaa aatcagacaa ctcaaaaggg ccagaaaaat tcgcgagagc	2460
gtatgaaacg aatcgaagaa ggtatcaaag aattaggaag tcagattctt aaagagcatc	2520
ctgttgaaaa tactcaattg caaaatgaaa agctctatct ctattatctc caaaatggaa	2580
gagacatgta tgtggacca gaattagata ttaatcgttt aagtgattat gatgtogato	2640

acattgttcc	acaaagtttc	cttaaagacg	attcaataga	caataaggtc	ttaacgcgtt	2700
ctgataaaaa	tcgtggtaaa	tcggataacg	ttccaagtga	agaagtagtc	aaaaagatga	2760
aaaactattg	gagacaactt	ctaaacgcc	agttaatcac	tcaacgtaag	tttgataatt	2820
taacgaaagc	tgaacgtgga	ggtttgagt	aacttgataa	agctggtttt	atcaaacgcc	2880
aattgggtga	aactcgccaa	atcactaagc	atgtggcaca	aattttggat	agtcgcatga	2940
atactaaata	cgatgaaaat	gataaactta	ttcgagaggt	taaagtgatt	accttaaaat	3000
ctaaattagt	ttctgacttc	cgaaaagatt	tccaattcta	taaagtacgt	gagattaaca	3060
attaccatca	tgcccatgat	gcgtatctaa	atgccgtcgt	tggaactgct	ttgattaaga	3120
aatatccaaa	acttgaatcg	gagtttgtct	atggtgatta	taaagtttat	gatgttcgta	3180
aatgattgc	taagtctgag	caagaaatag	gcaaagcaac	cgcaaaatat	ttcttttact	3240
ctaatatcat	gaacttcttc	aaaacagaaa	ttacacttgc	aatggagag	attcgcaaac	3300
gccctcta	cgaaactaat	ggggaaactg	gagaaattgt	ctgggataaa	gggcgagatt	3360
ttgccacagt	gcgcaaagta	ttgtccatgc	cccaagtcaa	tattgtcaag	aaaacagaag	3420
tacagacagg	cggattctcc	aaggagtcaa	ttttaccaaa	aagaaattcg	gacaagctta	3480
ttgctcgtaa	aaaagactgg	gatccaaaaa	aatatggtgg	ttttgatagt	ccaacggtag	3540
cttattcagt	cctagtgggt	gctaagggtg	aaaaagggaa	atcgaagaag	ttaaaatccg	3600
ttaaagagtt	actagggatc	acaattatgg	aaagaagttc	ctttgaaaaa	aatccgattg	3660
actttttaga	agctaaagga	tataaggaag	ttaaaaaaga	cttaatcatt	aaactaccta	3720
aatatagtct	ttttgagtta	gaaaacggtc	gtaaacggat	gctggctagt	gccggagaat	3780
tacaaaaagg	aatgagctg	gctctgccaa	gcaaatatgt	gaatttttta	tatttagcta	3840
gtcattatga	aaagttgaag	ggtagtccag	aagataacga	acaaaaacaa	ttgtttgtgg	3900
agcagcataa	gcattattta	gatgagatta	ttgagcaaat	cagtgaattt	tctaagcgtg	3960
ttatttttagc	agatgccaat	ttagataaag	ttcttagtgc	atataacaaa	catagagaca	4020
aaccaatacg	tgaacaagca	gaaaatatta	ttcatttatt	tacgttgacg	aatcttgag	4080
ctcccgctgc	ttttaaatat	tttgatacaa	caattgatcg	taaacgatat	acgtctacaa	4140
aagaagtttt	agatgccact	cttatccatc	aatccatcac	tggtctttat	gaaacacgca	4200
ttgatttgag	tcagctagga	ggtgactgac	tcgagctaga	ggcatcaa	aaaacgaaag	4260
gctcagtcga	aagactgggc	ctttcgtttt	atctgttgtt	tgctcggtgaa	cgctctcctg	4320
agtaggacaa	atccgccgcc	ctagacctag	caccctgcag	ttgacagcta	gctcagtcct	4380
aggtataatg	ctagcctaag	cgaaagccag	ctgtcgtttt	agagctagaa	atagcaagtt	4440
aaaataaggc	tagtccgtta	tcaacttgaa	aaagtggcac	cgagtcgggtg	ctttttttct	4500

	agatgatgat taaggatcta tttttttggg cggggccgcc caaaaaaat	4549
	<210> 6	
	<211> 12	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> secuencia de ácido peptidonucleico que selecciona vanC-2	
10	<400> 6	
	atgtttttct tc	12
	<210> 7	
15	<211> 12	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> secuencia 1 de oligonucleótidos antisentido que selecciona ITS2 en <i>C. albicans</i>	
	<400> 7	
	ccattgtcaa ag	12
25	<210> 8	
	<211> 12	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> secuencia 2 de oligonucleótidos antisentido que selecciona ITS2 en <i>C. tropicalis</i>	
	<400> 8	
35	tcgcttaaaa ta	12
	<210> 9	
	<211> 12	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> secuencia 3 de oligonucleótidos antisentido que selecciona ITS2 en <i>C. parapsilosis</i>	
	<400> 9	
45	aaacccgagg gt	12
	<210> 10	
	<211> 10	
	<212> PRT	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Péptido de penetración	
55	<400> 10	
	Lys Phe Phe Lys Phe Phe Lys Phe Phe Lys	
	1 5 10	
	<210> 11	
	<211> 1020	
60	<212> ADN	
	<213> <i>Escherichia coli</i>	
	<220>	
	<221> gen	

