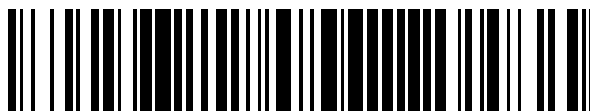


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 780 827**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/542 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2014 PCT/US2014/026536**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14160418**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014 E 14775849 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2020 EP 2968424**

54 Título: **Partículas de transducción no replicativas y sistemas indicadores basados en partículas de transducción**

30 Prioridad:

13.03.2013 US 201361779177 P

29.10.2013 US 201361897040 P

12.02.2014 US 201461939126 P

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

27.08.2020

73 Titular/es:

**GENEWEAVE BIOSCIENCES INC. (100.0%)
983 University Avenue, Bldg. B200
Los Gatos, CA 95032, US**

72 Inventor/es:

**REY, DIEGO, ARIEL;
DEFOREST, NIKOL;
COX, HEATHER y
SHUKLA, SONI**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 780 827 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

Partículas de transducción no replicativas y sistemas indicadores basados en partículas de transducción

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

10 La invención se refiere a procedimientos y composiciones para empaquetar y suministrar moléculas indicadoras de transducción no replicativas en células para detectar genes diana en células.

Descripción de la técnica relacionada

15 Una partícula de transducción se refiere a un virus que puede suministrar un ácido nucleico no vírico en una célula. Se han usado sistemas indicadores basados en virus para detectar la presencia de células y se basan en la fase lisógena del virus para permitir la expresión de una molécula indicadora de la célula. Estos sistemas indicadores basados en virus usan partículas de transducción competentes en la replicación que expresan moléculas indicadoras y provocan que una célula diana emita una señal detectable.

20 Sin embargo, se ha demostrado que el ciclo lítico del virus es perjudicial para los ensayos de indicadores basados en virus. Carrière, C. *et al.*, *Conditionally replicating luciferase reporter phages: Improved sensitivity for rapid detection and assessment of drug susceptibility of Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997. **35**(12): p. 3232-3239. Carrière *et al.* desarrollaron fagos indicadores de luciferasa de *M. tuberculosis*/vacuna antituberculosa (BCG) que tienen sus ciclos líticos suprimidos a 30 °C, pero activos a 37 °C. Usando este sistema, Carrière *et al.* han demostrado la detección de BCG usando indicadores de fagos con un ciclo lítico suprimido.

30 Sin embargo, existen desventajas asociadas con suprimir pero no eliminar las funciones de replicación del bacteriófago en los ensayos de indicadores basados en bacteriófagos. En primer lugar, controlar las funciones de replicación del bacteriófago impone condiciones de ensayo limitantes. Por ejemplo, el ciclo lítico del fago indicador phAE40 usado por Carrière *et al.* se reprimió cuando se usó el fago para infectar células a la temperatura no permisiva de 30 °C. Este requisito de temperatura impuso condiciones limitantes en el ensayo de indicador ya que la temperatura óptima para las bacterias diana era de 37 °C. Estas condiciones limitantes impiden el rendimiento de ensayo óptimo.

35 Además, las funciones de replicación del virus son difíciles de controlar. La replicación del virus se debe suprimir durante el uso de las partículas de transducción como sistema indicador. Por ejemplo, la actividad lítica del fago indicador phAE40 informada por Carrière *et al.* se redujo pero no se eliminó, dando como resultado un descenso en la señal de luciferasa en el ensayo. Carrière *et al.* destacaron las posibles causas para el descenso resultante en la señal indicadora, tales como los genes expresados en fagos intactos y limitaciones de temperatura del ensayo, todo derivado del hecho de que no se eliminó el ciclo lítico del indicador de fagos.

45 Se puede esperar que los ensayos de indicadores que se basan en el ciclo lisógeno natural de fagos presenten actividad lítica esporádicamente. Además, los ensayos que se basan en el ciclo lisógeno del fago pueden ser propensos a la inmunidad de sobreinfección de células diana ya lisogenizadas con un fago similar, así como sistemas de restricción del huésped natural que seleccionan el ácido nucleico del virus entrante, limitando así la gama de huéspedes de estos fagos indicadores.

50 En otros ejemplos, se diseñan sistemas de producción de partículas de transducción para empaquetar moléculas de ácido nucleico exógenas, pero la partícula de transducción a menudo contiene una combinación de moléculas de ácido nucleico exógenas y moléculas de ácido nucleico del virus descendiente natural. El virus natural puede presentar actividad lítica que es un impedimento para el rendimiento del ensayo, y la actividad lítica del virus se debe eliminar para purificar las partículas de transducción. Sin embargo, esta purificación en general no es posible. En el documento U.S. 2009/0155768 A, titulado *Reporter Plasmid Packaging System for Detection of Bacteria*, Scholl *et al.* describe el desarrollo de un sistema de partículas de transducción de este tipo. El producto del sistema es una combinación de partículas de transducción indicadoras y bacteriófago natural (figura 8 en la referencia). Aunque los autores indican que la partícula de transducción y el bacteriófago natural se pueden separar por ultracentrifugación, esta separación solo es posible en un sistema donde la partícula de transducción y el virus natural presentan diferentes densidades que permitirían la separación por ultracentrifugación. Aunque esta característica se presenta por el sistema de empaquetamiento basado en bacteriófago T7 descrito en la referencia, esta no es una característica que en general sea aplicable a otros sistemas de virus. Es común que el mecanismo de empaquetamiento vírico presente un empaquetamiento completo que daría como resultado que virus naturales y partículas de transducción presenten densidades indistinguibles que no se puedan separar por ultracentrifugación. Los sistemas de empaquetamiento de virus también se basan en una cantidad mínima de empaquetamiento como requisito para un ensamblaje estructural de virus apropiado que dé como resultado virus natural y partículas de transducción con densidades indistinguibles.

Por tanto, existe la necesidad de obtener partículas de transducción no replicativas que no sufran los efectos perjudiciales de las funciones líticas del virus y la posibilidad de limitarse por inmunidad de sobreinfección y mecanismos de restricción de huésped que seleccionan las moléculas de ácido nucleico del virus y las funciones víricas, todos estos pueden limitar el rendimiento del ensayo de indicador incrementando los límites de detección y dando como resultado resultados negativos falsos.

Incluso cuando se han genomanipulado partículas de transducción, los procedimientos para usar las partículas de transducción para detectar e indicar la presencia de moléculas de ácido nucleico diana en las células tienen limitaciones. Algunos procedimientos requieren la alteración de la célula y técnicas engorrosas para aislar y detectar transcritos en el lisado. Los procedimientos de detección incluyen usar sondas marcadas tales como anticuerpos, aptámeros o sondas de ácido nucleico. Las sondas marcadas dirigidas a un gen diana pueden dar como resultado una unión inespecífica a dianas no previstas o generar señales que tienen una proporción señal/ruido alta. Por lo tanto, existe la necesidad de obtener procedimientos específicos, eficaces y exactos para la detección y para indicar moléculas de ácido nucleico endógeno en células.

En consecuencia, se necesitan procedimientos y sistemas para generar partículas de transducción no replicativas que permitan el empaquetamiento y la expresión de moléculas indicadoras en células, mientras se elimina el virus descendiente competente en la replicación. También se necesitan procedimientos eficaces y exactos para detectar moléculas en células usando las moléculas indicadoras expresadas.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La invención proporciona un sistema de empaquetamiento de célula bacteriana para empaquetar una molécula de ácido nucleico indicadora en una partícula de transducción no replicativa, comprendiendo dicho sistema de empaquetamiento de célula bacteriana una célula bacteriana huésped que comprende

- un genoma de bacteriófago lisogenizado que comprende un primer gen de bacteriófago que comprende una delección de una secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento de dicho primer gen de bacteriófago que evita el empaquetamiento de una molécula de ácido nucleico de bacteriófago en dicha partícula de transducción no replicativa; y

- un plásmido que comprende una molécula de ácido nucleico indicadora que comprende un gen indicador y un segundo gen de bacteriófago que comprende una segunda secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento que facilita el empaquetamiento de una réplica de dicho plásmido que comprende dicha molécula de ácido nucleico indicadora en dicha partícula de transducción no replicativa,

en el que dicho segundo gen de bacteriófago codifica una proteína, en el que dicha réplica de dicho plásmido que comprende una molécula de ácido nucleico indicadora forma un replicón para empaquetarse en dicha partícula de transducción no replicativa.

La invención proporciona un sistema de empaquetamiento de célula bacteriana para empaquetar una molécula de ácido nucleico indicadora en una partícula de transducción no replicativa, comprendiendo dicho sistema de empaquetamiento de célula bacteriana una célula bacteriana huésped que comprende:

- un genoma de bacteriófago lisogenizado que carece de un gen de bacteriófago que codifica que comprende una secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento, en el que la delección de dicho gen de bacteriófago evita el empaquetamiento de una molécula de ácido nucleico de bacteriófago en dicha partícula de transducción no replicativa; y

- un plásmido que comprende una molécula de ácido nucleico indicadora que comprende un gen indicador y un segundo gen de bacteriófago, en el que dicho segundo gen de bacteriófago codifica una secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento y facilita el empaquetamiento de una réplica de dicho plásmido que comprende dicha molécula de ácido nucleico indicadora en dicha partícula de transducción no replicativa, en el que dicho segundo gen de bacteriófago puede expresar una proteína que se codifica por dicho gen, en el que dicha réplica de dicho plásmido que comprende una molécula de ácido nucleico indicadora forma un replicón susceptible de empaquetarse en dicha partícula de transducción no replicativa.

La invención proporciona un sistema de empaquetamiento de célula bacteriana para empaquetar una molécula de ácido nucleico indicadora en una partícula de transducción no replicativa, comprendiendo dicho sistema de empaquetamiento de célula bacteriana una célula bacteriana huésped que comprende:

- un genoma de bacteriófago lisogenizado que comprende una primera secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento de bacteriófago, en el que dicha primera secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento de bacteriófago comprende una mutación sinónima que evita la escisión de la secuencia de iniciación de empaquetamiento, pero no altera la expresión del producto génico que engloba la secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento y evita el empaquetamiento de una molécula de ácido nucleico de bacteriófago en dicha partícula

de transducción no replicativa; y

- un plásmido que comprende una molécula de ácido nucleico indicadora que comprende un gen indicador y que comprende una segunda secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento de bacteriófago, en el que dicha segunda secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento de bacteriófago carece de dicha mutación y facilita el empaquetamiento de una réplica de dicho plásmido que comprende dicha molécula de ácido nucleico indicadora en dicha partícula de transducción no replicativa, en el que dicha réplica de dicho plásmido que comprende dicha molécula de ácido nucleico indicadora forma un replicón para empaquetarse en dicha partícula de transducción no replicativa.

La invención proporciona además un procedimiento para empaquetar una molécula de ácido nucleico indicadora en una partícula de transducción no replicativa, que comprende:

- proporcionar condiciones a dicho sistema de empaquetamiento de célula bacteriana de cualquiera de las reivindicaciones precedentes que inducen una fase lítica de dicho bacteriófago para producir partículas de transducción no replicativas empaquetadas con dicho plásmido que comprende dicha molécula de ácido nucleico indicadora; y

- aislar dicha partícula de transducción no replicativa que comprende una réplica de dicho plásmido de molécula de ácido nucleico indicadora.

En el presente documento se divulga un sistema de empaquetamiento de célula bacteriana para empaquetar una molécula de ácido nucleico indicadora en una partícula de transducción no replicativa, comprendiendo dicha célula bacteriana un genoma de bacteriófago lisogenizado que carece de un gen de bacteriófago que codifica una secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento, en el que la delección de dicho gen de bacteriófago evita el empaquetamiento de una molécula de ácido nucleico de bacteriófago en dicha partícula de transducción no replicativa; y una molécula de ácido nucleico indicadora que comprende un segundo gen de bacteriófago, en el que dicho segundo gen de bacteriófago codifica una secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento y facilita el empaquetamiento de una réplica de dicha molécula de ácido nucleico indicadora en dicha partícula de transducción no replicativa, en el que dicho segundo gen de bacteriófago puede expresar una proteína que se codifica por dicho gen, en el que dicha réplica de dicha molécula de ácido nucleico indicadora forma un replicón susceptible de empaquetarse en dicha partícula de transducción no replicativa.

En algunos modos de realización, la molécula de ácido nucleico indicadora se enlaza funcionalmente a un promotor. En otro modo de realización, el promotor se selecciona para contribuir a la reactividad de una molécula indicadora expresada a partir de dicha molécula de ácido nucleico indicadora en dicha célula bacteriana. En un modo de realización, la molécula de ácido nucleico indicadora comprende un origen de replicación. Aún en otro modo de realización, el replicón comprende un concatámero susceptible de empaquetarse en dicha partícula de transducción no replicativa.

En un modo de realización, el primer y dicho segundo genes de bacteriófago comprende cada uno un gen *pacA* del bacteriófago P1 de *Enterobacteriaceae* y comprende dicha secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento. En un modo de realización, el segundo gen de bacteriófago comprende la secuencia de SEQ ID NO:9. En otro modo de realización, el replicón es el replicón lítico de bacteriófago P1 de *Enterobacteriaceae*. En determinados modos de realización, el replicón comprende un promotor P53 controlado por represor C1, un promotor P53 antisentido, un gen *repL* y una delección sin cambio de pauta de lectura de un gen *kilA*. En un modo de realización, el replicón comprende la secuencia de SEQ ID NO:3.

Aún en otro modo de realización, el primer y dicho segundo genes de bacteriófago comprende cada uno un gen de la terminasa pequeña (*terS*) que comprende dicha secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento. En un modo de realización, el gen *terS* es un gen *terS* del bacteriófago ϕ 11 o ϕ 80 α de *S. aureus*.

En otro modo de realización, el replicón se deriva de un origen de replicación del plásmido pT181 de *S. aureus*. Aún en otro modo de realización, el replicón comprende la secuencia de SEQ ID NO:5. En algunos modos de realización, la secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento de dicho segundo gen de bacteriófago comprende un sitio *pac*. En otros modos de realización, el sitio *pac* de dicho segundo gen de bacteriófago comprende la secuencia de SEQ ID NO:7. En un aspecto, la secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento de dicho segundo gen de bacteriófago comprende un sitio *cos*. En otro aspecto, la secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento de dicho segundo gen de bacteriófago comprende una unión concatamérica.

En otro aspecto, un plásmido comprende dicha molécula de ácido nucleico indicadora. En un aspecto, el segundo gen de bacteriófago se enlaza funcionalmente a un promotor. En otro modo de realización, el promotor es un promotor inducible o un promotor constitutivo. En un modo de realización, el bacteriófago comprende el bacteriófago P1 de *Enterobacteriaceae*. Aún en otro modo de realización, el bacteriófago comprende un bacteriófago ϕ 80 α o un bacteriófago ϕ 11 de *S. aureus*. En un aspecto, la célula bacteriana comprende una célula de *E. coli*. En otro aspecto, la célula bacteriana comprende una célula de *S. aureus*. Aún en otro modo de realización, la célula bacteriana

comprende una célula gramnegativa. En otros modos de realización, la célula bacteriana comprende una célula grampositiva.

En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico indicadora comprende un gen indicador. En un aspecto, el gen indicador codifica un marcador detectable y/o seleccionable. En determinados aspectos, el gen indicador se selecciona del grupo que consiste en enzimas que median en reacciones de luminiscencia (luxA, luxB, luxAB, luc, ruc, nluc), enzimas que median en reacciones colorimétricas (lacZ, HRP), proteínas fluorescentes (GFP, eGFP, YFP, RFP, CFP, BFP, mCherry, proteínas fluorescentes en infrarrojo cercano), péptidos de afinidad (marca His, 3X-FLAG) y marcadores seleccionables (ampC, tet(M), CAT, erm). En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico indicadora comprende un aptámero. Aún en otro aspecto, la molécula de ácido nucleico indicadora comprende una secuencia de transcrito de ácido nucleico que es complementaria a una segunda secuencia en dicha molécula de ácido nucleico indicadora.

En un modo de realización, la secuencia de transcrito de ácido nucleico es complementaria a un transcrito celular. En otro modo de realización, la secuencia de transcrito de ácido nucleico comprende una secuencia de represión cis. Aún en otro modo de realización, la réplica de dicha molécula de ácido nucleico indicadora comprende una secuencia de transcrito de ácido nucleico que es complementaria a una segunda secuencia en dicha réplica de dicha molécula de ácido nucleico indicadora, en la que la secuencia de transcrito de ácido nucleico es complementaria a un transcrito celular y en la que dicha secuencia de transcrito de ácido nucleico comprende una secuencia de represión cis.

En algunos modos de realización, el procedimiento para empaquetar una molécula de ácido nucleico indicadora en una partícula de transducción no replicativa, que comprende proporcionar condiciones a dicha célula bacteriana descrita en el presente documento que inducen una fase lítica de dicho bacteriófago para producir partículas de transducción no replicativas empaquetadas con dicha molécula de ácido nucleico indicadora; y aislar dicha partícula de transducción no replicativa que comprende dicha molécula de ácido nucleico indicadora. En un modo de realización, la partícula de transducción no replicativa no contiene un genoma de bacteriófago replicado. En otro modo de realización, la inducción de dicha fase lítica desencadena la escisión de dicha molécula de ácido nucleico de isla genómica de dicho genoma de dicha célula bacteriana.

En otro modo de realización, la composición que comprende dicha partícula de transducción no replicativa que comprende una réplica de dicha molécula de ácido nucleico indicadora producida a partir del procedimiento descrito en el presente documento.

La divulgación comprende un sistema de empaquetamiento de célula bacteriana para empaquetar una molécula de ácido nucleico indicadora en una partícula de transducción no replicativa, comprendiendo dicha célula bacteriana un genoma de bacteriófago lisogenizado que comprende una primera secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento de bacteriófago, en el que dicha primera secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento de bacteriófago comprende una mutación que evita el empaquetamiento de una molécula de ácido nucleico de bacteriófago en dicha partícula de transducción no replicativa; y una molécula de ácido nucleico indicadora que comprende una segunda secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento de bacteriófago, en el que dicha segunda secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento de bacteriófago carece de dicha mutación y facilita el empaquetamiento de una réplica de dicha molécula de ácido nucleico indicadora en dicha partícula de transducción no replicativa, en el que dicha réplica de dicha molécula de ácido nucleico indicadora forma un replicón para empaquetarse en dicha partícula de transducción no replicativa.