ES 2 761 631 T3

<222> (1) .. (1020)

<223> blaKPC-3

<400> 11

```

agctgtagcg gcctgattac atccggccgc tacacctagc tccaccttca aacaaggaat      60
atcgttgatg tcaactgtatc gcogtctagt tctgctgtct tgtctctcat ggccgctggc      120
tggctttttct gccaccgcgc tgaccaacct cgtcgcggaa ccattcgcta aactcgaaca      180
ggacttttggc ggctccatcg gtgtgtacgc gatggatacc ggctcaggcg caactgtaag      240
ttaccgcgct gaggagcgct tcccactgtg cagctcattc aagggtcttc ttgctgccgc      300
tgtgctggct cgcagccagc agcaggccgg cttgctggac acacccatcc gttacggcaa      360
aaatgcgctg gttccgtggc caccatctc ggaaaaatat ctgacaacag gcatgacggc      420
ggcggagctg tccgcggccg ccgtgcaata cagtataaac gccgccgcca atttgttgct      480
gaaggagttg ggcggcccg cgggctgac ggccttcatg cgctctatcg gcgataccac      540
gttcogtctg gacogctggg agctggagct gaactccgcc atcccaggcg atgcgcgcga      600
tacctcatcg ccgcgcgcgc tgacggaaaag cttacaaaaa ctgacactgg gctctgcact      660
ggctgcgcgc cagcggcagc agtttgttga ttggctaaag ggaaacacga ccggcaacca      720
ccgcatccgc gcggcggtgc cggcagactg ggcagtcgga gacaaaaccg gaacctgcgg      780
agtgtatggc acggcaaagt actatgccgt cgtctggccc actgggcgcg cacctattgt      840
gttggcgcgc tacaccgggg cgcctaacaa ggatgacaag tacagcgagg ccgtcatcgc      900
cgctgcggct agactcggc tcgagggatt gggcgtcaac gggcagtaag gctctgaaaa      960
5  tcactctattg gccaccacc gccgccttg cgggcggcat ggattaccaa ccactgtcac      1020

```

<210> 12

<211> 1020

<212> ADN

10 <213> *Escherichia coli*

<220>

<221> gen

<222> (1) .. (1020)

15 <223> blaNDM-1

<400> 12

```

aaagcccagc ttgcataaa acgcctctgt cacatcgaaa tcgcgcgatg gcagattggg      60
ggtgacgtgg tcagccatgg ctacgcgcag cttgtcggcc atgcgggccc tatgagtgat      120
tgccggcgcg ctatcggggg cggaatggct catcacgata atgctggcct tggggaacgc      180
cgcaccaaac gcgcgcgctg acgcggcgta gtgctcagt tcggcatcac cgagattgcc      240
gagcgacttg gccttgctgt ccttgatcag gcagccacca aaagcgatgt cggtgccgct      300
gatcccaacg gtgatattgt cactgggtgt gccggggccc gggtaaaata ccttgagcgg      360

```

gccaaagtgtg ggcgcggttg ctggttcgac ccagccattg gcggcgaaaag tcaggctgtg 420
 ttgcgcgcga accatccctt cttgcggggc aagctggttc gacaacgcat tggcataagt 480
 cgcaatcccc gccgcgatgca gcgcgtccat accgcccatac ttgtcctgat gcgcgtgagt 540
 caccaccgcc agcgcgaccg gcaggttgat ctctgtcttg atccagttga ggatctgggc 600
 ggtctggtca tcggtccagg cgttatcgac caccagcacg cggccgccat ccctgacgat 660
 caaacctgtg gaagcgactg ccccgaaaac cggcatgtcg agataggaag tgtgctgcca 720
 gacattcggg gcgagctggc ggaaaaccag atcgccaaac cgttggtcgc cagtttccat 780
 ttgctggcca atcgctgggc ggatttcacc gggcatgcac ccgctcagca tcaatgcagc 840
 ggctaattgc gtgctcagct tcgcgaccgg gtgcataata ttgggcaatt ccatcaagtt 900
 ttctttttat tcagcattaa aaaccccgca aatgcgaggc ctagtaaata gatgatctta 960
 atttggttca ctgtagcaaa aatatggggc gaattcaaac atgaggtgcg acagtttcaa 1020

<210> 13
 <211> 983
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(983)
 <223> blaSHV-18

<400> 13
 ttgtgaatca gcaaaacgcc gggttattct tatttgctgc ttctttactc gcctttatcg 60
 gccctcactc aaggatgtat tgtggttatg cgttattttc gcctgtgtat tatctccctg 120
 ttagccaccc tgcgcgtggc ggtacacgcc agcccgacgc cgttgagca aattaaacta 180
 agcgaagacc agctgtcggg cagcgtaggc atgatagaaa tggatctggc cagcggccgc 240
 acgctgaccg cctggcgcg ccatgaacgc tttcccatga tgagcacctt taaagtagtg 300
 ctctgcgggc cagtgtcggc ggggtggat gccggtgacg aacagctgga gcgaaagatc 360
 cactatcgcc agcaggatct ggtggactac tcgcgggtca gcgaaaaaca ccttgccgac 420
 ggcatgacgg tcggcgaaact ctgtgccgcc gccattacca tgagcgataa cagcgccgcc 480
 aatctgctgc tggccaccgt cggcgggccc gcaggattga ctgccttttt gcgccagatc 540
 ggcgacaacg tcaccgcctt tgaccgctgg gaaacggaac tgaatgaggc gcttcccggc 600
 gacgcccgcg acaccactac cccggccagc atggccgcga ccctgcgcaa gctgctgacc 660
 agccagcgtc tgagcgcccg ttgcgaacgg cagctgctgc agtggatggg ggacgatcgg 720
 gtcgccggac cgttgatccg ctccgtgctg ccggcggggt ggtttatcgc cgataagacc 780
 ggagctgcca aacgggggtg gcgcgggatt gtgcacctgc ttggcccga taacaaagca 840
 gagcggattg tgggtgattta tctgcgggat acgcggcgga gcatggccga gcgaaatcag 900

ES 2 761 631 T3

	caaatcgccg ggatcggcgc ggcgctgac gagcactggc aacgctaacc cggcgggtggc	960
	cgcgcgcgtt atcgggctcg tag	983
5	<210> 14 <211> 1200 <212> ADN <213> <i>Enterococcus casseliflavus</i>	
10	<220> <221> gen <222> (1)..(1200) <223> vanC-2	
	<400> 14	
	gactgaatgt agtaagaatc gaaaagcggg aggaagaaaa acatgaaaaa aatcgccatt	60
	atTTTTggag gcaattcacc ggaatacacc gtttcttttag cttcagcaac tagcgcaatc	120
	gaagcactcc aatcatctcc ctatgactac gacctctctt tgatcgggat cggcccagat	180
	gctatggatt ggtacttgta tacaggagaa ctggaaaaca tccgacaaga cacgtggttg	240
	ttggatacga aacataaaca gaaaatacag ccgctattcg aaggaaacgg cttttggcta	300
	agtgaagagc agcaaacgtt ggtacctgat gttttatttc ccattatgca tggcaaatac	360
	ggggaagatg gcagtatcca aggattgttt gaattgatga agctgcctta tgtaggctgc	420
	ggggtggcaa gttctgcctt atgtatgaac aaatggctgc tgcacaaagc tgcagcagcc	480
	attggcgtag aaagtgcctc tacgattctc ttgacaaatc aagccaacca gcaagaacaa	540
	atcgaagctt ttatccagac ccattggctt ccagttttct ttaagcctaa tgaagcgggc	600
	tcctcaaaag ggatcactaa agtcacctgc gttgaagaaa tcgcttctgc cttaaaagaa	660
	gcctttactt attgttccgc agtgctccta caaaaaaata ttgtcgggtg tgagatcggg	720
	tgcggtatTT tgggcaacga ctctttgact gtcgggtgctt gtgacgccat ttcattagaa	780
	gacggctttt tcgattttga agaaaagtag cagctgatca gcgccaaaat caccgtccct	840
	gcgccattgc ctgaaacgat tgaaaccaag gtcaaagaac aagctcagct gctctatcgt	900
	agtcttggtc ttaaagggtc tgctcgcatc gatttttttg tcacggatca aggagaacta	960
	tacctgaatg aaatcaatac tatgcccggc tttacgagtc actcccgcta tcctgccatg	1020
	atggcagcgg tcggcttatc ctatcaagaa ctactacaaa aactgcttat cttagcaaa	1080
	gaggaagtca aatgaatccc tatctacagt tagttagcaa aaaatttccg ttagaaaaaa	1140
15	accaagaacc ccctcattta gtccttgctg ccttcagcga agacgaggtt tacttgacgc	1200