En un modo de realización, la molécula de ácido nucleico indicadora se enlaza funcionalmente a un promotor. En otro modo de realización, el promotor se selecciona para contribuir a la reactividad de una molécula indicadora expresada a partir de dicha molécula de ácido nucleico indicadora en dicha célula bacteriana. Aún en otro modo de realización, la molécula de ácido nucleico indicadora comprende un origen de replicación. En un modo de realización, el replicón comprende un concatámero susceptible de empaquetarse en dicha partícula de transducción no replicativa. En otro aspecto, la primera y dicha segunda segundas secuencias del sitio de iniciación de empaquetamiento de bacteriófago comprenden cada una una secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento de un gen de la terminasa pequeña. En un aspecto, la primera y dicha segunda segundas secuencias del sitio de iniciación de empaquetamiento de bacteriófago comprenden cada una una secuencia del sitio pac de un gen pacA del bacteriófago P1 de *Enterobacteriaceae*. En otro aspecto, la primera secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento de bacteriófago comprende SEQ ID NO:2. Aún en otro aspecto, la segunda secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento de bacteriófago comprende SEQ ID NO:1. En un modo de realización, el replicón comprende un replicón lítico del bacteriófago P1 de *Enterobacteriaceae*. En otro modo de realización, el replicón comprende un promotor P53 controlado por represor C1, un promotor P53 antisentido, un gen repL y una delección sin cambio de pauta de lectura de un gen kilA. En otro aspecto, el replicón comprende la secuencia de SEQ ID NO:3. En determinados aspectos, la primera y dicha segunda secuencias del sitio de iniciación de empaquetamiento de bacteriófago comprenden cada una una secuencia del sitio pac de un gen de la terminasa pequeña (terS) de un bacteriófago ϕ 11 o ϕ 80 α de *S. aureus*. En otro aspecto, el replicón se deriva de un origen de replicación del plásmido pT181 de *S. aureus*. Aún en otro aspecto, el replicón comprende la secuencia de SEQ ID NO:5. En un aspecto, la primera secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento de bacteriófago comprende la secuencia

de SEQ ID NO:2. En algunos modos de realización, la segunda secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento de bacteriófago comprende la secuencia de SEQ ID NO:1. En otros modos de realización, la secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento comprende un sitio pac. En otro modo de realización, la secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento comprende un sitio cos. Aún en otro modo de realización, la secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento comprende una unión concatamérica. En algunos modos de realización, la mutación en dicha primera secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento de bacteriófago comprende una mutación sinónima. En otro modo de realización, la mutación en dicha primera secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento de bacteriófago evita la escisión de dicha secuencia de iniciación de empaquetamiento. En otro modo de realización, un plásmido comprende dicha molécula de ácido nucleico indicadora. En un modo de realización, el bacteriófago comprende el bacteriófago P1 de *Enterobacteriaceae*.

En otro modo de realización, el bacteriófago comprende el bacteriófago $\phi 11$ o $\phi 80\alpha$ de *S. aureus*. En un modo de realización, la célula bacteriana comprende una célula de *E. coli*. En otro modo de realización, la célula bacteriana comprende una célula de *S. aureus*. En algunos modos de realización, la célula bacteriana comprende una célula bacteriana gramnegativa. En un aspecto, la célula bacteriana comprende una célula bacteriana grampositiva. En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico indicadora comprende un gen indicador. Aún en otro aspecto, el gen indicador codifica un marcador detectable y/o un marcador seleccionable.

En otros aspectos, el gen indicador se selecciona del grupo que consiste en: genes que codifican enzimas que median en reacciones de luminiscencia (*luxA*, *luxB*, *luxAB*, *luc*, *ruc*, *nLuc*), genes que codifican enzimas que median en reacciones colorimétricas (*lacZ*, *HRP*), genes que codifican proteínas fluorescentes (GFP, eGFP, YFP, RFP, CFP, BFP, mCherry, proteínas fluorescentes en 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*). En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico indicadora comprende un aptámero. En otros aspectos, el replicón se empaqueta en dicha partícula de transducción no replicativa por mecanismo de empaquetamiento de bacteriófago. En algunos modos de realización, la molécula de ácido nucleico indicadora comprende una secuencia de transcrito de ácido nucleico que es complementaria a una segunda secuencia en dicha molécula de ácido nucleico indicadora. En otro modo de realización, la secuencia de transcrito de ácido nucleico es complementaria a un transcrito celular.

En un aspecto, la secuencia de transcrito de ácido nucleico comprende una secuencia de represión cis. En otro aspecto, la réplica de dicha molécula de ácido nucleico indicadora comprende una secuencia de transcrito de ácido nucleico que es complementaria a una segunda secuencia en dicha réplica de dicha molécula de ácido nucleico indicadora, en la que dicha secuencia de transcrito de ácido nucleico es complementaria a un transcrito celular, y en la que dicha secuencia de transcrito de ácido nucleico comprende una secuencia de represión cis.

En determinados aspectos, el procedimiento para empaquetar una molécula de ácido nucleico indicadora en una partícula de transducción no replicativa, que comprende: proporcionar condiciones a dicha célula bacteriana descrita en el presente documento que inducen una fase lítica de dicho bacteriófago para producir partículas de transducción no replicativas empaquetadas con dicha molécula de ácido nucleico indicadora; y aislar dicha partícula de transducción no replicativa que comprende dicha molécula de ácido nucleico indicadora.

En otros aspectos, la partícula de transducción no replicativa no contiene un genoma de bacteriófago replicado. En un aspecto, la inducción de dicha fase lítica desencadena la escisión de dicha molécula de ácido nucleico de isla genómica de dicho genoma de dicha célula bacteriana.

En otro aspecto, la divulgación comprende una composición que comprende dicha partícula de transducción no replicativa que comprende una réplica de dicha molécula de ácido nucleico indicadora producida a partir de dicho procedimiento descrito en el presente documento.

En un aspecto, la divulgación incluye un sistema de empaquetamiento de célula bacteriana para empaquetar una molécula de ácido nucleico indicadora en una partícula de transducción no replicativa, comprendiendo dicha célula bacteriana: un genoma de bacteriófago lisogenizado que comprende un primer gen de bacteriófago que comprende una delección de una secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento de dicho primer gen de bacteriófago que evita el empaquetamiento de una molécula de ácido nucleico de bacteriófago en dicha partícula de transducción no replicativa; y una molécula de ácido nucleico indicadora que comprende un segundo gen de bacteriófago que comprende una segunda secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento que facilita el empaquetamiento de una réplica de dicha molécula de ácido nucleico indicadora en dicha partícula de transducción no replicativa, en el que dicho segundo gen de bacteriófago codifica una proteína, en el que dicha réplica de dicha molécula de ácido nucleico indicadora forma un replicón para empaquetarse en dicha partícula de transducción no replicativa.

En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico indicadora se enlaza funcionalmente a un promotor. En un aspecto, el promotor se selecciona para contribuir a la reactividad de una molécula indicadora expresada a partir de dicha molécula de ácido nucleico indicadora en dicha célula bacteriana. En determinados aspectos, el ácido nucleico indicadora comprende un origen de replicación. En otro aspecto, el replicón comprende un concatámero susceptible de empaquetarse en dicha partícula de transducción no replicativa. En un aspecto, el primer y dicho segundo genes

de bacteriófago comprende cada uno un gen *pacA* del bacteriófago P1 de *Enterobacteriaceae* y comprenden dicha secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento. En otro aspecto, el primer gen de bacteriófago comprende la secuencia de SEQ ID NO:6. En determinados aspectos, el segundo gen de bacteriófago comprende la secuencia SEQ ID NO:7. En un aspecto, el replicón comprende un replicón lítico del bacteriófago P1 de *Enterobacteriaceae*.
 5 Aún en otro aspecto, el replicón comprende un promotor P53 controlado por represor C1, un promotor P53 antisentido, un gen *repL* y una delección sin cambio de pauta de lectura de un gen *kilA*. En otro aspecto, el replicón comprende la secuencia de SEQ ID NO:3. En otros aspectos, el primer y dicho segundo genes de bacteriófago comprende cada uno un gen de la terminasa pequeña (*terS*) que comprende dicha secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento. En un aspecto, el gen *terS* es un gen *terS* del bacteriófago $\phi 11$ o $\phi 80\alpha$ de *S. aureus*. En otro
 10 aspecto, el primer gen de bacteriófago comprende la secuencia de SEQ ID NO:8. Aún en otro aspecto, el segundo gen de bacteriófago comprende la secuencia de SEQ ID NO:9. En un aspecto, el replicón se deriva de un origen de replicación del plásmido pT181 de *S. aureus*. En un modo de realización, el replicón comprende la secuencia de SEQ ID NO:5. En otro modo de realización, la secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento de dicho segundo gen de bacteriófago comprende un sitio *pac*. Aún en otro modo de realización, la secuencia del sitio de
 15 iniciación de empaquetamiento de dicho segundo gen de bacteriófago comprende un sitio *cos*.

En determinados modos de realización, la secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento de dicho segundo gen de bacteriófago comprende una unión concatamérica. En un modo de realización, un plásmido comprende dicha molécula de ácido nucleico indicadora. En otro modo de realización, el segundo gen de bacteriófago se enlaza funcionalmente a un promotor. Aún en otro modo de realización, el promotor es un promotor inducible o un promotor constitutivo. En determinados modos de realización, el bacteriófago comprende el bacteriófago P1 de *Enterobacteriaceae*. En un modo de realización, el bacteriófago comprende el bacteriófago $\phi 80\alpha$ o bacteriófago $\phi 11$ de *S. aureus*. En otros modos de realización, la célula bacteriana comprende una célula de *E. coli*. En otro modo de realización, la célula bacteriana comprende una célula de *S. aureus*. En un modo de realización, la célula bacteriana
 20 comprende una célula gramnegativa. En otro modo de realización, la célula bacteriana comprende una célula grampositiva.

En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico indicadora comprende un gen indicador. En un aspecto, el gen indicador codifica un marcador detectable y/o seleccionable. En otro aspecto, el gen indicador se selecciona del grupo que consiste en: genes que codifican enzimas que median en reacciones de luminiscencia (*luxA*, *luxB*, *luxAB*, *luc*, *ruc*, *nluc*), genes que codifican enzimas que median en reacciones colorimétricas (*lacZ*, *HRP*), genes que codifican proteínas fluorescentes (GFP, eGFP, YFP, RFP, CFP, BFP, mCherry, proteínas fluorescentes en 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*). En un modo de realización, la molécula de ácido
 30 nucleico indicadora comprende un aptámero. En otro modo de realización, el replicón se empaqueta en dicha partícula de transducción no replicativa por mecanismo de empaquetamiento de bacteriófago. Aún en otro modo de realización, la molécula de ácido nucleico indicadora comprende una secuencia de transcrito de ácido nucleico que es complementaria a una segunda secuencia en dicha molécula de ácido nucleico indicadora. En un modo de realización, la secuencia de transcrito de ácido nucleico es complementaria a un transcrito celular. En otro modo de
 35 realización, la secuencia de transcrito de ácido nucleico comprende una secuencia de represión *cis*. En determinados modos de realización, la réplica de dicha molécula de ácido nucleico indicadora comprende una secuencia de transcrito de ácido nucleico que es complementaria a una segunda secuencia en dicha réplica de dicha molécula de ácido nucleico indicadora, en la que dicha secuencia de transcrito de ácido nucleico es complementaria a un transcrito celular, y en la que dicha secuencia de transcrito de ácido nucleico comprende una
 40 secuencia de represión *cis*.
 45

La invención divulga un procedimiento para empaquetar una molécula de ácido nucleico indicadora en una partícula de transducción no replicativa, que comprende: proporcionar condiciones a dicha célula bacteriana de cualquiera de las reivindicaciones 86-125 que inducen una fase lítica de dicho bacteriófago para producir partículas de transducción no replicativas empaquetadas con dicha molécula de ácido nucleico indicadora; y aislar dicha partícula de transducción no replicativa que comprende dicha molécula de ácido nucleico indicadora. En un modo de realización, la partícula de transducción no replicativa no contiene un genoma de bacteriófago replicado. En otro modo de realización, la inducción de dicha fase lítica desencadena la escisión de dicha molécula de ácido nucleico de isla genómica de dicho genoma de dicha célula bacteriana.
 50
 55

En algunos aspectos, la divulgación incluye una composición que comprende dicha partícula de transducción no replicativa que comprende una réplica de dicha molécula de ácido nucleico indicadora producida a partir de dicho procedimiento descrito en el presente documento.

En otro aspecto, la divulgación incluye un sistema de empaquetamiento de célula bacteriana para empaquetar una molécula de ácido nucleico indicadora en una partícula de transducción no replicativa, comprendiendo dicha célula bacteriana: un genoma de bacteriófago lisogenizado que carece de un gen de empaquetamiento y que comprende genes que codifican proteínas que forman dicha partícula de transducción no replicativa; y una molécula de ácido nucleico de isla genómica que comprende una molécula de ácido nucleico indicadora y un gen de empaquetamiento.
 60
 65 En un aspecto, el gen de empaquetamiento comprende un gen de la terminasa pequeña (*terS*). El gen *terS* comprende un gen *terS* de bacteriófago $\phi 80\alpha$ o un gen *terS* de bacteriófago $\phi 11$ de *S. aureus*.

En un aspecto, el gen *terS* comprende la secuencia de SEQ ID NO:9. En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico de isla genómica comprende una molécula de ácido nucleico de isla genómica SaPIbov2. Aún en otro aspecto, la molécula de ácido nucleico de isla genómica se selecciona del grupo que consiste en una molécula de ácido nucleico de isla genómica SaPI, SaPI1, SaPI2, SaPIbov1 y SaPIbov2. En otro modo de realización, la molécula de ácido nucleico indicadora se enlaza funcionalmente a un promotor. Aún en otro modo de realización, la molécula de ácido nucleico indicadora comprende un origen de replicación. En algunos modos de realización, el bacteriófago comprende un bacteriófago $\phi 80\alpha$ o bacteriófago $\phi 11$ de *S. aureus*. En otros modos de realización, la célula bacteriana comprende una célula de *S. aureus*. En un modo de realización, la molécula de ácido nucleico de isla genómica comprende un gen de la integrasa y en la que dicho gen de la integrasa codifica una proteína integrasa para escindir e integrar dicha molécula de ácido nucleico de isla genómica fuera y dentro de un genoma bacteriano de dicha célula bacteriana. En otro modo de realización, el gen de la integrasa comprende la secuencia de SEQ ID NO:10. Aún en otro modo de realización, la molécula de ácido nucleico de isla genómica se integra en un genoma bacteriano de dicha célula bacteriana.

En determinados aspectos, la molécula de ácido nucleico de isla genómica se puede replicar y forma un replicón de molécula que es susceptible de empaquetarse por el mecanismo de empaquetamiento de bacteriófago en dicha célula bacteriana. En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico forma un concatámero. Aún en otro aspecto, la molécula de ácido nucleico de isla genómica replicada puede empaquetarse en dicha partícula de transducción no replicativa. En determinados aspectos, el gen de empaquetamiento comprende una secuencia del sitio *pac*. En otro aspecto, el gen de empaquetamiento comprende una secuencia del sitio *cos*. Aún en otro modo de realización, el gen de empaquetamiento comprende una unión concatamérica.

En otros modos de realización, la molécula de ácido nucleico indicadora comprende un gen indicador. En algunos modos de realización, el gen indicador codifica un marcador seleccionable y/o un marcador seleccionable. En otro modo de realización, el gen indicador se selecciona del grupo que consiste en enzimas que median en reacciones de luminiscencia (*luxA*, *luxB*, *luxAB*, *luc*, *ruc*, *nluc*), enzimas que median en reacciones colorimétricas (*lacZ*, *HRP*), proteínas fluorescentes (*GFP*, *eGFP*, *YFP*, *RFP*, *CFP*, *BFP*, *mCherry*, proteínas fluorescentes en infrarrojo cercano), péptidos de afinidad (marca *His*, *3X-FLAG*) y marcadores seleccionables (*ampC*, *tet(M)*, *CAT*, *erm*). En determinados modos de realización, la molécula de ácido nucleico indicadora comprende un aptámero. En otros modos de realización, la molécula de ácido nucleico de isla genómica carece de un gen de la integrasa. En otro modo de realización, la divulgación incluye un gen bacteriano que comprende un gen de la integrasa enlazado funcionalmente a un promotor y en el que dicho gen de la integrasa codifica una proteína integrasa para escindir e integrar dicha molécula de ácido nucleico de isla genómica fuera y dentro de un genoma bacteriano de dicha célula bacteriana. En un modo de realización, la molécula de ácido nucleico indicadora comprende una secuencia de transcrito de ácido nucleico que es complementaria a una segunda secuencia en dicha molécula de ácido nucleico indicadora. En otros modos de realización, la secuencia de transcrito de ácido nucleico es complementaria a un transcrito celular. Aún en otros modos de realización, la secuencia de transcrito de ácido nucleico comprende una secuencia de represión *cis*. En otro modo de realización, la réplica de dicha molécula de ácido nucleico indicadora comprende una secuencia de transcrito de ácido nucleico que es complementaria a una segunda secuencia en dicha réplica de dicha molécula de ácido nucleico indicadora. En otros modos de realización, la secuencia de transcrito de ácido nucleico es complementaria a un transcrito celular. En otros modos de realización, la secuencia de transcrito de ácido nucleico comprende una secuencia de represión *cis*.

La invención divulga un procedimiento para empaquetar una molécula de ácido nucleico indicadora en una partícula de transducción no replicativa, que comprende: proporcionar condiciones a dicha célula bacteriana de cualquiera de las reivindicaciones 130-160 que inducen una fase lítica de dicho bacteriófago para producir partículas de transducción no replicativas empaquetadas con dicha molécula de ácido nucleico indicadora; y aislar dicha partícula de transducción no replicativa que comprende dicha molécula de ácido nucleico indicadora. En algunos modos de realización, la partícula de transducción no replicativa no contiene un genoma de bacteriófago replicado. En un modo de realización, la inducción de dicha fase lítica desencadena la escisión de dicha molécula de ácido nucleico de isla genómica de dicho genoma de dicha célula bacteriana.

En otro modo de realización, la divulgación incluye una composición que comprende dicha partícula de transducción no replicativa que comprende una réplica de dicha molécula de ácido nucleico indicadora producida a partir de dicho procedimiento descrito en el presente documento.

La invención también divulga un procedimiento para detectar una presencia o una ausencia de una célula bacteriana en una muestra, que comprende: introducir en una muestra una partícula de transducción no replicativa que comprende un gen indicador que codifica una molécula indicadora y que carece de un genoma de bacteriófago en condiciones tales que dicha partícula de transducción no replicativa puede transducir dicha célula bacteriana y en el que dicho gen indicador se puede expresar en dicha célula bacteriana; proporcionar condiciones para la activación de dicha molécula indicadora; y detectar una presencia o una ausencia de una señal indicadora transmitida a partir de dicha molécula indicadora expresada, en el que una presencia de dicha señal indicadora indica correctamente dicha presencia de dicha célula bacteriana.

En un modo de realización, el procedimiento logra al menos un 80 % de especificidad de detección con referencia a un estándar, al menos un 90 % de especificidad de detección con referencia a un estándar, o al menos un 95 % de especificidad de detección con referencia a un estándar. En otro modo de realización, el procedimiento logra al menos un 80 % de sensibilidad de detección con referencia a un estándar, al menos un 85 % de sensibilidad de detección con referencia a un estándar, o al menos un 90 % de sensibilidad de detección con referencia a un estándar, o al menos un 95 % de sensibilidad de detección con referencia a un estándar. Aún en otro modo de realización, el procedimiento logra al menos un 95 % de especificidad de detección y al menos un 90 % de sensibilidad de detección con referencia a un estándar. En otro modo de realización, el estándar es un estándar de referencia. Aún en otro modo de realización, la célula bacteriana comprende una célula de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM). En otros modos de realización, la célula bacteriana comprende una célula de *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina (SASM).