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para determinar un mecanismo para un fenotipo de sensibilidad antimicrobiana, que comprende:
 - proporcionar una muestra que comprende al menos un microorganismo que no es sensible a al menos un agente antimicrobiano;
 - poner en contacto la muestra con el agente antimicrobiano, en el que el agente antimicrobiano puede destruir, inhibir el crecimiento o de otro modo alterar la viabilidad de uno o más microorganismos;
 - poner en contacto el al menos un microorganismo con al menos un compuesto que comprende una molécula oligonucleotídica que selecciona al menos una secuencia de ácido nucleico específica que está implicada en un fenotipo no sensible al agente antimicrobiano;
 - poner en contacto la muestra con una partícula de transducción no replicativa (NRTP) que comprende una molécula de ácido nucleico indicadora que codifica una molécula indicadora en condiciones tales que la NRTP inserte en el microorganismo la molécula de ácido nucleico indicadora y tales que la molécula indicadora proporcione la indicación detectable de viabilidad; y
 - determinar el mecanismo para el fenotipo de sensibilidad antimicrobiana del microorganismo en base a la presencia o ausencia de una indicación detectable de viabilidad asociada con el microorganismo cuando el microorganismo está en contacto con el agente antimicrobiano y la molécula oligonucleotídica, en el que la presencia de la indicación detectable de viabilidad indica que la secuencia de ácido nucleico específica seleccionada por la molécula oligonucleotídica no está relacionada con el mecanismo para el fenotipo de sensibilidad antimicrobiana al agente antimicrobiano, y en el que la ausencia de la indicación detectable de viabilidad indica que la secuencia de ácido nucleico específica seleccionada por la molécula oligonucleotídica está relacionada con el mecanismo para el fenotipo de sensibilidad antimicrobiana al agente antimicrobiano.
2. Un procedimiento para determinar un mecanismo implicado en un fenotipo no sensible, que comprende:
 - proporcionar una muestra que comprende una enterobacteriácea que no es sensible al carbapenem;
 - poner en contacto la muestra con carbapenem;
 - poner en contacto la enterobacteriácea con una molécula oligonucleotídica que selecciona un gen asociado con la resistencia al carbapenem;
 - poner en contacto la muestra con una partícula de transducción no replicativa (NRTP) que comprende una molécula de ácido nucleico indicadora que codifica una molécula indicadora en condiciones tales que la NRTP inserte en la enterobacteriácea la molécula de ácido nucleico indicadora y tales que la molécula indicadora proporcione la indicación detectable de viabilidad; y
 - determinar el mecanismo de no sensibilidad de carbapenem para las enterobacteriáceas en base a la presencia o ausencia de una indicación detectable de viabilidad asociada con las enterobacteriáceas cuando la enterobacteriácea está en contacto con el carbapenem y la molécula oligonucleotídica, en el que la presencia de la indicación detectable de viabilidad indica que el gen seleccionado por la molécula oligonucleotídica no está relacionado con el mecanismo de no sensibilidad al carbapenem, y en el que la ausencia de la indicación detectable de viabilidad indica que el gen seleccionado por la molécula oligonucleotídica está relacionado con el mecanismo de no sensibilidad al carbapenem.
3. Un procedimiento para reducir la cantidad de organismos potencialmente interferentes o de reactividad cruzada en un ensayo diseñado para detectar un organismo diana que comprende:
 - proporcionar una muestra que comprende al menos un organismo que es potencialmente interferente o de reactividad cruzada en un ensayo diseñado para detectar un organismo diana;
 - poner en contacto el organismo interferente o de reactividad cruzada con al menos un compuesto que comprende una molécula oligonucleotídica que selecciona al menos una secuencia de ácido nucleico específica que está implicada con la viabilidad del organismo potencialmente interferente o de reacción cruzada, en el que la secuencia de ácido nucleico específica es única para el organismo potencialmente interferente o de reactividad cruzada; y provocar que el organismo potencialmente interferente o de reactividad cruzada pierda viabilidad; y
 - poner en contacto la muestra con una partícula de transducción no replicativa (NRTP) que comprende una molécula de ácido nucleico indicadora que codifica una molécula indicadora en condiciones tales que la

NRTP inserte en el organismo diana la molécula de ácido nucleico indicadora y tales que la molécula indicadora proporcione una indicación detectable de viabilidad del organismo diana.

- 5 4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el organismo diana es de la familia *Enterobacteriaceae*.
- 5 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4, en el que la al menos una secuencia de ácido nucleico específica que está implicada con la viabilidad del organismo potencialmente interferente o de reactividad cruzada es el gen *murA*.
- 10 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la al menos una secuencia de ácido nucleico específica que está implicada en un fenotipo no sensible al agente antimicrobiano se selecciona del grupo que consiste en un gen *blaKPC-3*, un gen *blaNDM-1*, un gen *blaSHV-18* y un gen *vanC*.
- 15 7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 6, en el que el microorganismo es de la familia *Enterobacteriaceae*, el género *Enterococcus* o el género *Candida*.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 6 a 7, en el que el antimicrobiano es una β -lactama o vancomicina.
- 20 9. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la molécula oligonucleotídica se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO 2 o SEQ ID NO 3, o en el que la molécula oligonucleotídica es un sistema CRISPR/Cas9 que comprende la SEQ ID NO 4 o SEQ ID NO 5.
- 25 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la molécula de ácido nucleico indicadora es un gen que codifica una molécula emisora de luz.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la NRTP se produce a partir de un sistema de encapsidación de células bacterianas que comprende una célula de bacteria huésped, una primera construcción de ácido nucleico en el interior de la célula de bacteria huésped que comprende un genoma de bacteriófago que tiene una secuencia de sitio de inicio de encapsidación no funcional, en el que la secuencia de sitio de inicio de encapsidación no funcional evita la encapsidación del genoma de bacteriófago en la NRTP, y una segunda construcción de ácido nucleico en el interior de la célula de bacteria huésped y separada de la primera construcción de ácido nucleico, que comprende la molécula de ácido nucleico indicadora que tiene un gen indicador y una secuencia de sitio de inicio de encapsidación funcional para facilitar la encapsidación de un replicón de la molécula de ácido nucleico indicadora en la NRTP, en el que la segunda secuencia de sitio de inicio de encapsidación funcional en la segunda construcción de ácido nucleico complementa la secuencia de sitio de inicio de encapsidación no funcional en el genoma de bacteriófago en la primera construcción de ácido nucleico.
- 30 35 40 12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 10 y 11, en el que el compuesto se selecciona del grupo que consiste en un ácido peptidonucleico (APN), un péptido-APN, un ARN CRISPR (ARNcr), un oligonucleótido antisentido y un ARN bicatenario (ARNbc).