En otro modo de realización, el gen indicador codifica un marcador detectable o seleccionable. En un modo de realización, el gen indicador se selecciona del grupo que consiste en: genes que codifican enzimas que median en reacciones de luminiscencia (luxA, luxB, luxAB, luc, ruc, nluc), genes que codifican enzimas que median en reacciones colorimétricas (lacZ, HRP), genes que codifican proteínas fluorescentes (GFP, eGFP, YFP, RFP, CFP, BFP, mCherry, proteínas fluorescentes en 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). En un modo de realización, el gen indicador se enlaza funcionalmente a un promotor constitutivo.

En otro aspecto, la señal indicadora se puede detectar a partir de una muestra en un límite de detección (LdD) de menos de 1.000 unidades formadoras de colonias (UFC). En otros aspectos, la señal indicadora se puede detectar a partir de una muestra en un límite de detección (LdD) de menos de 100 unidades formadoras de colonias (UFC). En un aspecto, la señal indicadora se puede detectar a partir de una muestra en un límite de detección (LdD) de menos de 10 unidades formadoras de colonias (UFC). En otros aspectos, la señal indicadora se puede detectar a partir de una muestra en un LdD de menos de cinco UFC. En otro aspecto, la señal indicadora se puede detectar a partir de una muestra en un LdD de tres o menos UFC.

En un modo de realización, el procedimiento incluye proporcionar un antibiótico a dicha muestra a una concentración predeterminada y detectar una presencia o ausencia de dicha señal indicadora para determinar si dicha célula bacteriana es resistente o sensible a dicho antibiótico. En otro modo de realización, el procedimiento incluye proporcionar concentraciones predeterminadas variables antibióticas a dicha muestra y detectar la cantidad de dicha señal indicadora para determinar la concentración inhibidora mínima de dicha célula bacteriana para dicho antibiótico.

En un aspecto, la divulgación incluye una composición que comprende una construcción de ácido nucleico que codifica un transcrito indicador de ácido nucleico que puede formar al menos dos conformaciones que comprenden una primera conformación que evita la expresión de indicador que comprende una región bicatenaria intramolecular que comprende una primera subsecuencia y una segunda subsecuencia, y una segunda conformación que carece de dicha región bicatenaria intramolecular y permite la expresión del gen indicador, en la que la conversión entre dichas primera y segunda conformaciones está mediada por la unión competitiva de un transcrito celular a dicha primera y/o dicha segunda subsecuencia.

En otro aspecto, la divulgación incluye una partícula de transducción no replicativa que comprende dicha construcción de ácido nucleico. Aún en otro aspecto, la unión competitiva de dicho transcrito celular a dicha primera y/o dicha segunda subsecuencia da como resultado dicha segunda conformación de dicha construcción indicadora de ácido nucleico. En un aspecto, la primera subsecuencia o dicha segunda subsecuencia comprende una secuencia de represión cis. En otro aspecto, la secuencia de represión cis comprende una secuencia que es complementaria o sustancialmente complementaria a una porción de dicho transcrito celular. En otros aspectos, la primera subsecuencia o dicha segunda subsecuencia comprende una secuencia de gen indicador. Aún en otro aspecto, la secuencia de gen indicador comprende un sitio de unión a ribosoma. En otros aspectos, la secuencia de gen indicador codifica una molécula detectable. En otro aspecto, el marcador detectable comprende una molécula fluorescente o una enzima que puede mediar en una reacción de luminiscencia o colorimétrica. En un modo de realización, la secuencia de gen indicador codifica un marcador seleccionable. En otro modo de realización, el marcador seleccionable comprende un gen de resistencia a antibióticos.

En otros modos de realización, la primera subsecuencia y dicha segunda subsecuencia se localizan cis entre sí en dicha construcción de ácido nucleico para formar dicha región bicatenaria intramolecular. En determinados modos de realización, la primera subsecuencia y dicha segunda subsecuencia son complementarias o sustancialmente complementarias entre sí para formar dicha región bicatenaria intramolecular. En un modo de realización, la primera subsecuencia o dicha segunda subsecuencia de dicha primera conformación comprende una secuencia potenciadora transcripcional, y en la que dicha secuencia potenciadora transcripcional está hacia 5' de una región codificante de dicha secuencia de gen indicador. En otro modo de realización, la primera conformación de dicho transcrito indicador de ácido nucleico se puede unir a una enzima de escisión. En otros modos de realización, la primera conformación de dicho transcrito indicador de ácido nucleico es una diana para degradación por una enzima celular. En otros aspectos, la primera conformación comprende una región intramolecular sin unión. En otro aspecto,

la región intramolecular sin unión se localiza en 3' de dicha primera subsecuencia y en 5' de dicha segunda subsecuencia. En otros aspectos, la región intramolecular sin unión comprende una secuencia YUNR, en la que Y es una pirimidina, U es un uracilo, N es cualquier nucleótido y R es una purina.

5 En un modo de realización, la primera subsecuencia o dicha segunda subsecuencia comprende una secuencia modificada de dicho transcrito celular. En otro modo de realización, la secuencia modificada comprende una sustitución nucleotídica. Aún en otro modo de realización, la secuencia modificada comprende una inserción de secuencia, una delección o una inversión de dicho transcrito celular.

10 El procedimiento incluye una composición que comprende una construcción de ácido nucleico que codifica un transcrito indicador de ácido nucleico que comprende una secuencia indicadora de gen y que puede formar al menos dos conformaciones de dicho transcrito indicador de ácido nucleico, una primera conformación inestable que evita la traducción de dicha secuencia de gen indicador en dicho transcrito indicador de ácido nucleico, y una segunda conformación estable que resulta de la unión de dicha primera conformación inestable con un transcrito celular, permitiendo dicha segunda conformación secundaria estable la traducción de dicha secuencia de gen indicador de dicho transcrito indicador de ácido nucleico.

15 En un modo de realización, la composición comprende una partícula de transducción no replicativa que comprende dicha construcción de ácido nucleico. En otro modo de realización, el transcrito celular se une a una secuencia 3'UTR de dicho transcrito indicador de ácido nucleico. En un modo de realización, la segunda conformación secundaria estable se forma por escisión de una porción de una secuencia de dicha primera conformación secundaria inestable. En otro modo de realización, la secuencia de gen indicador codifica una molécula detectable. En algunos modos de realización, el marcador detectable comprende una molécula fluorescente o una enzima que puede mediar en una reacción de luminiscencia o colorimétrica. En otros modos de realización, la secuencia de gen indicador codifica un marcador seleccionable. En otro modo de realización, el marcador seleccionable comprende un gen de resistencia a antibióticos.

20 La divulgación también incluye una composición que comprende una construcción de ácido nucleico que codifica un transcrito indicador de ácido nucleico que comprende una secuencia de gen indicador y que puede formar al menos dos conformaciones de dicho transcrito indicador de ácido nucleico, que comprende una primera conformación que evita otra transcripción de dicha construcción de ácido nucleico, y una segunda conformación formada tras la unión de dicha primera conformación con un transcrito celular, en la que dicha segunda conformación permite la transcripción de dicha construcción de ácido nucleico. En algunos modos de realización, la composición comprende una partícula de transducción no replicativa que comprende dicha construcción de ácido nucleico. En otro modo de realización, el transcrito indicador de ácido nucleico comprende una secuencia de represión cis.

25 En un modo de realización, el transcrito indicador de ácido nucleico comprende una secuencia de gen indicador. En otro modo de realización, la primera conformación se forma a partir de una unión de dicha secuencia de represión cis a dicha secuencia de gen indicador. En algunos modos de realización, la primera conformación es un sustrato para una enzima de escisión. En un modo de realización, la primera conformación de dicho transcrito indicador de ácido nucleico comprende una secuencia que forma una estructura de terminación de la transcripción. En otros modos de realización, la unión de dicho transcrito celular a dicha secuencia que forma una estructura de terminación de la transcripción da como resultado la escisión de una porción de dicho transcrito indicador de ácido nucleico y la formación de dicha segunda conformación.

30 La divulgación comprende un vector que comprende una secuencia reguladora enlazada funcionalmente a una secuencia de ácido nucleico que codifica dicho transcrito indicador de ácido nucleico descrita en el presente documento.

35 La divulgación incluye un procedimiento para detectar un transcrito diana en una célula, que comprende: introducir en dicha célula dicha construcción indicadora de ácido nucleico descrita en el presente documento; y detectar la presencia o ausencia de una señal de salida de dicha célula, en el que dicha presencia de dicha señal de salida indica la presencia del transcrito diana en dicha célula. El procedimiento incluye detectar una presencia de una célula bacteriana en base a la detección de dicha presencia de dicho transcrito diana.

40 En un modo de realización, el procedimiento para detectar una presencia de una célula bacteriana en una muestra que comprende introducir en dicha muestra dicha construcción indicadora de ácido nucleico descrita en el presente documento; y detectar la presencia o ausencia de una señal de salida de dicha muestra, en el que dicha presencia de dicha señal de salida indica la presencia de la célula bacteriana en dicha muestra.

45 La divulgación comprende un kit, que comprende un compartimento para contener una muestra que comprende una célula y dicha construcción indicadora de ácido nucleico descrita en el presente documento; e instrucciones para detectar la presencia o ausencia de una señal de salida de dicha muestra, en el que la presencia de la señal de salida indica la presencia de un transcrito diana en dicha célula.

50 La divulgación comprende una composición, que comprende una partícula de transducción no replicativa que

comprende una construcción indicadora de ácido nucleico, comprendiendo la construcción indicadora de ácido nucleico un primer promotor enlazado funcionalmente a un gen indicador, en el que dicho primer promotor se puede inducir por una proteína inductora endógena en una célula bacteriana.

5 La divulgación incluye un procedimiento para detectar una presencia de una célula bacteriana en una muestra que comprende poner en contacto dicha muestra con una partícula de transducción no replicativa que comprende una construcción indicadora de ácido nucleico que comprende un primer promotor enlazado funcionalmente a un gen indicador, en el que dicho primer promotor se puede inducir por una proteína inductora endógena en dicha célula bacteriana; y detectar la presencia o ausencia de una señal de salida de dicho gen indicador, en el que dicha presencia de dicha señal de salida indica la presencia de dicha célula bacteriana en dicha muestra.

En un modo de realización, el primer promotor es el mismo que un promotor inducible enlazado funcionalmente a una molécula de ácido nucleico diana en dicha célula bacteriana.

15 La divulgación comprende una composición, que comprende una partícula de transducción no replicativa que comprende una construcción indicadora de ácido nucleico, comprendiendo la construcción indicadora de ácido nucleico un gen indicador que codifica una molécula indicadora, la partícula de transducción no replicativa puede entrar en una célula bacteriana; y un sustrato encajado que es exógeno a dicha célula bacteriana que una vez desencajado puede reaccionar con dicha molécula indicadora en dicha célula.

20 La divulgación comprende un procedimiento para detectar una presencia de una célula bacteriana en una muestra que comprende poner en contacto dicha muestra con un sustrato encajado y una partícula de transducción no replicativa que comprende una construcción indicadora de ácido nucleico, comprendiendo la construcción indicadora de ácido nucleico un gen indicador que codifica una molécula indicadora, el sustrato encajado exógeno a dicha célula que una vez desencajado se puede unir a dicha molécula indicadora en dicha célula bacteriana; y detectar la presencia o ausencia de una señal de salida de dicha molécula indicadora, en el que dicha presencia de dicha señal de salida indica la presencia de dicha célula bacteriana en dicha muestra.

25 En un modo de realización, una enzima diana en dicha célula se une a dicho sustrato encajado para producir un sustrato desencajado. En algunos modos de realización, el sustrato desencajado reacciona con dicha molécula indicadora para producir dicha señal de salida.

30 La divulgación también incluye una composición, que comprende una partícula de transducción no replicativa que comprende una construcción indicadora de ácido nucleico, codificando la construcción indicadora de ácido nucleico una molécula intercambiable que se puede unir a una molécula diana en una célula bacteriana para formar un complejo; y un sustrato que puede penetrar en dicha célula y unirse a dicho complejo para producir una señal detectable de dicha célula.

35 La divulgación incluye un procedimiento para detectar una presencia de una célula bacteriana en una muestra que comprende poner en contacto dicha muestra con un sustrato y una partícula de transducción no replicativa que comprende una construcción indicadora de ácido nucleico que codifica una molécula intercambiable, la molécula intercambiable se puede unir a una molécula diana en dicha célula para formar un complejo, el sustrato se puede unir a dicho complejo para formar un complejo unido al sustrato; y detectar la presencia o ausencia de una señal de salida de dicho complejo unido al sustrato, en el que dicha presencia de dicha señal de salida indica la presencia de dicha célula bacteriana en dicha muestra. En un modo de realización, la unión de dicha molécula intercambiable a dicha molécula diana produce un cambio conformacional en dicha molécula intercambiable. En otro modo de realización, el cambio conformacional en dicha molécula intercambiable permite que dicho sustrato se una a dicho complejo.

50 BREVE DESCRIPCIÓN DE VARIAS VISTAS DE LOS DIBUJOS

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

55 La figura 1 ilustra un ejemplo del diseño y función del sistema de empaquetamiento de plásmido P1 basado en mutación sinónima/complementación, de acuerdo con un modo de realización de la invención.

La figura 2 ilustra un esquema del vector pGWP 10001, de acuerdo con un modo de realización de la invención.

60 La figura 3 ilustra un ejemplo del diseño y función de un sistema de empaquetamiento de plásmido de delección del sitio *pac*/complementación, de acuerdo con un modo de realización de la invención.

La figura 4 ilustra un esquema del vector pGW80A0001, de acuerdo con un modo de realización de la invención.

65 La figura 5 representa el proceso para el empaquetamiento de isla genómica (GI) por un bacteriófago, de acuerdo con un modo de realización de la invención.

La figura 6 representa un ejemplo del diseño y función de un sistema de empaquetamiento basado en GI, de acuerdo con un modo de realización de la invención.

5 La figura 7 representa el diseño y función de un sistema de empaquetamiento basado en GI que carece del gen de la integrasa, de acuerdo con un modo de realización de la invención.

La figura 8 representa el diseño y función de un sistema de empaquetamiento basado en SaPI_{bov2} que carece del gen de la integrasa, de acuerdo con un modo de realización de la invención.

10 La figura 9 representa un sistema para el uso de NRTP para la detección de inductores para seleccionar promotores de genes dentro de células viables, de acuerdo con un modo de realización de la invención.

15 La figura 10 representa un sistema indicador que incluye una molécula de ácido nucleico indicadora (por ejemplo, plásmido) que se construye para detectar VanR, el inductor del promotor del gen de resistencia a vancomicina (*vanA*) en *Enterococcus faecium* (o *E. faecalis*), de acuerdo con un modo de realización de la invención. El plásmido indicador porta un gen indicador que se enlaza funcionalmente al promotor del gen *vanA*.

20 La figura 11 representa un sistema indicador que incluye una molécula de ácido nucleico indicadora construida para detectar TcdD, el inductor de los promotores de los genes de las toxinas A y B (*tcdA* y *tcdB*, respectivamente) de *C. difficile*, de acuerdo con un modo de realización de la invención. La molécula de ácido nucleico indicadora incluye un gen indicador que se enlaza funcionalmente al promotor del gen *tcdA*.

25 La figura 12 representa un sistema indicador que incluye una molécula de ácido nucleico indicadora construida para detectar SarS, el inductor del promotor del gen de la proteína A (*spa*) en *S. aureus*, de acuerdo con un modo de realización de la invención. La molécula de ácido nucleico indicadora incluye los genes de la luciferasa bacteriana *luxA* y *luxB* enlazados funcionalmente al promotor del gen *spa* (P_{spa}).

30 La figura 13 muestra un sistema indicador que comprende un sistema para la detección de enzimas intracelulares dentro de células viables que emplea moléculas de sustrato encajadas que se pueden desencajar por una enzima intracelular diana, de acuerdo con un modo de realización de la invención.

La figura 14 representa el diseño y función de un sistema de detección de enzima β -lactamasa, de acuerdo con un modo de realización de la invención.

35 La figura 15 muestra un sistema indicador para la detección de moléculas intracelulares dentro de células viables que emplea moléculas intercambiables que pueden generar una señal detectable tras su unión a una molécula diana, de acuerdo con un modo de realización de la invención.

40 La figura 16 representa el diseño y función de un sistema indicador de molécula intracelular basado en bacteriófago/aptámero intercambiable (SA), de acuerdo con un modo de realización de la invención.

45 La figura 17 representa un ejemplo de un sistema que usa un mecanismo de represión cis que puede seleccionar la 5' UTR (región no traducida) de una secuencia indicadora en un transcrito indicador, de acuerdo con un modo de realización de la invención.

La figura 18 muestra un ejemplo de un sistema para detectar la presencia de un transcrito diana en una célula que se basa en un mecanismo de represión cis que selecciona el sitio de unión al ribosoma (RBS) de una secuencia indicadora en un transcrito indicador, de acuerdo con un modo de realización de la invención.

50 La figura 19 ilustra un sistema ejemplar para detectar la presencia de un transcrito diana en una célula que se basa en un mecanismo de represión cis que selecciona la región codificante ("AUG") de una secuencia indicadora en un transcrito indicador, de acuerdo con un modo de realización de la invención.

55 La figura 20 ilustra un sistema de ejemplo para detectar la presencia de un transcrito diana en una célula que se basa en un mecanismo de represión que usa un transcrito indicador inestable, de acuerdo con un modo de realización de la invención.

60 La figura 21 muestra los resultados del ensayo de transducción en el que 36 SARM sensibles a tetraciclina se expusieron a partículas de transducción que portaban pGW80A0001 y a continuación se colocaron en placas de medio que contenían 5 μ g/ml de tetraciclina, de acuerdo con un modo de realización de la invención.

65 La figura 22 ilustra la luminiscencia medida a partir de 80 aislados clínicos de SARM y 28 aislados clínicos de *S. aureus* sensible a metilicina (SASM) transducidos con la partícula de transducción, de acuerdo con un modo de realización de la invención.

La figura 23 muestra los resultados de proliferación de *S. aureus* a 4, 8, 16, 32, 64 y 128 ug/ml de cefoxitina.

La figura 24 muestra los valores de RLU obtenidos por el ensayo de NRTP en presencia de 4, 8, 16, 32, 64 y 128 ug/ml de cefoxitina. El eje x en la figura 24 se establece en el valor de corte de RLU SASM.

La figura 25 muestra una estructura secundaria del transcrito de *mecA* generada en base a la conformación de menor energía calculada por MFold y visualizada con VARNA.

La figura 26 muestra el bucle terminal 23 (T23) del transcrito de *mecA* que contiene una secuencia consenso YUNR.

La figura 27 representa una secuencia de represión cis añadida al extremo 5' de los genes *luxAB* y diseñada para formar una estructura de tallo-bucle que bloquea la secuencia de RBS ("AAGGAA") del gen *luxA*.

La figura 28 muestra un diagrama de emparejamiento de bases entre el transcrito diana y la secuencia de represión cis del transcrito indicador.

La figura 29 muestra un ejemplo de una secuencia del gen *mecA* diana, de acuerdo con un modo de realización de la invención.

La figura 30 muestra una secuencia de transcrito de *mecA* ejemplar que se puede usar para diseñar un transcrito indicador (SEQ ID NO:16), de acuerdo con un modo de realización de la invención.

La figura 31 es un ejemplo de una secuencia de ADN de locus del gen *luxAB* que se puede usar para diseñar un transcrito indicador, de acuerdo con un modo de realización de la invención.

La figura 32 es un ejemplo de una secuencia de transcrito de *luxAB* que se puede usar para diseñar un transcrito indicador (SEQ ID NO:18), de acuerdo con un modo de realización de la invención.

La figura 33 es un ejemplo de una secuencia de transcrito reprimida en cis *luxAB* que se puede usar en un transcrito indicador (SEQ ID NO:19), de acuerdo con un modo de realización de la invención.

La figura 34 muestra un ejemplo de una célula que comprende un vector que codifica un transcrito indicador, donde no hay un transcrito de *mecA* endógeno en la célula, de acuerdo con un modo de realización de la invención.

La figura 35 muestra un vector introducido en una célula, donde el vector codifica el transcrito indicador, lo que incluye una secuencia de represión cis y una secuencia indicadora (genes *luxA* y *luxB*). Cuando el transcrito de *mecA* presente en la célula se une a la secuencia de represión cis, el bucle de horquilla inhibidor se abre y se expone el RBS para el gen *luxA*. Se puede producir la traducción de las secuencias indicadoras (*luxA* y *luxB*), dando como resultado la formación de una enzima *luxAB*. La enzima *luxAB* produce una señal luminiscente detectable. De esta manera, el vector indicador de transcrito indica la presencia de transcritos de *mecA* endógenos dentro de una célula.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. Definiciones

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 determinados modos de realización, la molécula de ácido nucleico indicadora puede ser complementaria a un gen diana en una célula. En otros modos de realización, la molécula de ácido nucleico indicadora comprende un gen indicador que codifica una molécula indicadora (por ejemplo, proteína, enzima indicadora). 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, ácido nucleico o proteína) 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 en reacciones de luminiscencia (*luxA*, *luxB*, *luxAB*, *luc*, *ruc*, *nluc*), genes que codifican enzimas que median en reacciones colorimétricas (*lacZ*, *HRP*), genes que codifican proteínas fluorescentes (GFP, eGFP, YFP, RFP, CFP, BFP, mCherry, proteínas fluorescentes en infrarrojo cercano), moléculas de ácido nucleico que codifican péptidos de afinidad (marca His, 3X-FLAG) y genes que codifican

5 marcadores seleccionables (ampC, tet(M), CAT, erm). La molécula indicadora se puede usar como 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, molécula de ácido nucleico diana, molécula intracelular diana o una célula, como se describe en el presente documento. De forma alternativa, la molécula indicadora puede ser un ácido nucleico, tal como un aptámero o ribozima.

10 En algunos aspectos de la invención, la molécula de ácido nucleico indicadora se enlaza funcionalmente a un promotor. En otros aspectos de la invención, 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 se requiere para la producción de señal indicadora 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 empaquetar como ADN concatamérico en un virus descendiente durante la replicación del virus.

20 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 una molécula de ARNm que se forma naturalmente por una célula diana incluyendo la formada durante la transcripción de un gen diana y 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.

25 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 un gen o secuencia molde de ADN o ARN. El transcrito puede ser una secuencia de ADNc transcrita a partir de un molde de ARN o una secuencia de ARNm transcrita a partir de un molde de ADN. El transcrito puede ser codificante o no codificante de proteína. El transcrito también se puede transcribir a partir de una construcción de ácido nucleico genomanipulada.

30 Un transcrito derivado de una molécula de ácido nucleico indicadora se puede denominar un "transcrito indicador". El transcrito indicador puede incluir una secuencia indicadora y una secuencia de represión cis. El transcrito indicador puede tener secuencias que forman regiones de complementariedad, de modo que el transcrito incluye dos regiones que forman un dúplex (por ejemplo, una región dúplex intermolecular). Una región se puede denominar una "secuencia de represión cis" y tiene complementariedad con una porción o todo un transcrito diana y/o una secuencia indicadora. Una segunda región del transcrito se llama "secuencia indicadora" y puede tener complementariedad con la secuencia de represión cis. La complementariedad puede ser complementariedad completa o complementariedad sustancial. La presencia y/o unión de la secuencia de represión cis con la secuencia indicadora puede formar una conformación en el transcrito indicador, que puede bloquear la expresión adicional de la molécula indicadora. El transcrito indicador puede formar estructuras secundarias, tales como una estructura de horquilla, de modo que las regiones dentro del transcrito indicador que son complementarias entre sí se pueden hibridar entre sí.

45 "Introducir en una célula", cuando se refiere a una molécula de ácido nucleico o una secuencia exógena (por ejemplo, plásmido, vector, construcción), quiere decir 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 por agentes o dispositivos auxiliares incluyendo por medio del uso de bacteriófago, virus y partículas de transducción. 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 es parte de un organismo vivo. En dicho caso, la introducción en la célula incluirá el suministro al organismo. Por ejemplo, para suministro *in vivo*, las moléculas, construcciones o vectores de ácido nucleico se pueden inyectar en un sitio de tejido o administrarse por vía sistémica. La introducción *in vitro* en una célula incluye procedimientos conocidos en la técnica, tales como electroporación y lipofección. Otros enfoques se describen en el presente documento o son conocidos en la técnica.

55 Una "partícula de transducción" se refiere a un virus que puede administrar una molécula de ácido nucleico no vírico en una célula. El virus puede ser un bacteriófago, adenovirus, etc.

60 Una "partícula de transducción no replicativa" se refiere a un virus que puede suministrar una molécula de ácido nucleico no vírico en una célula, pero no empaqueta su propio genoma vírico replicado en la partícula de transducción. El virus puede ser un bacteriófago, adenovirus, etc.

65 Un "plásmido" es una molécula de ADN pequeña que está físicamente separada de, y se puede replicar independientemente de, el ADN cromosómico dentro de una célula. Los plásmidos, encontrados más comúnmente como moléculas de ADN bicatenario circulares pequeñas 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 de ácido nucleico usada como vehículo para portar artificialmente material genético exógeno en otra célula, donde se puede replicar y/o expresar.

5 Un "virus" es un agente infeccioso pequeño que se replica solo en dentro 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 portan información genética; ii) una cubierta proteica que protege estos genes; y en algunos casos, iii) una envoltura de lípidos que rodea la cubierta proteica.

10 "SARM" se refiere a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

"SASM" se refiere a *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina.

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

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

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

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

30 "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 además a continuación, o un resto de reemplazo sustituto. El experto en la técnica es consciente de que guanina, citosina, adenina y 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 tanto, los nucleótidos que contienen uracilo, guanina o adenina se pueden reemplazar en las secuencias de nucleótidos de la invención por un nucleótido que contiene, por ejemplo, inosina. Las secuencias que comprenden dichos restos de reemplazo son modos de realización de la invención.

40 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 se entenderá por el experto en la técnica. Las secuencias complementarias también se describen como unidas entre sí y caracterizadas por afinidades de unión.

45 Por ejemplo, una primera secuencia de nucleótidos se puede describir como complementaria a una segunda secuencia de nucleótidos cuando las dos secuencias se 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 se 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 son dependientes de la secuencia y son diferentes en parámetros ambientales diferentes. En general, se seleccionan las condiciones de hibridación rigurosas para que sean aproximadamente 5 °C menores 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 (a una fuerza iónica y pH definidos) a la que un 50 % de las primeras secuencias de nucleótidos se hibrida a 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 part 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 condiciones fisiológicamente pertinentes como se pueden encontrar dentro 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.

65 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 formarse en su totalidad de pares de bases distintas de Watson-Crick y/o pares de bases formadas 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 no se limitan a, 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 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 son parte de una molécula más grande y, por lo tanto, se conectan 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 se conectan 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 uno 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 de 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 los 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 aminoacídicos 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 coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan 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, por el algoritmo de

homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), por el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), por la búsqueda del procedimiento de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), por 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 por 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 de BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

El término "cantidad suficiente" quiere decir 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 tratamiento.

Cabe destacar que, como se usan en la memoria descriptiva y 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.

II. Ciclo lisógeno y lítico de los virus

Los virus experimentan ciclos lisógenos y líticos en una célula huésped. Si se adopta el ciclo lisógeno, el cromosoma del fago se puede integrar en el cromosoma bacteriano, o se puede establecer por sí mismo como un plásmido estable en el huésped, donde puede permanecer inactivo durante largos períodos de tiempo. Si se induce el lisógeno, el genoma de fago se escinde del cromosoma bacteriano e inicia el ciclo lítico, que culmina en la lisis de la célula y la liberación de partículas de fago. El ciclo lítico da lugar a la producción de nuevas partículas de fago que se liberan por lisis del huésped.

Determinados fagos moderados pueden presentar actividad lítica, y la propensión a esto puede variar con bacterias huésped variables. Para ilustrar este fenómeno, la actividad lítica de dos fagos de *S. aureus* moderados en diez aislados clínicos de SARM se examinó por medio de un ensayo en placa (tabla 1). El fago $\phi 11$ presentó actividad lítica en 10 de 10 aislados clínicos de SARM y $\phi 80\alpha$ presentó actividad lítica en seis de los 10 aislados clínicos de SARM. Por tanto, se puede esperar que los ensayos de indicadores que se basan en el ciclo lisógeno natural de los fagos presenten actividad lítica esporádicamente.

Tabla 1: Actividad lítica (indicada por la letra "x") de los fagos moderados de *S. aureus* $\phi 11$ y $\phi 80\alpha$ en diez aislados clínicos de SARM

Aislado de SARM	$\Phi 11$	$\Phi 80\alpha$
1	x	
2	x	
3	x	x
4	x	x
5	x	x
6	x	
7	x	x
8	x	
9	x	x
10	x	x

Además, los ensayos de indicadores basados en virus, tales como los indicadores basados en fagos, pueden sufrir una reactividad limitada (es decir, inclusividad analítica) debido a los límites en la gama de huéspedes de fagos provocada por mecanismos de resistencia a fagos derivados de profagos y basados en huéspedes. Estos mecanismos de resistencia seleccionan el ácido nucleico del fago natural que puede dar como resultado la degradación o inhibición de otro modo de las funciones y ADN del fago. Dichos mecanismos de resistencia incluyen sistemas de restricción que escinden el ADN del fago y sistemas CRISPR que inhiben los transcritos derivados del fago.

Tanto la actividad lítica como la resistencia a fagos pueden inhibir los ensayos basados en fagos indicadores. La

actividad lítica puede inhibir la señal destruyendo o inhibiendo de otro modo la célula en su capacidad para generar una señal detectable y por tanto afectar a los límites de detección reduciendo la cantidad de señal detectable o evitando la generación de una señal detectable. Los mecanismos de resistencia a fagos pueden limitar la gama de huéspedes del fago y limitar la inclusividad del indicador basado en fagos, afectando de forma similar a los límites de detección reduciendo la cantidad de señal detectable o evitando la generación de una señal detectable. Tanto la actividad lítica como la resistencia a fagos provocadas por la incorporación del ADN del fago en un fago indicador puede dar lugar a resultados negativos falsos en los ensayos que incorporan estos indicadores de fagos.

III. Procedimientos para producir partículas de transducción no replicativas (NRTP)

A. Procedimientos basados en alteración/complementación para producir partículas de transducción no replicativas

1) Sistema de empaquetamiento de mutación sinónima/complementación

La divulgación incluye procedimientos para producir NRTP usando un procedimiento basado en mutación sinónima/complementación.

Este sistema de empaquetamiento de partículas de transducción no replicativas se basa en introducir una mutación sinónima en un componente del genoma de un virus que se reconoce por el mecanismo de empaquetamiento vírico como el elemento a partir del que se inicia el empaquetamiento genómico durante la producción vírica. 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 iniciación de empaquetamiento a menudo se encuentran dentro de regiones codificantes de genes que son esenciales para la producción de virus, la mutación sinónima se introduce de modo que el sitio pac ya no se reconoce como sitio de iniciación de empaquetamiento por el mecanismo de empaquetamiento vírico. Al mismo tiempo, la mutación no altera el gen en el que se codifica el sitio. Al alterar la secuencia del sitio de empaquetamiento, el virus mutado puede experimentar un ciclo lítico, pero no puede empaquetar su ADN genómico en su unidad de empaquetamiento.

Una molécula de ácido nucleico indicadora exógena, tal como ADN plasmídico, se puede introducir en una célula huésped que se ha lisogenizado con un genoma vírico con una secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento mutada. La molécula de ácido nucleico indicadora exógena puede incluir una secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento natural. La molécula de ácido nucleico indicadora exógena se puede introducir en la célula y replicarse en la célula. Cuando el virus mutado está experimentando un ciclo lítico, el mecanismo de empaquetamiento vírico expresado empaqueta la molécula de ácido nucleico indicadora exógena con la secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento natural en la unidad de empaquetamiento vírica. El genoma vírico no se empaqueta en la unidad de empaquetamiento porque su secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento se ha mutado. En determinados modos de realización, la mutación en la secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento comprende una mutación sinónima que evita la escisión de la secuencia de iniciación de empaquetamiento, pero no altera la expresión del producto génico que engloba la secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento. Esto produce partículas de transducción no replicativas, por ejemplo, componentes estructurales víricos que portan la molécula de ácido nucleico exógena replicada.

Un ejemplo de un sistema de este tipo se basa en el bacteriófago P1, un fago de tipo pac. En un modo de realización, un plásmido que incluye un sitio P1 pac natural se transforma en una célula. La célula se lisogeniza con un genoma de profago P1. El genoma de profago P1 incluye una mutación sinónima en la secuencia del sitio pac codificada dentro del gen pacA de P1. Cuando se induce el ciclo lítico del profago, el sistema da como resultado la producción de partículas de transducción basadas en P1 que portan el ADN plasmídico. Un ejemplo de una mutación sinónima que es adecuada para este sistema se describe en la publicación de EE. UU. n.º 2005/0118719, presentada el 7 de noviembre de 2002. También se encuentra un ejemplo en SEQ ID NO: 2, enumerado a continuación (sitio pac P1 con mutaciones sinónimas, las letras en minúscula significan bases mutadas).

La figura 1 ilustra un ejemplo del diseño y función del sistema de empaquetamiento de plásmido P1 basado en mutación sinónima/complementación 100, de acuerdo con un modo de realización de la invención. En este sistema, una célula de *E. coli* 101 se lisogeniza con un profago P1 102 que incluye una mutación sinónima en su secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento (por ejemplo, sitio pac). La célula se transforma con un plásmido que contiene el sitio pac natural 103 y el plásmido se replica en la célula para formar concatámeros plasmídicos 104. El plásmido también puede incluir un gen indicador que codifica una molécula indicadora. Cuando se induce el ciclo lítico del profago P1, el profago P1 se escinde del genoma bacteriano y los componentes estructurales P1, tales como las proteínas de la cápside, se expresan 105. Los componentes estructurales P1 solo empaquetan ADN que contiene un sitio pac natural (por ejemplo, ADN plasmídico), produciendo así partículas de transducción no replicativas que portan el ADN plasmídico 106 (por ejemplo, un gen indicador).

Un vector de ejemplo para su uso en el sistema de empaquetamiento de plásmido P1 basado en mutación

sinónima/complementación se muestra en la figura 2. Los detalles sobre cómo construir las cepas y los vectores del sistema de empaquetamiento de plásmido P1 basado en mutación sinónima/complementación se describen en detalle en el ejemplo 1 a continuación.

5 2) Sistema de empaquetamiento basado en delección/complementación

La divulgación incluye procedimientos para producir NRTP usando un procedimiento basado en delección/complementación.

10 Este sistema de empaquetamiento de partículas de transducción no replicativas se basa en la delección de un componente del genoma de un virus que se reconoce por el mecanismo de empaquetamiento vírico como el elemento a partir del que se inicia el empaquetamiento genómico durante la producción vírica. 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. Estos sitios de iniciación de empaquetamiento a menudo se encuentran dentro de
15 regiones codificantes de genes que son esenciales para la producción de virus. En algunos modos de realización, el sitio de iniciación de empaquetamiento solo se deleciona, lo que permite que el virus mutado experimente un ciclo lítico pero no permite que el virus empaquete su ADN genómico. Por ejemplo, SEQ ID NO: 6 es un ejemplo de un gen pacA de P1 con una secuencia del sitio pac delecionada (las letras en minúscula indican la secuencia del sitio pac delecionada). En otros modos de realización, el gen completo que comprende el sitio de iniciación de
20 empaquetamiento se deleciona. Por ejemplo, SEQ ID NO: 8 muestra la delección del gen terS (los caracteres en minúscula muestran la secuencia delecionada).

En un ejemplo, el genoma de una célula se lisogeniza con un genoma vírico donde se ha delecionado el sitio de iniciación de empaquetamiento. Un plásmido complementario se introduce en la célula, y el ADN plasmídico incluye
25 un gen con una secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento que complementa la secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento delecionado en el genoma vírico. Cuando el virus mutado está experimentando un ciclo lítico, las proteínas de empaquetamiento vírico empaquetan un replicón del ADN plasmídico en la unidad de empaquetamiento debido a su sitio de iniciación de empaquetamiento, y se producen partículas de transducción no replicativas que portan el ADN plasmídico replicado.

30 En algunos modos de realización, es preferente que la delección/complementación se diseñe de modo que no exista homología entre el ADN del virus mutado y el ADN exógeno complementario. Esto se debe a que la falta de homología entre el ADN del virus mutado y el ADN exógeno complementario evita la posibilidad de recombinación homóloga entre las dos moléculas de ADN que puede dar como resultado la reintroducción de una secuencia de empaquetamiento en el genoma del virus. Para lograr una falta de homología, una estrategia es delecionar todo el
35 gen que contiene la secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento del genoma del virus y a continuación complementar este gen con una molécula de ADN exógeno que no contenga más que exactamente la secuencia de ADN que se delecionó del virus. En esta estrategia, la molécula de ADN complementaria se diseña para expresar el gen que se delecionó del virus.

40 Otro ejemplo de un sistema de este tipo se proporciona usando el bacteriófago $\phi 80\alpha$, un fago de tipo pac. El genoma de fago se lisogeniza en una célula bacteriana huésped, y el genoma de fago incluye un gen de la terminasa pequeña donde el sitio pac de un profago de tipo pac $\phi 80\alpha$ se ha delecionado. Un plásmido que incluye un gen de la terminasa pequeña complementario con un sitio pac natural se transforma en la célula. Cuando se induce el ciclo lítico del profago lisogenizado, el sistema de empaquetamiento de bacteriófagos empaqueta el ADN plasmídico en componentes estructurales del bacteriófago descendiente, en lugar de empaquetar el ADN del bacteriófago natural. El sistema de empaquetamiento produce así partículas de transducción no replicativas que portan ADN plasmídico.

50 La figura 3 ilustra un ejemplo del diseño y función de un sistema de empaquetamiento de plásmido de delección del sitio pac/complementación 300, de acuerdo con un modo de realización de la invención. Una célula bacteriana 301 se lisogeniza con un fago de tipo pac 302 que tiene su gen de la terminasa pequeña (terS) delecionado. La célula se transforma con un plásmido de replicación por círculo rodante 303 que incluye un gen de la terminasa pequeña que complementa la delección del gen terS en el fago. El gen de la terminasa pequeña contiene la secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento, por ejemplo, un sitio pac. El plásmido 303 también puede incluir un gen indicador que codifica una molécula indicadora.