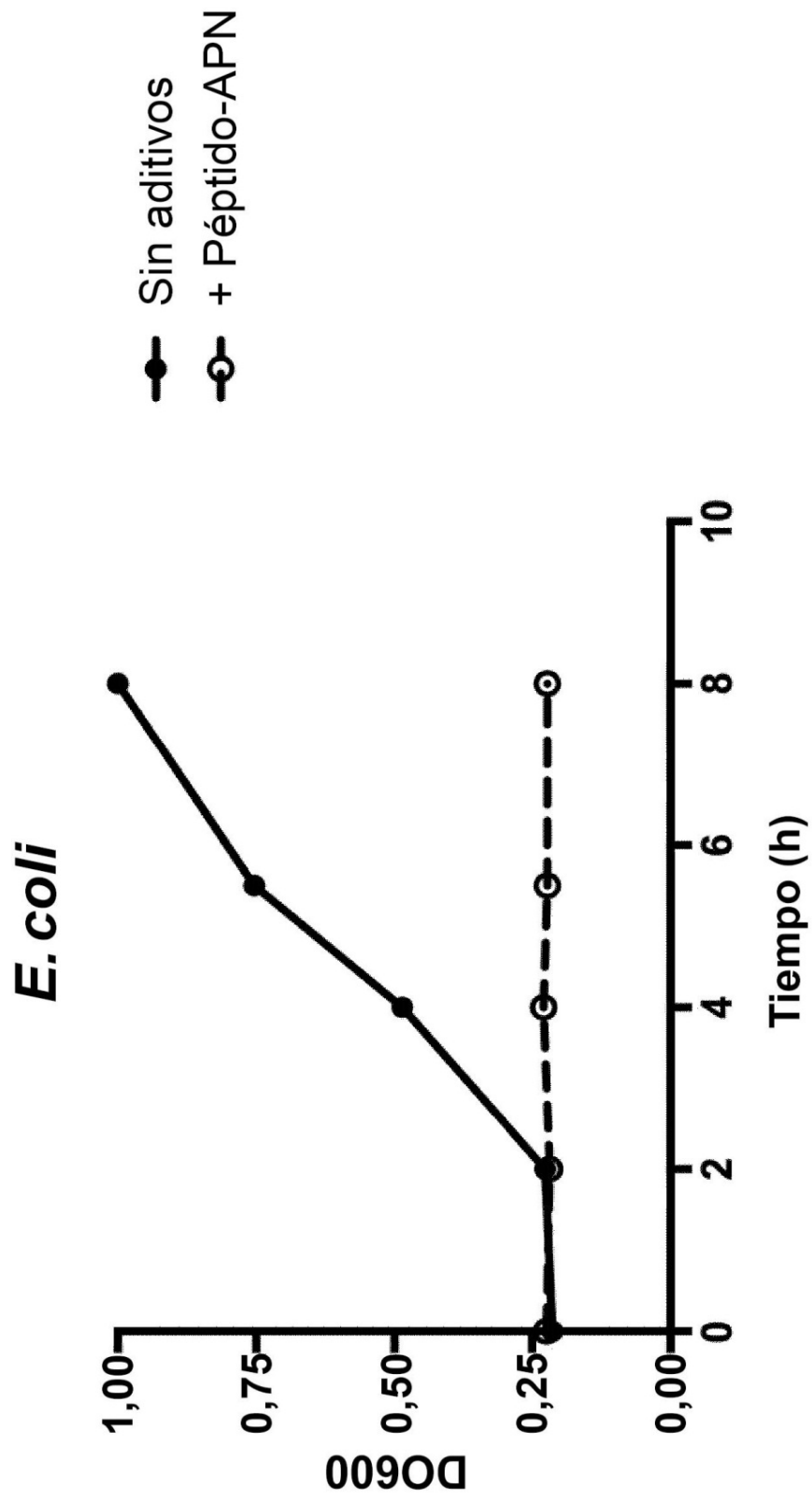


FIG. 1