Un complejo de proteínas que comprende las proteínas terminasa pequeña y terminasa grande puede reconocer y escindir una molécula de ADN bicatenario en o cerca del sitio pac, y esto permite que la molécula de ADN plasmídico se empaquete en una cápside de fago. Cuando se induce el profago en la célula, el ciclo lítico del fago produce las proteínas estructurales del fago 304 y la proteína terminasa grande del fago 305. El plásmido complementario se replica, y la proteína terminasa pequeña 306 se expresa. El ADN plasmídico replicado 307 que contiene el gen terS (y el gen indicador) se empaqueta en cápsides de fago, dando como resultado partículas de transducción no replicativas que portan solo el ADN plasmídico 308. La figura 4 muestra un ejemplo de un vector resultante usado en el sistema de empaquetamiento de plásmido de delección del sitio pac/complementación. Otros detalles sobre los componentes y la construcción del sistema de empaquetamiento de plásmido de delección del sitio
60
65

pac/complementación están en el ejemplo 2 a continuación.

B. Sistema de empaquetamiento basado en isla de patogenicidad

5 Las islas de patogenicidad (PTI) son un subconjunto de elementos genéticos transferidos horizontalmente conocidos como islas genómicas. Existe una familia particular de PTI altamente móviles en *Staphylococcus aureus* que se inducen para escindirse y replicarse por determinados profagos residentes. Estas PTI se empaquetan en partículas pequeñas con forma de fago y se transfieren en frecuencias acordes con el título de formación de placa del fago. Este proceso se denomina ciclo de escisión-replicación-empaquetamiento (ERP) de SaPI, y la transferencia de SaPI de alta frecuencia se denomina transferencia específica de SaPI (SPST) para distinguirla de la transducción generalizada clásica (CGT). Las SaPI tienen una organización genética altamente conservada que es paralela a la de los bacteriófagos y las distingue claramente de todas las otras islas genómicas adquiridas horizontalmente. Las integrasas codificadas por SaPI1 y codificadas por SaPI_{bov2} se requieren tanto para la escisión como para la integración de los elementos correspondientes, y se supone que lo mismo es cierto para las otras SaPI. El fago 80 α puede inducir varias SaPI diferentes, incluyendo SaPI1, SaPI2 y SaPI_{bov1}, mientras que ϕ 11 puede inducir SaPI_{bov1} pero ninguna de las otras dos SaPI.

La figura 5 representa el proceso natural para el empaquetamiento de isla genómica (GI) 500 por un bacteriófago. En la naturaleza, una célula bacteriana 501 lisogenizada con un profago adecuado 503 y que porta una GI 504 puede producir partículas de fago que portan concatámeros de GI 512. En este proceso, cuando el fago se induce en su ciclo lítico, el genoma de fago se escinde (no mostrado) del genoma bacteriano 502, que a continuación expresa proteínas bacteriófagas incluyendo los constituyentes de cápside 505 y la proteína terminasa grande (TerL) 506. La inducción de profago también desencadena la escisión de GI por medio de la expresión de la proteína integrasa de GI (*int*) 507. De forma similar al genoma de fago escindido (no mostrado), la GI se circulariza 508, expresa su propia proteína terminasa pequeña (TerS) 509 y comienza a replicarse formando un concatámero de GI 510. A continuación, el gen TerL del fago y el gen TerS de GI pueden combinar, unir y escindir el concatámero de GI por medio de una secuencia del sitio pac en el genoma de GI, y a continuación el concatámero de GI se puede empaquetar en las cápsides del fago 511 dando como resultado partículas de fago que portan los concatámeros de GI 512.

En sistemas naturales, como se representa en la figura 5, el lisado resultante producido a partir de la producción de fagos incluye tanto partículas de fago naturales como partículas de fago que contienen GI. Las partículas de fago naturales son un resultado del empaquetamiento del genoma de fago natural debido al reconocimiento del sitio pac dentro de concatámeros del genoma de fago.

1) Diseño y función del sistema de empaquetamiento de isla genómica (GI)

Los procedimientos de la divulgación para producir NRTP incluyen un sistema de empaquetamiento basado en GI.

40 En comparación con un sistema de empaquetamiento de plásmido, el sistema de empaquetamiento de GI natural se beneficia del hecho de que el ADN que se empaqueta se deriva de una región genómica dentro del genoma bacteriano y por tanto no requiere el mantenimiento de un plásmido por el huésped bacteriano.

En algunos modos de realización, la divulgación incluye un sistema de empaquetamiento de célula bacteriana para empaquetar una molécula de ácido nucleico indicadora en una partícula de transducción no replicativa, en el que la célula bacteriana comprende un genoma de bacteriófago lisogenizado que carece de un gen de empaquetamiento, y una isla genómica, fago críptico u otra molécula de ácido nucleico que requiere un bacteriófago (por ejemplo, un fago cooperador) para la movilización de la molécula de ácido nucleico y que comprende una molécula de ácido nucleico indicadora y un gen de empaquetamiento. Los sistemas basados en islas genómicas se pueden basar en islas de patogenicidad de *S. aureus* (SaPI), el fago críptico P4 de *E. coli* y el fago cooperador P2, y el fago cooperador P1 y el fago críptico P7 de enterococos, por ejemplo.

Los sistemas de empaquetamiento de GI se pueden explotar de modo que las secuencias de ácido nucleico exógenas se empaqueten por el bacteriófago. Esto se puede lograr incorporando dichas secuencias de ácido nucleico exógenas en la GI.

Para eliminar el fago natural de este proceso, se puede delecionar el gen de la terminasa pequeña del profago. La secuencia del gen de la terminasa pequeña contiene la secuencia del sitio pac del fago natural, y esta delección tiene el efecto de evitar el empaquetamiento del ADN del fago natural. En otros modos de realización, solo se puede delecionar el sitio pac del gen de la terminasa pequeña. La GI que se empaquetará incluye su propio sitio pac y un gen de la terminasa pequeña que expresa una proteína terminasa pequeña adecuada, y solo el ADN de GI será susceptible de empaquetarse en este sistema.

La figura 6 representa un ejemplo del diseño y función de un sistema de empaquetamiento basado en GI 600, de acuerdo con un modo de realización de la invención. En este sistema, una célula bacteriana 601 tiene su genoma lisogenizado con un profago 603 adecuado que tiene su gen de la terminasa pequeña delecionado, y el genoma de

la célula 602 porta una GI 604. Cuando el fago se induce en su ciclo lítico, el genoma de fago se escinde (no mostrado) del genoma bacteriano 602. El genoma de fago expresa proteínas bacteriófagas, incluyendo constituyentes de cápside 605 y la proteína terminasa grande (TerL) 606. La inducción de profago también desencadena la escisión de GI por medio de la expresión de la proteína integrasa de GI (*int*) 607. De forma similar al genoma de fago escindido (no mostrado), la GI se circulariza 608 y expresa su propia proteína terminasa pequeña (TerS) 609 y se replica formando un concatámero de GI 610. A continuación, el gen TerL de fago y el gen TerS de GI pueden combinar, unir y escindir el concatámero de GI por medio de una secuencia del sitio pac en el ADN de GI. A continuación, el concatámero de GI se puede empaquetar en las cápsides de fago 611 dando como resultado partículas de fago que portan los concatámeros de GI 612. En este sistema, el ADN del fago no se empaquetará en partículas de fago, ya que carece del gen *terS* que contiene la secuencia del sitio pac del fago y, por tanto, no se puede reconocer por las proteínas TerS de GI y TerL de fago expresadas.

Cuando las partículas de fago que contienen ADN de GI empaquetado se administran a una célula receptora, el fago se unirá a la superficie de la célula receptora y a continuación introducirá el concatámero de ADN de GI empaquetado en la célula. Una vez dentro de la célula, la GI puede expresar de nuevo su proteína integrasa, y a continuación la GI se puede integrar en su sitio específico en el genoma de la célula receptora. Si se incluyen secuencias de ADN exógenas en la GI antes del empaquetamiento, el sistema de empaquetamiento permite así suministrar secuencias de ADN exógenas a una célula receptora e integrar estas secuencias de ADN exógenas en el genoma de la célula receptora.

2) Sistema de empaquetamiento basado en GI que carece de integrasa

En otro modo de realización, el sistema de empaquetamiento descrito anteriormente se diseña de modo que el ADN de GI empaquetado no se puede integrar en el genoma de una célula receptora. Esto se puede lograr delecionando el gen de la integrasa en la GI y complementando la delección provocando la expresión del gen de la integrasa en trans de la GI. De esta manera, la proteína integrasa está disponible para la escisión de la GI en la célula huésped de empaquetamiento, y el ADN de GI que se ha empaquetado en un bacteriófago no contiene el gen de la integrasa y no puede expresar la proteína integrasa, evitando así la integración de la GI suministrada.

La figura 7 representa el diseño y función de un sistema de empaquetamiento basado en GI que carece del gen *int* 700, de acuerdo con un modo de realización de la invención. En este sistema, una célula bacteriana 701 se lisogeniza con un profago adecuado al que se le ha delecionado 703 su gen de la terminasa pequeña. El genoma de la célula 702 porta una GI que tiene su gen de la integrasa (*int*) delecionado 704 y también porta el gen *int* delecionado enlazado funcionalmente a un promotor adecuado 705. Por tanto, el gen *int* puede expresar la proteína integrasa (Int) en trans de la GI 706. Cuando el fago se induce en su ciclo lítico, el genoma de fago se escinde (no mostrado) del genoma bacteriano 702, que a continuación expresa proteínas bacteriófagas incluyendo los constituyentes de cápside 707 y la proteína terminasa grande (TerL) 708. La inducción de profago también desencadena la escisión de GI por medio de la expresión de la proteína integrasa 707. De forma similar al genoma de fago escindido (no mostrado), la GI escindida se circulariza 709, expresa su propia proteína terminasa pequeña (TerS) 710 y comienza a replicarse formando un concatámero de GI 711. A continuación, el gen TerL del fago y el gen TerS de GI pueden combinar, unir y escindir el concatámero de GI por medio de una secuencia del sitio pac en el ADN de GI, y a continuación el concatámero de GI se puede empaquetar en las cápsides del fago 712 dando como resultado partículas de fago que portan los concatámeros de GI 713. En este sistema, el ADN del fago no se empaquetará, ya que carece del gen *terS* que contiene la secuencia del sitio pac del fago y, por tanto, no se puede reconocer por las proteínas TerS de GI y TerL de fago expresadas.

Cuando las partículas de fago que contienen ADN de GI empaquetado que carece del gen *int* se administran a una célula receptora, el fago se unirá a la superficie de la célula receptora y a continuación introducirá el concatámero de ADN de GI empaquetado en la célula. Una vez dentro de la célula, la GI no puede expresar su proteína integrasa debido a la falta del gen integrasa y a continuación la GI no se puede integrar en su sitio específico en el genoma de la célula receptora. Si se incluyen secuencias de ADN exógenas en la GI antes del empaquetamiento, el sistema de empaquetamiento permite por tanto suministrar secuencias de ADN exógenas a una célula receptora y las secuencias de ADN suministradas no se integran en el genoma de la célula receptora en el sitio específico para la integración de GI.

3) Diseño y función del empaquetamiento basado en SaPIbov2 que carece de integrasa

En algunos modos de realización, el procedimiento de producción de NRTP emplea un SaPIbov2 de GI y un bacteriófago ϕ 11 en un sistema de empaquetamiento basado en GI. Los modos de realización alternativos pueden emplear otras GI de SaPI y otros bacteriófagos adecuados, incluyendo SaPI1, SaPI2, SaPIbov1 y SaPIbov2 de SaPI junto con el bacteriófago 80 α , y SaPIbov1 y SaPIbov2 de SaPI junto con el bacteriófago ϕ 11. En base a la descripción a continuación, un experto en la técnica sabría cómo desarrollar un sistema de empaquetamiento basado en GI que no carezca del gen *int*, como se describe en la sección II A.

La figura 8 representa el diseño y función de un sistema de empaquetamiento basado en SaPIbov2 800 que carece del gen *int*, de acuerdo con un modo de realización de la invención. En este sistema, una célula de *S. aureus* 801 se

lisogeniza con $\phi 11$ que tiene su gen de la terminasa pequeña deletado 803. El genoma de la célula 802 porta SaPIbov2 que tiene su gen de la integrasa (*int*) deletado 804 y también porta el gen *int* deletado enlazado funcionalmente al promotor del gen *PcIpB* expresado constitutivamente 805. El gen *int* puede expresar la proteína integrasa (Int) en trans de SaPIbov2 806. Cuando el fago se induce en su ciclo lítico, el genoma de fago se escinde (no mostrado) del genoma bacteriano 802, que a continuación expresa proteínas bacteriófagas incluyendo los constituyentes de cápside 807 y la proteína terminasa grande (TerL) 808. La inducción de profago también desencadena la escisión de SaPIbov2 por medio de la expresión de la proteína integrasa 806. De forma similar al genoma de fago escindido (no mostrado), la SaPIbov2 escindida se circulariza 809, expresa su propia proteína terminasa pequeña (TerS) 810 y comienza a replicarse formando un concatámero de SaPIbov2 811. A continuación, el gen TerL de fago y el gen TerS de SaPIbov2 pueden combinar unir y escindir el concatámero de SaPIbov2 por medio de una secuencia del sitio *pac* en el ADN de SaPIbov2 y a continuación el concatámero de SaPIbov2 se puede empaquetar en cápsides de fago 812 dando como resultado partículas de fago que portan concatámeros de SaPIbov2 813. En este sistema, el ADN del fago no se empaquetará, ya que carece del gen *terS* que contiene la secuencia del sitio *pac* del fago y, por tanto, no se puede reconocer por las proteínas TerS de SaPIbov2 y TerL de fago expresadas.

IV. Indicadores

En algunos modos de realización, las NRTP y construcciones de la invención 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), GFP potenciada, proteína fluorescente amarilla (YFP), proteína fluorescente cian (CFP), proteína fluorescente azul (BFP), proteína fluorescente roja (RFP) o mCherry, así como proteínas fluorescentes en 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 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).

Los indicadores y ensayos de indicadores se describen además en la sección V en el presente documento.

V. Ensayos de NRTP e indicadores

A. Ensayo de indicador e inductor

La divulgación comprende procedimientos para el uso de NRTP como moléculas indicadoras para su uso con inductores endógenos o naturales que seleccionan promotores de genes dentro de células viables. Las NRTP de la invención se pueden genomanipular usando los procedimientos descritos en la sección III y a continuación en los ejemplos 1-6.

En algunos modos de realización, el procedimiento comprende emplear una NRTP como indicador, en el que la NRTP comprende un gen indicador que se enlaza funcionalmente a un promotor inducible que controla la expresión de un gen diana dentro de una célula diana. Cuando la NRTP que incluye el gen indicador se introduce en la célula diana, la expresión del gen indicador es posible por medio de la inducción del promotor del gen diana en la molécula de ácido nucleico indicadora.

La figura 9 representa un locus genómico de una célula diana 900 con dos genes, un gen que codifica un inductor 902 y un gen diana 903. También se representa una molécula de ácido nucleico indicadora 904 que incluye un gen indicador 905 que se enlaza funcionalmente al promotor 906 del gen diana de la célula diana. La molécula de ácido nucleico indicadora 904 se puede introducir en la célula por medio de una NRTP. En la célula natural, cuando el gen inductor 902 se expresa y produce la proteína inductora 907, la proteína inductora 907 puede inducir el promotor del gen diana 906 que se enlaza funcionalmente al gen diana, provocando así la expresión del gen diana y la producción del producto génico diana 908.

Cuando la molécula de ácido nucleico indicadora 904 está presente dentro del organismo diana, el inductor 907

también puede inducir el promotor del gen diana 906 presente dentro de la molécula de ácido nucleico indicadora 904, provocando así la expresión del gen indicador 905 dando como resultado la producción de una molécula indicadora 909 que puede generar una señal detectable.

- 5 Por tanto, la producción de una señal detectable de la molécula indicadora 909 es indicativa de la presencia de la célula, en base a la presencia de la proteína inductora 907 dentro de una célula diana.

1) Sistema indicador de VanR

10 En un modo de realización, el sistema indicador incluye NRTP que comprende una molécula de ácido nucleico indicadora (por ejemplo, plásmido). La molécula de ácido nucleico indicadora se puede construir para detectar VanR, el inductor del promotor del gen de resistencia a vancomicina (*vanA*) en *Enterococcus faecium* (o *E. faecalis*). El plásmido indicador porta un gen indicador que se enlaza funcionalmente al promotor del gen *vanA*.

15 La figura 10 explica el diseño y función de un sistema indicador de VanR. La figura 10 representa una región del transposón Tn1546 1001 que puede estar presente en *E. faecium*. El transposón Tn1546 puede incluir el gen inductor *vanR* 1002 y el gen diana *vanA* 1003. También se representa en la figura una molécula de ácido nucleico indicadora 1004 que se puede empaquetar en una NRTP e introducirse en la célula. La molécula de ácido nucleico indicadora 1004 incluye un gen indicador 1005 que se enlaza funcionalmente a un promotor P_H 1006 que controla la expresión del operón *vanHAX* que incluye el gen *vanA*. En la célula natural, cuando el gen *vanR* 1002 se expresa y produce la proteína VanR 1007, VanR puede inducir P_H 1006 en el transposón Tn1546, provocando así la expresión del gen *vanA* y produciendo así la proteína VanA 1008. Cuando la molécula de ácido nucleico indicadora 1003 (vector) está presente dentro del organismo diana, VanR también puede inducir P_H 1006 dentro de la molécula de ácido nucleico indicadora 1003, provocando así la expresión de una molécula indicadora 1009. Por tanto, la producción de una molécula indicadora es indicativa de la presencia de VanR dentro de una célula diana.

20 Los ejemplos de promotores que son adecuados para el desarrollo de un ensayo VRE incluyen: el promotor del gen *vanA* y un promotor del gen *vanB*. Arthur, M., *et al.*, *The VanS sensor negatively controls VanR-mediated transcriptional activation of glycopeptide resistance genes of Tn1546 and related elements in the absence of induction*. J. Bacteriol., 1997. **179**(1): p. 97-106.

2) Sistema indicador de TcdD

35 En otro modo de realización de este sistema, se introduce una molécula de ácido nucleico indicadora en una célula usando una NRTP. La molécula de ácido nucleico indicadora se puede construir para detectar TcdD, el inductor de los promotores de los genes de las toxinas A y B (*tcdA* y *tcdB*, respectivamente) de *C. difficile*. La molécula de ácido nucleico indicadora incluye un gen indicador que se enlaza funcionalmente al promotor del gen *tcdA*.

40 La figura 11 describe el diseño y función de un sistema indicador de TcdD, de acuerdo con un modo de realización de la invención. La figura 11 representa una región del transposón PaLoc 1101 que puede estar presente en *C. difficile*. El transposón PaLoc puede contener el gen *tcdD* 1102 y el gen diana *tcdA* 1103. También se representa en la figura una molécula de ácido nucleico indicadora 1104 (por ejemplo, vector) que se introduce en la célula usando una NRTP. La molécula de ácido nucleico indicadora 1104 incluye el gen indicador 1105 que se enlazó funcionalmente al promotor del gen *tcdA* (P_{tcdA}) 1106.

45 En la célula natural, cuando el gen *tcdD* se expresa y produce la proteína TcdD 1107, TcdD puede inducir P_{tcdA} 1106 en el transposón PaLoc 1101, provocando así la expresión del gen *tcdA* 1103 y produciendo así la proteína de toxina A 1108.

50 Cuando la molécula de ácido nucleico indicadora 1104 está presente dentro del organismo diana, TcdD también puede inducir P_{tcdA} 1106 dentro del vector indicador, provocando así la expresión de una molécula indicadora 1109. Por tanto, la producción de una molécula indicadora 1109 es indicativa de la presencia de TcdD dentro de una célula diana.

55 Los ejemplos de promotores adecuados para el desarrollo de un ensayo de *C. difficile* incluyen: el promotor del gen *tcdA* y el promotor del gen *tcdB*. Karlsson, S., *et al.*, *Expression of Clostridium difficile Toxins A and B and Their Sigma Factor TcdD Is Controlled by Temperature*. Infect. Immun., 2003. **71**(4): p. 1784-1793.

60 Células diana e inductores: Las células diana pueden incluir dianas de células eucariotas y procariotas e inductores asociados.

Sistemas de suministro de vector: El suministro del vector que contiene el ADN recombinante se puede realizar por sistemas abiólogos o biológicos. Incluyendo pero sin limitarse a liposomas, partículas similares a virus, partículas de transducción derivadas de fagos o virus, y conjugación.

65

3) Sistema indicador de SarS basado en bacteriófagos

En otro modo de realización de la invención, se construye una molécula de ácido nucleico indicadora para detectar SarS, el inductor del promotor del gen de la proteína A (spa) en *S. aureus*. La molécula de ácido nucleico indicadora se puede introducir en la célula en una NRTP e incluye los genes de la luciferasa bacteriana luxA y luxB enlazados funcionalmente al promotor del gen spa (P_{spa}). La molécula de ácido nucleico indicadora se suministra a *S. aureus* por medio de una NRTP, por ejemplo. Si SarS está presente en la célula, inducirá la expresión de los genes luxAB, produciendo así la enzima luciferasa que puede generar una señal luminiscente.

La figura 12 explica el diseño y función de un sistema indicador de SarS, de acuerdo con un modo de realización de la invención. La figura 12 representa una región del genoma de *S. aureus* 1201 que contiene el gen sarS 1202 y el gen spa 1203. También se representa en la figura una molécula de ácido nucleico indicadora (por ejemplo, Vector) 1204 suministrada por NRTP a la célula y que incluye los genes indicadores luxAB 1205 que se enlazaron funcionalmente al promotor P_{spa} 1206 que controla la expresión del gen spa 1203.

En la célula natural, cuando se expresa el gen sarS 1202, que produce la proteína SarS 1207, la proteína puede inducir P_{spa} 1206 en el transposón del genoma de *S. aureus*, provocando así la expresión del gen spa 1203 y produciendo la proteína A 1208.

Cuando la molécula de ácido nucleico indicadora 1204 está presente dentro del organismo diana, SarS 1207 también puede inducir P_{spa} 1206 dentro de la molécula de ácido nucleico indicadora 1204, provocando así la expresión de luxAB dando como resultado la producción de la enzima luciferasa 1209 que puede generar una señal luminiscente. Por tanto, la producción de luciferasa es indicativa de la presencia de SarS dentro de una célula diana.

B. Ensayo de indicador de enzima

La divulgación comprende un sistema para la detección de enzimas intracelulares dentro de células viables que emplea moléculas de sustrato encajadas que se pueden desencajar por una enzima intracelular diana, de acuerdo con un modo de realización de la invención.

La figura 13 representa el diseño y función de un sistema de detección de enzimas intracelulares. Un vector que expresa la molécula indicadora 1301 se suministra a una célula diana 1302 con una NRTP (no mostrado). El vector que expresa la molécula indicadora 1301 puede penetrar en la célula diana 1302 por medio de la NRTP y suministrar un gen de la molécula indicadora 1303 en la célula diana 1302, y una molécula indicadora 1304 se puede expresar a continuación a partir del gen de la molécula indicadora 1303. También se añade un sustrato encajado 1305 a la célula diana 1302 y puede penetrar en la célula diana 1302. Si una enzima intracelular diana 1307 está presente en la célula diana 1306, la enzima 1307 puede retirar el componente de encajado del sustrato encajado 1305, produciendo así un sustrato desencajado 1308. El sustrato desencajado 1308 puede reaccionar con la molécula indicadora 1304 dentro de la célula 1302, y el producto de esta reacción da como resultado una señal detectable 1309.

Células diana y enzimas: Las células diana pueden incluir dianas de células eucariotas y procariotas y enzimas asociadas, incluyendo, por ejemplo, β -lactamasas en *S. aureus*.

Sistemas de suministro de vector: El suministro del vector que contiene el ADN recombinante se puede realizar por sistemas abiológicos o biológicos. Incluyendo pero sin limitarse a liposomas, partículas similares a virus, partículas de transducción derivadas de fagos o virus, y conjugación.

Moléculas indicadoras y sustratos encajados: Se pueden emplear diversas moléculas indicadoras y sustratos encajados como los descritos en Daniel Sobek, J.R., Enzyme detection system with caged substrates, 2007, Zymera, Inc.

1) Indicador de β -lactamasa basado en bacteriófagos

En un modo de realización, un vector que expresa la molécula indicadora se puede portar por una NRTP, de modo que el vector se puede suministrar a una célula bacteriana. La molécula indicadora que se va a expresar puede ser la luciferasa de Renilla, y el sustrato encajado puede ser la luciferina de Renilla que está encajada, de modo que una enzima β -lactamasa que es endógena a la célula diana puede escindir el compuesto de encajado de la luciferina encajada y liberar luciferina desencajada.

La figura 14 representa el diseño y función de un sistema de detección de enzima β -lactamasa, de acuerdo con un modo de realización de la invención. Un vector que expresa luciferasa de Renilla portado por una NRTP basada en bacteriófagos 1401 se añade a una célula de *S. aureus* diana 1402. El vector que expresa luciferasa de Renilla puede penetrar en la célula diana 1402 usando una NRTP que comprende el vector. La NRTP administra el gen de la luciferasa de Renilla 1403 en la célula diana 1402, y la luciferasa de Renilla 1404 se puede expresar a continuación a partir de su gen. También se añade luciferina de Renilla encajada 1405 a la célula diana 1402 y puede penetrar en la célula diana 1402. Si una β -lactamasa intracelular 1407 está presente en la célula diana 1402,

la enzima puede retirar el componente de encajado de la luciferina encajada 1406, produciendo así una luciferina desencajada 1408. La luciferina desencajada 1408 puede reaccionar a continuación con la luciferasa de Renilla 1404 dentro de la célula 1402, y el producto de esta reacción da como resultado la luminiscencia 1409.

5 De esta manera, cuando una célula diana que contiene la β -lactamasa se expone a la NRTP y a la luciferina encajada, la célula presentará una señal luminiscente que es indicativa de la presencia de la β -lactamasa presente en la célula.

C. Indicador de molécula intracelular

10 La divulgación incluye un sistema para la detección de moléculas intracelulares dentro de células viables que emplea moléculas intercambiables que pueden generar una señal detectable tras su unión a una molécula diana.

15 La figura 15 representa el diseño y función de un sistema de detección de molécula intracelular basado en molécula intercambiable (SM). Un vector que expresa SM 1501 se suministra a una célula diana 1502 en una NRTP. El vector que expresa SM 1501 puede penetrar en la célula diana 1502 y suministrar un gen SM 1503 en la célula diana 1502. A continuación, una proteína SM 1504 se puede expresar a partir del gen SM 1503. A continuación, la proteína SM 1504 se puede unir a una molécula diana 1505 dentro de la célula y por tanto forma un complejo SM-molécula diana 1506. La unión de la SM 1504 a la molécula diana 1505 da como resultado un cambio conformacional en la SM 1504 que hace que la SM unida sea susceptible de unirse a un sustrato. Un sustrato 1508 se añade a la célula 1507 y puede penetrar en la célula 1502. La SM unida dentro de la célula 1502 también se puede unir al sustrato, formando así un complejo SM-molécula diana-sustrato 1509. Finalmente, la unión del sustrato 1508 por la SM unida a la molécula diana tiene el efecto de producir una señal detectable 1510. Por tanto, una señal detectable generada por el sistema es indicativa de la presencia de una molécula diana dentro de una célula.

25 **Moléculas y células diana:** Se pueden emplear varias dianas de células eucariotas y procariotas y se pueden diseñar SM basadas en aptámeros intercambiables para seleccionar diversas dianas moleculares intracelulares basadas en ácidos nucleicos y aminoácidos, como se describe en Samie Jaffrey, J.P., *Coupled recognition/detection system for in vivo and in vitro use*, 2010, Cornell University.

30 **Sistemas de suministro de vector:** El suministro del vector que contiene el ADN recombinante se puede realizar por sistemas abiológicos o biológicos. Incluyendo pero sin limitarse a liposomas, partículas similares a virus, partículas de transducción derivadas de fagos o virus, y conjugación.

1) Sistema indicador de molécula intracelular basado en aptámero intercambiable/partícula de transducción no replicativa

35 En un ejemplo de este procedimiento, un vector de expresión de molécula intercambiable se puede portar por una partícula de transducción basada en bacteriófagos de modo que el vector se puede suministrar en una célula bacteriana. La molécula intercambiable que se va a expresar puede ser un aptámero intercambiable que se diseña para experimentar un cambio conformacional tras su unión a una molécula diana intracelular. El cambio conformacional permite que el aptámero se una a continuación a un fluoróforo que presenta una fluorescencia potenciada cuando se une por el aptámero.

45 La figura 16 representa el diseño y función de un sistema indicador de molécula intracelular basado en aptámero intercambiable (SA)/bacteriófago. Se añade un vector que expresa SA portado por una NRTP 1601 a una célula diana 1602. La NRTP 1601 puede administrar el vector que expresa SA y el gen que expresa SA 1603 en la célula diana 1602. Una proteína SA 1604 se puede expresar a continuación a partir del gen SA 1603. La proteína SA 1604 se puede unir a una molécula diana 1605 dentro de la célula y por tanto formar un complejo SA-molécula diana 1606. La unión de la SA 1604 a la molécula diana 1605 da como resultado un cambio conformacional en la SA que hace que la SA unida sea susceptible de unirse a un fluoróforo 1608. Se añade un fluoróforo 1607 a la célula y puede penetrar en la célula 1608. La SA unida dentro de la célula también puede unir el fluoróforo formando así un complejo SA-molécula diana-fluoróforo 1609. Finalmente, la unión del fluoróforo por la SA unida a la molécula diana tiene el efecto de potenciar la fluorescencia del fluoróforo 1610. Por tanto, una señal fluorescente detectable generada por el sistema es indicativa de la presencia de una molécula diana dentro de una célula.

D. Ensayo de indicador de transcrito

60 La divulgación comprende un ensayo de indicador que comprende un procedimiento basado en ARN antisentido para detectar transcritos diana dentro de células viables provocando la expresión de una molécula indicadora si un transcrito diana está presente dentro de una célula.

65 Determinados procedimientos intracelulares en la técnica para inhibir la expresión génica emplean ARN interferente pequeño, tal como ARN bicatenario (ARNbc), para seleccionar genes transcritos en células. El ARNbc comprende hebras antisentido y sentido que se suministran en o se expresan en células, y las hebras del ARNbc actúan por medio de un mecanismo de inhibición de acción trans, donde una hebra (típicamente la hebra antisentido) se une a

una secuencia del gen diana (transcrito de ARN) y evita la expresión de la secuencia del gen diana. Se ha demostrado que las moléculas de ARN bicatenario bloquean (destruyen) la expresión génica en un mecanismo regulador altamente conservado conocido como interferencia de ARN (ARNi). El documento WO 99/32619 (Fire *et al.*) divulga el uso de un ARNbc de al menos 25 nucleótidos de longitud para inhibir la expresión de genes en *C. elegans*. También se ha mostrado que el ARNbc degrada el ARN diana en otros organismos, incluyendo plantas (véase, por ejemplo, el documento WO 99/53050, Waterhouse *et al.*; y el documento WO 99/61631, Heifetz *et al.*), *Drosophila* (véase, por ejemplo, Yang, D., *et al.*, *Curr. Biol.* (2000) 10:1191-1200) y mamíferos (véase el documento WO 00/44895, Limmer; y el documento DE 101 00 586.5, Kreutzer *et al.*). Sin embargo, la unión de una hebra del ARNbc al gen diana puede ser inespecífica. Si se aplicara un mecanismo similar a un sistema de detección, esta unión inespecífica puede dar como resultado altas tasas de positivos falsos, lo que lo hace inadecuado para el desarrollo de sistemas de detección clínicamente útiles.

Se ha demostrado que los mecanismos de inhibición de acción trans previos no inadecuados para el desarrollo de sistemas de detección clínicamente útiles. Por ejemplo, algunos procedimientos dan como resultado niveles altos de señales inespecíficas y hasta un 90 % de tasa de positivos falsos, cuando se logra un 90 % de sensibilidad del ensayo. Véase la patente de EE. UU. n.º 8.329.889. Se han desarrollado determinados procedimientos para la regulación postranscripcional de la expresión génica que usan un transcrito de marcador reprimido en cis, tal como un marcador de proteína fluorescente verde, donde el sitio de unión ribosómico del marcador se bloquea por la secuencia de represión cis, junto con un transcrito de ARN de activación trans. Cuando el transcrito de ARN de activación trans se une al transcrito del marcador reprimido en cis, se altera la estructura en horquilla del transcrito del marcador reprimido en cis y se expone el sitio de unión al ribosoma hacia 5' del gen marcador, permitiendo la transcripción y expresión del gen marcador. Sin embargo, estos procedimientos no se han usado previamente para la detección de transcritos endógenos, ni tienen éxito más allá de un mecanismo de intercambio básico para controlar la expresión de genes en células.

1) Interacciones y mecanismos de la molécula de ácido nucleico

Los procedimientos de la invención aprovechan los mecanismos de regulación a nivel de transcrito, incluyendo el mecanismo de ARN antisentido (ARNas) en células, para suministrar moléculas de ácido nucleico en células. El mecanismo antisentido incluye todas las formas de reconocimiento de ARNm de secuencia específica que dan lugar a la expresión reducida, eliminada, incrementada, activada o alterada de otro modo de un transcrito diana. Véase Good, L., *Translation Repression By Antisense Sequences*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2003. 60(5): p. 854-861, y Lioliou, E., *RNA-mediated regulation in bacteria: from natural to artificial systems*, *New Biotechnology*. 2010. 27(3): p. 222-235. Los ARNas naturales se encuentran en los tres reinos de la vida y afectan a la destrucción, represión y activación del ARN mensajero (ARNm), así como al procesamiento y transcripción del ARN. Véase Sabine, B., *Antisense-RNA regulation and RNA Interference*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 2001. 1575(1-3): p. 15-25. Este mecanismo se ha explotado en la inhibición de la síntesis de proteínas para aplicaciones terapéuticas.

El ARN antisentido es un ARN monocatenario que es complementario a una hebra de ARN mensajero (ARNm) transcrita dentro de una célula. El ARNas se puede introducir en una célula para inhibir la traducción de un ARNm complementario por emparejamiento de bases con él y obstrucción física del mecanismo de traducción. El ARN antisentido se hibrida a una secuencia diana de ARNm complementario, y la traducción de la secuencia diana de ARNm se altera como resultado del impedimento estérico del acceso al ribosoma o bien de la lectura ribosómica.

El mecanismo de ARN antisentido es diferente de la interferencia de ARN (ARNi), un proceso relacionado en el que los fragmentos de ARN bicatenario (ARNbc, también llamado ARN interferente pequeño (ARNip)) desencadenan la inactivación génica mediada catalíticamente, 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 ARN 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 desarrolla 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 en el 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.

Con respecto a las interacciones de ácido nucleico de los mecanismos de la invención, las interacciones entre un transcrito indicador y un transcrito diana se pueden basar en 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.

2) Mecanismos para la represión cis y la transactivación de la traducción de una construcción de indicador por medio de la regulación a nivel de transcrito

5 La siguiente descripción ilustra sistemas indicadores de transcrito basados en diversos mecanismos de represión/activación que se pueden usar, de acuerdo con modos de realización de la presente invención. En cada una de las figuras 17-20, un vector incluye una construcción indicadora que comprende una secuencia indicadora, y las regiones en la construcción indicadora se muestran en cada una de las figuras, incluyendo regiones que se pueden seleccionar para represión por una secuencia de represión cis. La descripción a continuación proporciona ejemplos no limitantes de diversos mecanismos de inhibición, incluyendo atenuación de transcripción, atenuación de traducción y desestabilización del transcrito, y diversos mecanismos de activación incluyendo cambios conformacionales y escisión.

15 La figura 17 representa un ejemplo de un sistema 1700 que usa un mecanismo de represión cis que puede seleccionar la 5' UTR (región no traducida) 1701 de la secuencia indicadora 1702 en un transcrito indicador 1703. También se muestran las regiones dentro de la secuencia indicadora 1702 (5'UTR (1701), RBS, región codificante y 3'UTR). La secuencia de represión cis 1705 está hacia 5' de la secuencia indicadora y hasta el 5' UTR 1701 de la secuencia indicadora. Una ARN polimerasa 1704 transcribe la secuencia de la construcción indicadora 1703 del vector 1706.

25 En algún momento durante la transcripción, el proceso de transcripción se detiene por la formación de una estructura tallo-bucle de terminación de la transcripción (TT) 1707 en el transcrito indicador 1703, debido a una interacción dentro de la secuencia de represión cis transcrita 1705. La estructura de terminación de la transcripción 1707 impide 1708 que la ARN polimerasa 1704 transcriba el vector 1706. En algunos modos de realización, una proteína de terminación de la transcripción (por ejemplo, NusA en *E. coli*) se une a la ARN polimerasa y/o a la estructura de terminación de la transcripción 1707 para interrumpir la transcripción de la construcción indicadora.

30 Cuando un transcrito diana 1709 está presente en la célula, el transcrito diana 1709 se une al transcrito indicador 1703. En algunos modos de realización, la unión entre el transcrito diana y el transcrito indicador es por emparejamiento de bases de los nucleótidos en cada secuencia. La interacción entre el transcrito diana 1709 y el transcrito indicador 103 provoca que la estructura tallo-bucle de terminación de la transcripción (TT) 1707 se escinda 1710. La escisión del transcrito indicador 1703 se puede producir por una enzima celular, tal como la ARNasa III, por ejemplo. En este caso, la estructura secundaria de un transcrito diana se analiza para determinar la presencia de una secuencia consenso de ARNasa III entre las regiones de ARNmc de la estructura secundaria, por ejemplo 5'-nnWAWGNNNUUN-3' o 5'-NAGNNNCWUWnn-3' donde "N" y "n" son cualquier nucleótido y "W" es A o U y "N" indica un requisito relativamente estricto para el emparejamiento de bases de Watson-Crick, mientras que "n" indica un requisito mínimo para el emparejamiento de bases. Cuando se encuentra una secuencia consenso de este tipo en un transcrito diana, el bucle de la estructura de terminación de la transcripción 1707 se puede diseñar para ser complementario a dicha secuencia consenso de ARNasa III de modo que cuando el ARNmc en cada molécula de ARN se hibride, se forma el sitio de escisión de ARNasa III permitiendo la escisión de la estructura de terminación de la transcripción 1707. En el transcrito de mecA, el bucle T23, que comienza en el nucleótido 1.404, tiene la secuencia CAGAUACAUUUU que es adecuada para un enfoque de este tipo.