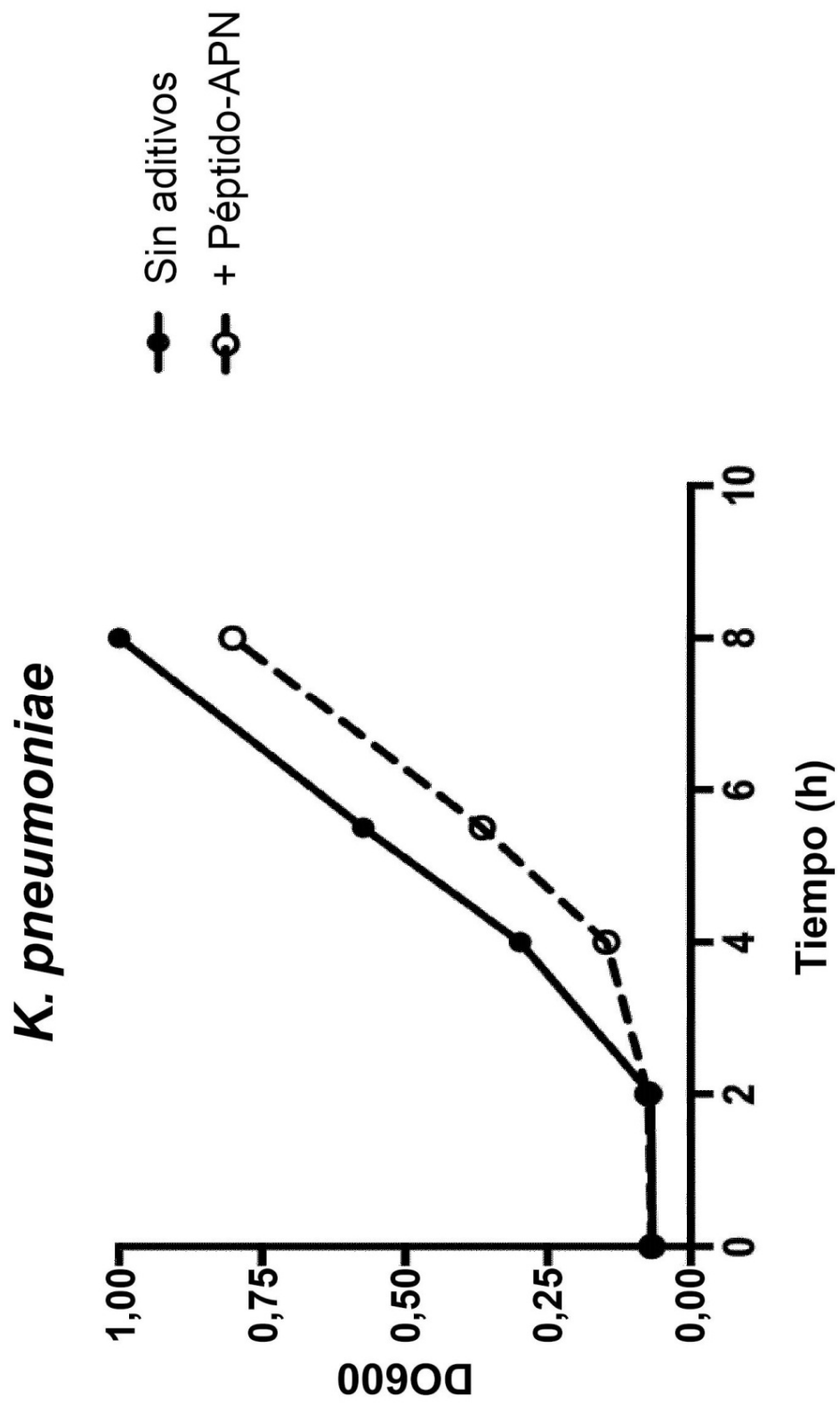
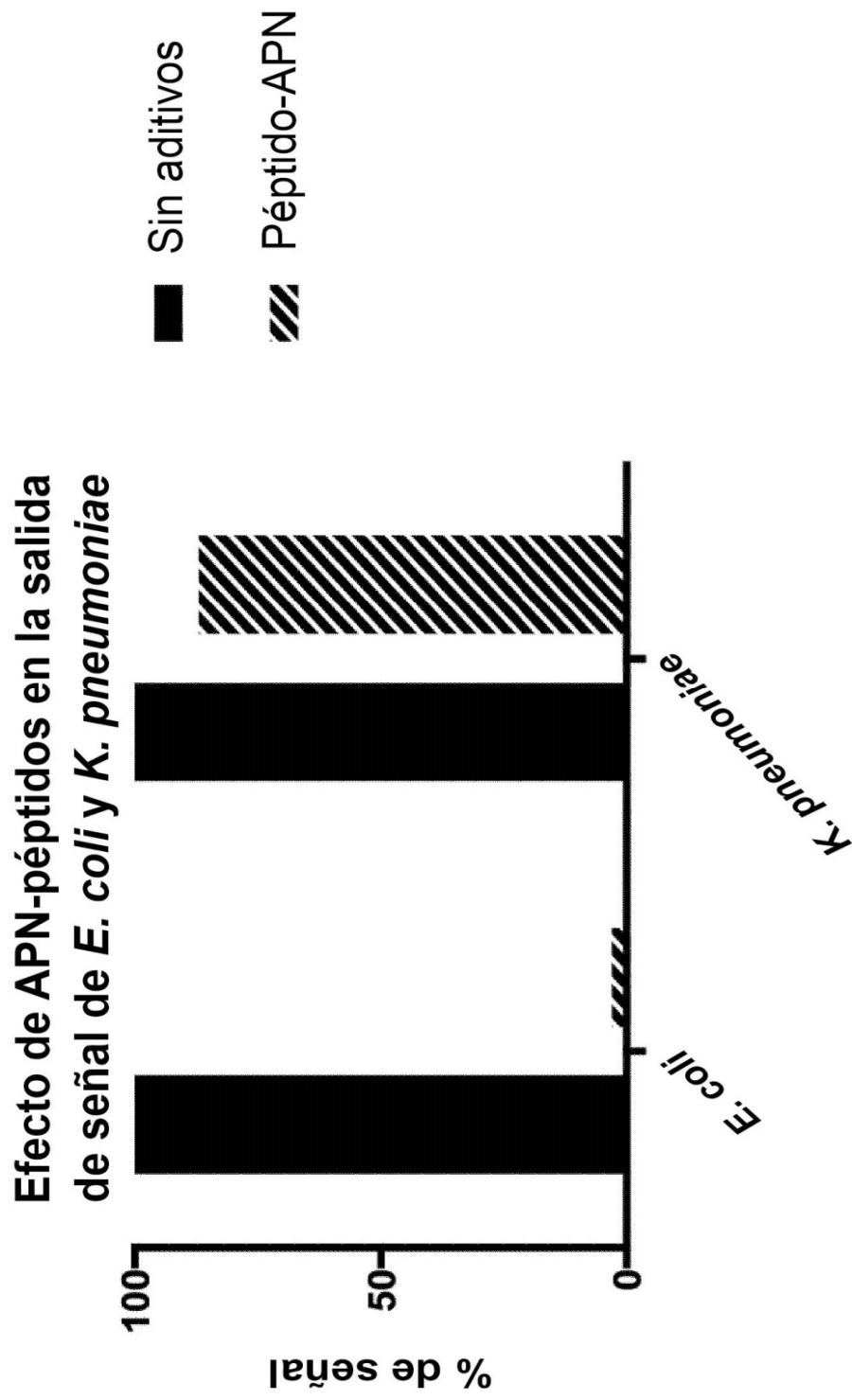