45 En algunos modos de realización, se genomanipula un sitio de escisión en la construcción indicadora, de modo que el transcrito indicador se escinde después de la transcripción. La escisión, en el ejemplo proporcionado, se puede producir inmediatamente adyacente a la localización del bucle en la estructura terminadora de la transcripción. La transcripción se reinicia 1711 por la ARN polimerasa 104. La escisión de la estructura tallo-bucle de terminación de la transcripción (TT) 1707 permite que el resto de la secuencia indicadora 1702 se transcriba y posteriormente se traduzca. Esto da como resultado la producción de un marcador detectable o seleccionable a partir de la molécula indicadora traducida.

55 En procariontes, la estructura de terminación de la transcripción 1707 implica un mecanismo independiente de Rho con una estructura tallo-bucle que tiene 7-20 pares de bases de longitud, rica en pares de bases citosina-guanina y es seguida por una cadena de residuos uracilo. NusA se une a la estructura tallo-bucle de terminación de la transcripción 1707 provocando que la ARN polimerasa se pare durante la transcripción de la secuencia de poli-uracilo. Los enlaces adenina-uracilo débiles reducen la energía de desestabilización para el dúplex ARN-ADN, permitiéndole desenrollarse y disociarse de la ARN polimerasa. En eucariotas, la estructura de terminación de la transcripción 1707 se reconoce por factores proteicos e implica la escisión del nuevo transcrito seguido de poliadenilación.

60 La figura 18 muestra un ejemplo de un sistema 1800 para detectar la presencia de un transcrito diana en una célula que se basa en un mecanismo de represión cis que selecciona el sitio de unión al ribosoma (RBS) 1801 de la secuencia indicadora 1702 en el transcrito indicador 1703. El RBS 1801 es una secuencia de ARNm que se une por el ribosoma 1802 cuando se inicia la traducción de proteínas. La secuencia de represión cis 1705 se diseña para unirse al RBS 1801 (por ejemplo, la secuencia de represión cis 1705 es complementaria a la secuencia de RBS

1801). El RBS 1801 se une a la secuencia de represión cis 1705 y queda secuestrado (inaccesible por un ribosoma 1802), evitando la traducción del transcrito indicador 1703. Cuando un transcrito diana 109 de la célula se une al transcrito indicador 1703, el transcrito diana 1709 tiene una afinidad de unión mayor por la secuencia de RBS 1801, y se produce un cambio conformacional en el transcrito indicador 1703 de manera que libera la unión entre la secuencia de represión cis 1705 y la secuencia de RBS 1801. Esto permite que el ribosoma 1802 se una al RBS 1801, permitiendo de este modo la traducción del transcrito indicador 1703.

La figura 19 ilustra un sistema ejemplar 1900 para detectar la presencia de un transcrito diana en una célula que se basa en un mecanismo de represión cis que selecciona la región codificante ("AUG") 1901 de la secuencia indicadora 1702 en el transcrito indicador 1703. La secuencia de represión cis 1705 se construye de modo que se une con (por ejemplo, complementaria a) la región codificante 1901 de la secuencia indicadora 1702. El codón de inicio "AUG" se muestra como parte de la región codificante 1901. La unión de la secuencia de represión cis 1705 y la región codificante 1901 da como resultado una conformación que da lugar a la escisión 1902 de la construcción indicadora 1703. La escisión del transcrito indicador 1703 evita la traducción.

Cuando un transcrito diana 1709 está presente en la célula, el transcrito diana 1709 se une a la secuencia de represión cis 1705 de manera que provoca un cambio conformacional en el transcrito indicador 1703. Este cambio conformacional evita o retira la interacción entre la secuencia de represión cis 1705 y la región codificante 1901 de la secuencia indicadora 1702, permitiendo de este modo la traducción de la secuencia indicadora 1702.

La figura 20 ilustra un sistema de ejemplo 2000 para detectar la presencia de un transcrito diana en una célula que se basa en un mecanismo de represión que usa un transcrito indicador inestable 2001. El transcrito indicador 2001 se diseña para ser inestable de modo que forma una conformación inestable que impide la traducción del transcrito indicador 2001. Un transcrito indicador 2001 se define como inestable si es propenso a la degradación rápida debido a una variedad de factores, tales como la actividad de complejos de exosomas o un degradosoma. Un transcrito diana 1709 en la célula se une a una porción del transcrito indicador inestable 2001. En este ejemplo, la porción responsable de desestabilizar el transcrito se localiza en la 3' UTR 2005 de la secuencia indicadora, y la 3' UTR 2005 actúa como la secuencia de represión cis de la construcción indicadora 1703. La unión del transcrito diana 1709 con la 3' UTR 2005 de la secuencia indicadora da como resultado un acontecimiento de escisión 2003 que estabiliza el transcrito indicador 2001 y permite la traducción 2004 del transcrito indicador 2001. La escisión se produce tras la unión del transcrito diana 1709 y sirve para retirar la porción de secuencia que es responsable de desestabilizar el transcrito. En este ejemplo, el transcrito diana 1709 se une a la 3' UTR 405 de la secuencia indicadora, pero el sistema 400 también se puede diseñar de modo que la unión y escisión se produzcan en la 5' UTR, hacia 5' de la 5' UTR, o hacia 3' de la 3' UTR. La unión y escisión se pueden producir en cualquier lugar fuera de las regiones necesarias para la traducción de la secuencia indicadora 1702.

En algunos modos de realización, la secuencia de represión cis en sí misma comprende dos secuencias que se pueden unir entre sí (por ejemplo, complementarias entre sí) y la conformación del transcrito indicador que resulta de la unión de las dos secuencias de la secuencia de represión cis evita la traducción de la secuencia indicadora en el transcrito indicador.

3) Sistemas naturales y sintéticos para mecanismos de represión/activación

Se han descrito varios mecanismos a nivel de transcrito producidos de forma natural y sintética que demuestran los mecanismos individuales (es decir, cambio conformacional y escisión) empleados en cada uno de los ejemplos ilustrados en las figuras 17-20.

Se ha observado la terminación de la transcripción en la atenuación transcripcional mediada por ARN antisentido (ARNas). En un ejemplo, dos interacciones bucle-bucle entre ARN III/ARNm repR se siguen posteriormente por la formación de un dúplex estable. Este complejo estabiliza una estructura terminadora independiente de Rho para detener el alargamiento por la ARN polimerasa (RNAP).

El mecanismo de secuestro de RBS se ha descrito por medio del desarrollo de un sistema de riborregulador sintético. En este sistema, una secuencia complementaria a un RBS se coloca hacia 5' del RBS, permitiendo la presencia de una secuencia conectora entre las dos regiones. Después de la transcripción del ARNm, las dos regiones complementarias se hibridan creando una horquilla que evita el acoplamiento del ribosoma. Para activar la traducción, un ARN de activación trans sintético que porta la secuencia de RBS se une al ARN hibridado, permitiendo que el RBS quede expuesto y disponible para traducción.

La prevención de la traducción debido a la escisión del ARN también se ha descrito en un sistema natural donde MicC de ARNas selecciona una secuencia dentro de la región codificante del ARNm ompD. La interacción, que se promueve por Hfq, provoca la escisión del ARNm por la RNasa E.

Aún otro mecanismo natural demuestra un acontecimiento de división para activar la traducción en lugar de inhibirla. El ARNas de GadY de *E. coli* selecciona la región intergénica entre dos genes del operón gadXW. Después de la formación de una hélice estable entre GadY y la 3'UTR de gadX, se produce una escisión de RNasa en el transcrito

y estabiliza el transcrito de *gadX* permitiendo su traducción.

4) Mecanismo de cambio conformacional por represión cis de la secuencia indicadora y por unión de un transcrito diana

Los mecanismos generales empleados en la invención son interacciones de moléculas de ácido nucleico intermoleculares que pueden dar como resultado dos mecanismos posteriores: (1) un cambio conformacional en la estructura secundaria de las moléculas de ácido nucleico, y (2) un acontecimiento de escisión. En el presente documento se describen procedimientos para diseñar transcritos indicadores que pueden experimentar un cambio conformacional entre una conformación reprimida en cis y una conformación desreprimida, de modo que el cambio conformacional se induce por la unión de un transcrito diana al transcrito indicador.

Como se describe anteriormente, un transcrito indicador puede comprender una secuencia indicadora y diseñarse de modo que la traducción de la secuencia de gen indicador se bloquee por represión cis del sitio de unión al ribosoma (RBS) del gen indicador.

En algunos modos de realización, las siguientes herramientas se pueden usar para diseñar los transcritos indicadores.

1) La estructura secundaria de ARN se calcula usando un programa de estructura secundaria, tal como Mfold disponible en un servidor mantenido por The RNA Institute College of Arts and Sciences, University at Albany, State University of New York (Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31 (13), 3406-15, (2003)) (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>).

2) Las interacciones de ARN intermoleculares se calculan usando un programa informático tal como la predicción RNA-RNA InterACTion usando Integer Programming (RactIP) disponible en un servidor mantenido por The Graduate School of Information Science, Nara Institute of Science and Technology (NAIST), Department of Biosciences and Informatics, Keio University Japan (<http://rna.naist.jp/ractip/>).

3) La estructura secundaria de ARN se visualiza usando Visualization Applet for RNA (VARNA) (<http://varna.lri.fr/>), que es una Applet ligera de Java dedicada a dibujar la estructura secundaria de ARN.

Se puede generar una estructura secundaria del transcrito diana en base a la conformación de menor energía calculada por MFold y visualizada con VARNA.

Se pueden identificar regiones de ARNmc o regiones diana dentro del transcrito diana que puede ser ideal para la unión a un transcrito indicador. En algunos casos, la estructura secundaria del transcrito diana incluye una secuencia consenso o secuencia de bucle que se puede unir a una porción de la secuencia indicadora. Por ejemplo, en el transcrito de *mecA* de *S. aureus* resistente a meticilina, existe un bucle terminal que incluye una secuencia YUNR consenso ("UUGG") que se puede usar para unirse a una secuencia de represión cis de un transcrito indicador. El análisis de la estructura secundaria del transcrito diana puede revelar estas una o más regiones de ARNmc que pueden ser adecuadas para la unión a una secuencia de represión cis. La secuencia de represión cis del transcrito indicador se puede diseñar a continuación para unirse a estas una o más regiones de ARNmc.

En algunos modos de realización, la secuencia de represión cis se puede diseñar para unirse al RBS de la secuencia indicadora en el transcrito indicador y formar una estructura tallo-bucle dentro del transcrito indicador, de modo que la secuencia de represión cis bloquea la unión de una ARN polimerasa a la RBS de la secuencia indicadora. Tras la unión de la secuencia de represión cis a la región de ARNmc del transcrito diana, el RBS de la secuencia indicadora se puede exponer y la traducción de la secuencia indicadora se puede iniciar.

En algunos modos de realización, la secuencia de represión cis del transcrito indicador se puede diseñar para situarse en el extremo 5' de la secuencia indicadora y diseñarse para generar una estructura tallo-bucle en la secuencia indicadora, de modo que la secuencia de RBS de la secuencia indicadora se bloquea. La estructura tallo-bucle de represión cis se puede diseñar para bloquear la secuencia de RBS en base a la conformación de menor energía del transcrito indicador, calculada por MFold y visualizada con VARNA. Las interacciones intermoleculares predichas entre el transcrito diana y la secuencia de represión cis del transcrito indicador se pueden calcular por RactIP y visualizarse por VARNA. Se puede dibujar un diagrama para visualizar el emparejamiento de bases entre el transcrito diana y la secuencia de represión cis del transcrito indicador, como se muestra en la figura 28 a continuación.

La interacción puede incluir el emparejamiento de bases entre 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 o más nucleótidos en la secuencia diana y la secuencia de represión cis. La unión complementaria entre las dos secuencias puede ser completamente complementaria, sustancialmente complementaria o parcialmente complementaria. El emparejamiento de bases puede ser a través de secuencias de nucleótidos contiguas o regiones dentro de las secuencias diana y de represión cis, por ejemplo, como se muestra en la figura 28.

5) Mecanismos de escisión para transcritos reprimidos en cis o transcritos indicadores

Los mecanismos generales empleados en la invención son interacciones de moléculas de ácido nucleico intermoleculares que pueden dar como resultado dos mecanismos posteriores: (1) un cambio conformacional en la estructura secundaria de las moléculas de ácido nucleico, y (2) un acontecimiento de escisión. En el presente documento se describen procedimientos y sistemas para diseñar transcritos indicadores que emplean un acontecimiento de escisión.

En algunos modos de realización, se puede emplear un mecanismo de escisión en el sistema y los procedimientos de la invención para represión cis o para activación trans. Por ejemplo, como se describe anteriormente en las figuras 17, 19 y 20, se puede diseñar un sistema para aprovechar un mecanismo de escisión exponiendo una secuencia de ácido nucleico del transcrito indicador a una enzima de escisión (RNasa) o secuestrando una secuencia monocatenaria que se reconoce por una secuencia específica de ARNasa.

En un ejemplo, se puede diseñar un sitio de ribonucleasa E (ARNasa E) en el transcrito indicador ("*" indica el sitio de escisión):

(G,A)N(C,A)N(G)(G,U,A)*(A,U)(C,U)N(C,A)(C,A). Véase Kaberdin *et al.*, *Probing the substrate specificity of E. coli RNase E using a novel oligonucleotide-based assay*. *Nucleic Acids Research*, 2003, Vol. 31, n.º 16 (doi: 10.1093/nar/gkg690).

En un sistema de represión cis, se puede incorporar una secuencia de represión cis en el diseño de un transcrito indicador, de modo que cuando se transcribe, la conformación del transcrito indicador expone una región monocatenaria que contiene un motivo de reconocimiento de ARNasa E de secuencia en el sitio deseado que se escinda. En algunos modos de realización, el sitio de escisión puede estar implicado en la represión de la transcripción del transcrito indicador, por ejemplo, si el sitio de escisión está dentro de la región codificante del gen indicador.

Para un sistema de desrepresión trans, el transcrito reprimido en cis se puede diseñar para unirse a un transcrito diana, de modo que la interacción provoca un cambio conformacional en el transcrito indicador que secuestra la región monocatenaria que contiene el sitio de ARNasa E.

El sistema se puede diseñar de modo que el mecanismo de represión cis se deba a una estructura secundaria específica generada por una conformación de la secuencia de represión cis, tal como la estructura de terminación de la transcripción descrita anteriormente. En este ejemplo, un acontecimiento de escisión sirve para desreprimir la secuencia indicadora. Esto se puede lograr diseñando la secuencia de represión cis para interactuar con (unirse a) un plásmido natural u otro transcrito celular, de modo que la interacción da como resultado la generación de una región monocatenaria que contiene el sitio de ARNasa E que se puede escindir y por tanto retira la secuencia de represión cis del transcrito indicador.

En algunos modos de realización, cuando se emplea un acontecimiento de escisión para la expresión del indicador, el sitio de ARNasa E se diseña para estar fuera de la región codificante de una secuencia indicadora con longitud de secuencia suficiente en la 5' y 3' UTR para permitir un transcrito indicador viable. En este caso, el sitio de ARNasa E se diseña para ser al menos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 o más pares de bases hacia 5' del codón de inicio en sistemas procariontes y al menos 18, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 o más bases pares hacia 5' del codón de inicio en sistemas eucariotas o al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 o más pares de bases hacia 3' del codón de parada. En otros modos de realización, cuando se emplea un acontecimiento de escisión para la represión del indicador, el sitio de ARNasa E se diseña para estar dentro de la región codificante de la secuencia indicadora o colocado de otro modo para inhibir la expresión del indicador.

6) Transcritos

Como se describe anteriormente, un transcrito es una longitud de secuencia de nucleótidos (ADN o ARN) transcrita a partir de un gen o secuencia molde de ADN o ARN. El transcrito puede ser una secuencia de ADNc transcrita a partir de un molde de ARN o una secuencia de ARNm transcrita a partir de un molde de ADN. El transcrito se puede transcribir a partir de una construcción de ácido nucleico genomanipulada. El transcrito puede tener regiones de complementariedad dentro de sí misma, de modo que el transcrito incluye dos regiones que pueden formar un dúplex intramolecular. Una región se puede denominar una "secuencia de represión cis" que se une a y bloquea la traducción de una secuencia indicadora. Una segunda región del transcrito se denomina una "secuencia indicadora" que codifica una molécula indicadora, tal como un marcador detectable o seleccionable.

Los transcritos pueden ser una secuencia de transcrito que puede tener 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 nucleótidos de longitud. En otros modos de realización, el transcrito puede tener al menos 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000 o más nucleótidos de longitud. La secuencia de represión cis y la secuencia indicadora pueden tener la misma longitud o diferentes longitudes.

En algunos modos de realización, la secuencia de represión cis se separa de la secuencia indicadora por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más nucleótidos espaciadores.

7) Vectores

En otro aspecto, los transcritos (incluyendo las secuencias antisentido y sentido) se expresan a partir de unidades de transcripción insertadas en vectores de ADN o ARN (véase, por ejemplo, Couture, A, *et al.*, TIG. (1996), 12:5-10; Skillern, A., *et al.*, publicación PCT internacional n.º WO 00/22113, Conrad, publicación PCT internacional n.º WO 00/22114, y Conrad, patente de EE. UU. n.º 6.054.299). Estas secuencias se pueden introducir como una construcción lineal, un plásmido circular o un vector vírico, incluyendo vectores basados en bacteriófagos, que se pueden incorporar y heredar como un transgén integrado en el genoma del huésped. El transcrito también se puede construir para permitir que se herede como un plásmido extracromosómico (Gassmann, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) **92**:1292).

Las secuencias de transcrito se pueden transcribir por un promotor localizado en el plásmido de expresión. En un modo de realización, las secuencias de represión cis e indicadoras se expresan como una repetición invertida unida por una secuencia polinucleotídica conectora de modo que el transcrito tiene una estructura tallo-bucle.