FIG. 2

**FIG. 3**

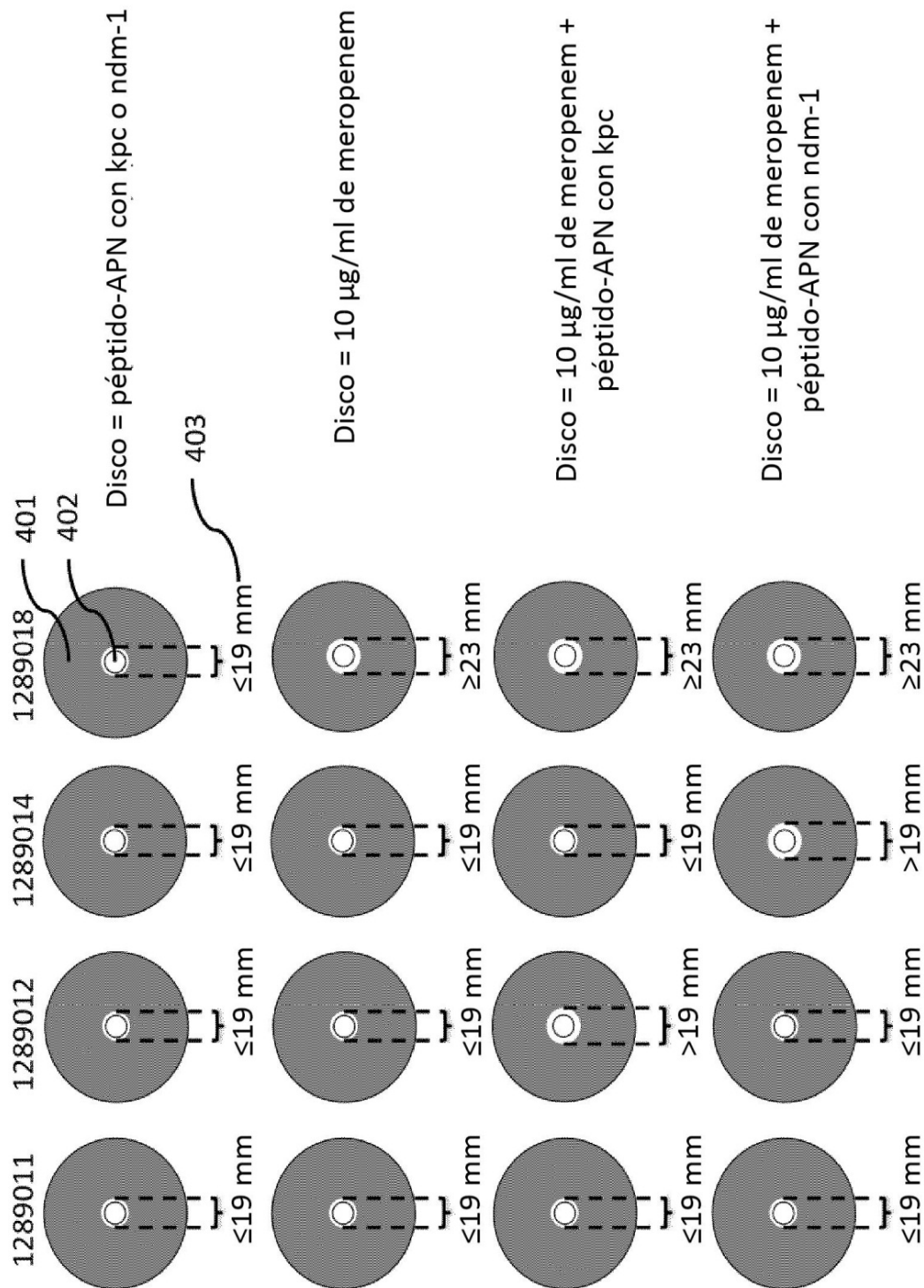


FIG. 4

	1	2	3	4	5
Cepa de <i>E. coli</i>	Indicador	Indicador + meropenem	Indicador + meropenem + péptido-APN con kpc	Indicador + meropenem + péptido-APN con ndm-1	Indicador + péptido-APN con kpc o ndm-1
1289011	+	+	+	+	+
1289012	+	+	-	+	+
1289014	+	+	+	-	+
1289018	+	-	-	-	+

FIG. 5

	1	2	3	4
Cepa de <i>E. coli</i>	NRTP con bla _{NDM} -1 + meropenem	NRTP con bla _{SHV} -18 + meropenem	NRTP con bla _{NDM} -1 + ceftazidima	NRTP con bla _{SHV} -18 + ceftazidima
1289018	-	-	-	-
1289023	-	+	-	+
1289027	-	-	+	-
1289011	+	+	+	+

FIG. 6

			1	2	3	4
Cepa	<i>Enterococcus spp.</i>	gen de resistencia a la vancomicina	Indicador	Indicador + vancomicina	Indicador + vancomicina + péptido-APN con vanC	Indicador + Péptido-APN con vanC
1259012	<i>E. faecalis</i>	ninguno	+	-	-	+
1259016	<i>E. faecalis</i>	vanA	+	+	+	+
1269011	<i>E. faecium</i>	ninguno	+	-	-	+
1269014	<i>E. faecium</i>	vanB	+	+	+	+
1279015	<i>E. gallinarum</i>	vanC	+	+	-	+

FIG. 7

Cepa	Especie	AON basado en ITS2	Secuencia de ITS2-Genbank
5120012	<i>Candida albicans</i>	1	AB049120
5160014	<i>Candida tropicalis</i>	2	AM117838
5150013	<i>Candida parapsilosis</i>	3	AJ635316

FIG. 8

		1	2	3	4	5	
Cepa	Especie	AON basado en ITS2	Indicador	Indicador + AON 2,3	Indicador + AON 1,3	Indicador + AON 1,2	Indicador + AON 1,2,3
5120012	<i>Candida albicans</i>	1	+	+	-	-	-
5160014	<i>Candida tropicalis</i>	2	+	-	+	-	-
5150013	<i>Candida parapsilosis</i>	3	+	-	-	+	-

FIG. 9