Se pueden usar vectores de expresión recombinantes para expresar los transcritos. Los vectores de expresión recombinantes son en general plásmidos de ADN o vectores víricos. Se pueden construir vectores víricos que expresan los transcritos en base a, pero sin limitarse a, virus adenoasociados (para una revisión, véase Muzyczka, *et al.*, *Curr. Topics Micro. Immunol.* (1992) 158:97-129); adenovirus (véase, por ejemplo, Berkner, *et al.*, *BioTechniques* (1998) 6:616), Rosenfeld *et al.* (1991, *Science* 252:431-434), Rosenfeld *et al.* (1992), *Cell* 68:143-155); o alfavirus así como otros conocidos en la técnica. Se han usado retrovirus para introducir una variedad de genes en muchos tipos celulares diferentes, incluyendo células epiteliales, *in vitro* y/o *in vivo* (véase, por ejemplo, Eglitis, *et al.*, *Science* (1985) 230:1395-1398; Danos y Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998) 85:6460-6464; Wilson *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3014-3018; Armentano *et al.*, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:61416145; Huber *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8039-8043; Ferry *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8377-8381; Chowdhury *et al.*, 1991, *Science* 254:1802-1805; van Beusechem, *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7640-19; Kay *et al.*, 1992, *Human Gene Therapy* 3:641-647; Dai *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10892-10895; Hwu *et al.*, 1993, *J. Immunol.* 150:4104-4115; patente de EE. UU. n.º 4.868.116; patente de EE. UU. n.º 4.980.286; solicitud PCT WO 89/07136; solicitud PCT WO 89/02468; solicitud PCT WO 89/05345; y solicitud PCT WO 92/07573). Los vectores retrovíricos recombinantes que pueden transducir y expresar genes insertados en el genoma de una célula se pueden producir transfectando el genoma retrovírico recombinante en líneas celulares de empaquetamiento adecuadas tales como PA317 y Psi-CRIP (Comette *et al.*, 1991, *Human Gene Therapy* 2:5-10; Cone *et al.*, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6349). Los vectores adenovíricos recombinantes se pueden usar para infectar una amplia variedad de células y tejidos en huéspedes susceptibles (por ejemplo, rata, hámster, perro y chimpancé) (Hsu *et al.*, 1992, *J. Infectious Disease*, 166:769), y también tienen la ventaja de no requerir células mitóticamente activas para la infección.

Se puede usar cualquier vector vírico que pueda aceptar las secuencias codificantes para el/los transcrito(s) que se van a expresar, por ejemplo, vectores derivados de adenovirus (AV); virus adenoasociado (AAV); retrovirus (por ejemplo, lentivirus (LV), rabdovirus, virus de la leucemia murina); virus del herpes y similares. El tropismo de los vectores víricos se puede modificar seudotipando los vectores con proteínas de envoltura u otros antígenos de superficie de otros virus, o sustituyendo diferentes proteínas de la cápside vírica, según sea apropiado.

Por ejemplo, los vectores lentivíricos presentados en la invención se pueden seudotipar con proteínas de superficie del virus de la estomatitis vesicular (VSV), rabia, ébola, Mokola y similares. Los vectores AAV presentados en la invención se pueden preparar para seleccionar diferentes células genomanipulando los vectores para expresar diferentes serotipos de proteínas de la cápside. Las técnicas para construir vectores AAV que expresan diferentes serotipos de proteínas de la cápside están dentro de la habilidad en la técnica; véase, por ejemplo, Rabinowitz J E *et al.* (2002), *J Virol* 76:791-801.

La selección de vectores víricos recombinantes adecuados para su uso en la invención, procedimientos para insertar secuencias de ácido nucleico para expresar los transcritos en el vector, y procedimientos para suministrar el vector vírico a las células de interés están dentro de la habilidad en la técnica. Véase, por ejemplo, Dornburg R (1995), *Gene Therap.* 2: 301-310; Eglitis M A (1988), *Biotechniques* 6: 608-614; Miller A D (1990), *Hum Gene Therap.* 1: 5-14; Anderson W F (1998), *Nature* 392: 25-30; y Rubinson D A *et al.*, *Nat. Genet.* 33: 401-406.

Los vectores víricos se pueden derivar de AV y AAV. Un vector AV adecuado para expresar los transcritos presentados en la invención, un procedimiento para construir el vector AV recombinante, y un procedimiento adecuado para suministrar el vector en células diana, se describen en Xia H *et al.* (2002), *Nat. Biotech.* 20: 1006-1010. Los vectores AAV adecuados para expresar los transcritos presentados en la invención, procedimientos para construir el vector AV recombinante y procedimientos para suministrar los vectores en células diana se describen en

Samulski R *et al.* (1987), J. Virol. 61: 3096-3101; Fisher K J *et al.* (1996), J. Virol, 70: 520-532; Samulski R *et al.* (1989), J. Virol. 63: 3822-3826; patente de EE. UU. n.º 5.252.479; patente de EE. UU. n.º 5.139.941; solicitud de patente internacional n.º WO 94/13788; y solicitud de patente internacional n.º WO 93/24641.

5 El promotor que dirige la expresión del transcrito en un plásmido de ADN o bien un vector vírico presentado en la invención puede ser una ARN polimerasa eucariota I (por ejemplo, promotor de ARN ribosómico), ARN polimerasa II (por ejemplo, promotor temprano de CMV o promotor de actina o promotor de ARNs de U1) o en general promotor de ARN polimerasa III (por ejemplo, promotor de ARNs de U6 o ARN de 7SK) o un promotor procariota, por ejemplo, el promotor T7, siempre que el plásmido de expresión también codifique la ARN polimerasa de T7
10 requerida para la transcripción de un promotor T7. El promotor también puede dirigir la expresión transgénica al páncreas (véase, por ejemplo, la secuencia reguladora de insulina para el páncreas (Bucchini *et al.*, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:2511-2515)).

15 Además, la expresión del transcrito se puede regular con precisión, por ejemplo, usando una secuencia reguladora inducible y sistemas de expresión tales como una secuencia reguladora que es sensible a determinados reguladores fisiológicos, por ejemplo, niveles de glucosa en circulación u hormonas (Docherty *et al.*, 1994, FASEB J. 8:20-24). Dichos sistemas de expresión inducibles, adecuados para el control de la expresión transgénica en células o en mamíferos incluyen la regulación por ecdisona, por estrógeno, progesterona, tetraciclina, inductores químicos de dimerización e isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Un experto en la técnica podría elegir la secuencia reguladora/promotora apropiada en base al uso previsto del transgén de ARNbc.
20

En general, los vectores recombinantes que pueden expresar moléculas de transcrito se suministran como se describe a continuación, y persisten en células diana. De forma alternativa, se pueden usar vectores víricos que proporcionan la expresión transitoria de moléculas de transcrito. Dichos vectores se pueden administrar repetidamente según sea necesario. Una vez expresado, el transcrito se une al ARN diana y modula su función o expresión. El suministro de vectores que expresan el transcrito puede ser sistémico, tal como por administración intravenosa o intramuscular, por administración a células diana explantadas del paciente seguido de reintroducción en el paciente, o por cualquier otro medio que permita la introducción en una célula diana deseada.
25

30 Los plásmidos de ADN de expresión de transcrito se transfectan típicamente en células diana como un complejo con vehículos lipídicos catiónicos (por ejemplo, oligofectamina) o vehículos basados en lípidos no catiónicos (por ejemplo, Transit-TKO™). También se contemplan por la divulgación múltiples transfecciones lipídicas para inactivaciones mediadas por ARNbc que seleccionan diferentes regiones de un solo gen PROC o múltiples genes PROC durante un período de una semana o más. La introducción exitosa de vectores en células huésped se puede seguir usando diversos procedimientos conocidos. Por ejemplo, la transfección transitoria se puede señalar con un indicador, tal como un marcador fluorescente, tal como proteína fluorescente verde (GFP). La transfección estable de células *ex vivo* se puede garantizar usando marcadores que proporcionen a la célula transfectada resistencia a factores ambientales específicos (por ejemplo, antibióticos y fármacos), tales como resistencia a higromicina B.
35

40 El suministro del vector que contiene el ADN recombinante se puede realizar por sistemas abiológicos o biológicos. Incluyendo pero sin limitarse a liposomas, partículas similares a virus, partículas de transducción derivadas de fagos o virus, y conjugación.

8) Indicadores para el ensayo de transcrito

45 En algunos modos de realización, la construcción de ácido nucleico comprende una secuencia indicadora (por ejemplo, una secuencia de gen indicador). El gen indicador codifica una molécula indicadora que produce una señal cuando se expresa en una célula. En algunos modos de realización, la molécula indicadora puede ser un marcador detectable o seleccionable. En determinados modos de realización, la molécula indicadora puede ser una molécula indicadora fluorescente, tal como una proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente amarilla (YFP), proteína fluorescente cian (CFP), proteína fluorescente azul (BFP) o proteína fluorescente roja (RFP). En otros modos de realización, la molécula indicadora puede ser una proteína quimioluminiscente.
50

Las moléculas indicadoras pueden ser una luciferasa bacteriana, una luciferasa eucariota, una proteína fluorescente, una enzima adecuada para detección colorimétrica, una proteína adecuada para inmunodetección, un péptido adecuado para inmunodetección y/o un ácido nucleico que funciona como un aptámero o que presenta actividad enzimática.
55

Los marcadores seleccionables también se pueden usar como indicador. El marcador seleccionable puede ser un gen de resistencia a antibióticos, por ejemplo.
60

9) Células y genes diana para el ensayo de indicador de transcrito

Los ejemplos de células que se pueden usar para la detección incluyen bacterias grampositivas y gramnegativas, tales como *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, etc., hongos como *Streptomyces coelicolor* y otras células eucariotas, incluyendo células de humanos, otros mamíferos, insectos, invertebrados o plantas.
65

Los transcritos diana pueden incluir cualquier transcrito endógeno, ya sea codificante o no codificante. Los transcritos diana se pueden derivar de células eucariotas y procariotas, incluyendo, por ejemplo, transcrito de *mecA* en células de *S. aureus* (indicativo de SARM), transcrito de *tcdB* en *C. difficile* (indicativo de *C. diff* toxinógeno) y transcritos E6/E7 de PVH en células epiteliales cervicouterinas (indicativas de cáncer cervicouterino). Los genes asociados con agentes infecciosos, tales como virus, también pueden ser dianas, incluyendo VIH, PVH, etc. Otros ejemplos de genes diana incluyen ARN no codificante tal como ARN de transferencia (ARNt) y ARN ribosómico (ARNr), así como los ARN tales como ARNnop, microARN, ARNip, ARNsn, ARNex, y ARNpi y ARNnc.

10 EJEMPLOS

A continuación hay ejemplos de modos de realización específicos para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen solo para propósitos ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ningún modo. Se han realizado esfuerzos para garantizar la exactitud con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.) pero se debe tener en cuenta alguna desviación y error experimental.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otro modo, procedimientos convencionales de química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología, dentro de la habilidad de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la literatura. Véanse, por ejemplo, T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2.^a edición, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick y N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18.^a edición (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey y Sundberg *Advanced Organic Chemistry* 3.^a ed. (Plenum Press) Vol. A y B(1992).

25 **Ejemplo 1: sistema de empaquetamiento de mutación sinónima/complementación**

El siguiente es un ejemplo del diseño y construcción de un sistema de empaquetamiento basado en mutación sinónima/complementación para producir partículas de transducción no replicativas.

Los materiales usados para desarrollar el sistema de empaquetamiento se enumeran a continuación:

Cepas bacterianas:

35 N1706, un lisógeno de *E. coli* K-12 P1 c1-100 Tn9

Vectores:

40 Y14439 (cadena principal pBHR1)

Los siguientes números de acceso de GenBank (N.B., las secuencias a las que se hace referencia por número de acceso son las que figuran en la base de datos a partir de la fecha de prioridad de esta solicitud) o se pueden usar SEQ ID NO. para la cadena principal del vector y secuencias de casete:

45 X06758 (genes de la luciferasa bacteriana luxAB)

SEQ ID NO:1 (sitio pac P1 natural)

50 SEQ ID NO:3 (replicón lítico P1 que contiene el promotor P53 controlado por represor C1, el promotor P53 antisentido, los genes repL y una delección sin cambio de pauta de lectura del gen kilA)

SEQ ID NO:4 (promotor de Pblast que dirige la expresión de luxAB)

55 Construcción de N1706 (pac): cepa mutada de pacA: una secuencia ejemplar de una secuencia mutada de pacA se muestra en SEQ ID NO:2, mostrada en la lista de secuencias informal a continuación. La mutación se puede lograr construyendo la secuencia mutada por medio de síntesis génica y a continuación reemplazando la secuencia natural en N1706 con la secuencia mutada por medio de un enfoque de intercambio alélico.

60 Construcción del vector indicador GWP10001: el vector GWP10001 contiene el origen de replicación pBHR1 que presenta amplia actividad gramnegativa, dos marcadores seleccionables para kanamicina y cloranfenicol, la secuencia del sitio pac de bacteriófago P1 natural, los genes luxA y luxB son de *Vibrio harveyi* enlazados funcionalmente al promotor de blasticilina constitutivo (Pblast), y el replicón lítico P1 que contiene el promotor P53 controlado por represor C1, el promotor P53 antisentido, los genes repL y una delección sin cambio de pauta de lectura del gen kilA.

65 La figura 2 muestra el vector resultante (GWP10001, SEQ ID NO:11), que se puede construir de una variedad de

maneras que son conocidas por un experto en la técnica incluyendo obtener los casetes por medio de PCR de sus fuentes naturales o por medio de síntesis génica y ensamblaje del vector por medio de clonación basada en enzimas de restricción tradicional o técnicas alternativas tales como ensamblaje de Gibson.

5 Sistema de empaquetamiento sinónimo/complementación: el sistema de empaquetamiento incluye la cepa mutante de pacA N1706 (pac) complementada con el vector pGWP10001. Como es conocido para un experto en la técnica, la manera de construir este sistema se puede lograr por transformación de N1706 (pac) con el vector pGWP10001. El vector pGWP10001 se puede mantener en cultivos del N1706 transformado (pac) haciendo proliferar el transformante en presencia de 50 ug/ml de kanamicina.

10 Producción de partículas de transducción que portan ADN plasmídico: las partículas de transducción no replicativas que portan el vector pGWP10001 se pueden producir a partir de transformantes N1706 (pac) por medio de inducción térmica a 42 °C. La incubación a 42 °C da como resultado la inducción del ciclo lítico P1 en el que el profago se escinde del genoma N1706, produce elementos estructurales del fago y empaqueta el ADN concatamérico de pGWP10001 formado por el replicón lítico en partículas de fago descendiente, como se representa en la figura 1. El lisado celular resultante se recoge a continuación y contiene partículas de transducción no replicativas, consistiendo cada una en partículas de bacteriófago P1 que portan un concatámero lineal de ADN de pGWP10001.

20 Ejemplo 2: sistema de empaquetamiento de delección/complementación

El siguiente es un ejemplo del diseño y construcción de un sistema de empaquetamiento basado en delección/complementación para producir partículas de transducción no replicativas.

Los materiales usados para desarrollar el sistema de empaquetamiento se enumeran a continuación:

25 Cepas bacterianas:

RN4220 es una cepa de *S. aureus* defectuosa de restricción que es un derivado no lisógeno de NCTC 8325 y es un receptor eficaz para el ADN de *E. coli*. Se describió por primera vez en Kreiswirth, B.N. *et al.*, *The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage*. Nature, 1983. 305(5936): p. 709-712.

RN10616 se deriva lisogenizando RN4220 con el bacteriófago $\phi 80\alpha$. Ubeda, C. *et al.*, *Specificity of staphylococcal phage and SaPI DNA packaging as revealed by integrase and terminase mutations*. Molecular Microbiology, 2009. 72(1): p. 98-108.

35 ST24 se deriva de la delección del gen de la terminasa pequeña terS del bacteriófago lisogenizado $\phi 80\alpha$ en RN10616. Ubeda, C. *et al.*, *Specificity of staphylococcal phage and SaPI DNA packaging as revealed by integrase and terminase mutations*. Molecular Microbiology, 2009. 72(1): p. 98-108.

40 Vectores:

Los ejemplos de plásmidos que se pueden usar como plásmidos fuente para casetes, en algunos modos de realización de la invención, se describen en Charpentier, E., *et al.*, *Novel Cassette-Based Shuttle Vector System for Gram-Positive Bacteria*. Appl. Environ. Microbiol., 2004. 70(10): p. 6076-6085.

45 Los siguientes números de acceso de GenBank se pueden usar para secuencias de casete:

50 SEQ ID NO:5 (origen de replicación del plásmido pT181 de *S. aureus*, variante en el número de copias pT181cop-623 repC)

M21136 (tetA(M))

SEQ ID NO:12 (secuencia promotora P_{clpB})

55 SEQ ID NO:9 (secuencia del gen de la terminasa pequeña (terS) $\phi 11$)

L09137 (amp ColE1 ori)

X06758 (luxAB)

60 M62650 (terminación de la transcripción)

Delección de terS: la construcción de la cepa con terS inactivado ST24 se puede lograr por medio de una estrategia basada en intercambio alélico que da como resultado una delección sin cambio de pauta de lectura que retira la mayor parte de la secuencia codificante del gen de la terminasa pequeña de $\phi 80\alpha$. Los detalles de esta estrategia se describen en Ubeda, C. *et al.*, *Specificity of staphylococcal phage and SaPI DNA packaging as revealed by integrase*

and terminase mutations. Molecular Microbiology, 2009. 72(1): p. 98-108.

Una secuencia ejemplar de una cepa con *terS* inactivado se muestra en SEQ ID NO:13 (mostrado en el listado de secuencias a continuación). SEQ ID NO:13 es un locus de secuencia genómica de RN10616 que muestra la delección de *terS* de $\phi 80\alpha$ y complementación.

Construcción de vector: el vector GW80A0001 es un vector transportador de *E. coli/S. aureus*. El vector contiene orígenes de replicación de *S. aureus* (pT181cop-623 repC) y *E. coli* (ColE1ori), los marcadores seleccionables de resistencia a ampicilina (*amp*) y tetraciclina (*tet(M)*) para la selección en *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente, la secuencia del gen de la terminasa pequeña (*terS*) $\phi 11$ que incluye su propio promotor, los genes *luxA* y *luxB* son de *Vibrio harveyi* enlazados funcionalmente al promotor $P_{\text{cI}pB}$ de *S. aureus* constitutivo, y una secuencia de terminación de la transcripción (TT).

La figura 4 muestra el vector resultante (pGW80A0001, SEQ ID NO:14), que se puede construir de una variedad de maneras que son conocidas por un experto en la técnica. En un ejemplo, el casete *tet(M)* y los genes *luxAB* se pueden obtener por medio de amplificación por PCR a partir de los vectores pCN36 y pCN58 disponibles públicamente (Charpentier, E., *et al.*). Se puede obtener $P_{\text{cI}pB}$ a partir de la amplificación por PCR de RN4220 de *S. aureus* y se puede obtener *terS* por medio de la amplificación por PCR a partir de RN10616. Se puede obtener una cadena principal del vector retirando el gen *ermC* del vector pCN48 disponible públicamente (Charpentier, E., *et al.*), y los diversos componentes del vector final pGW80A0001 se pueden ensamblar en esta estructura principal del vector por medio de clonación basada en enzima de restricción diseñada apropiadamente.

Sistema de empaquetamiento de delección/complementación: el sistema de empaquetamiento puede incluir la cepa con *terS* inactivado ST24 complementada con el vector pGW80A0001 para generar la cepa GW24. Como es conocido para un experto en la técnica, la manera de construir este sistema se puede lograr por transformación de ST24 con el vector pGW80A0001. El vector pGW80A0001 se puede mantener en cultivos de ST24 transformada haciendo proliferar el transformante en presencia de 5 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina.

Producción de partículas de transducción que portan ADN plasmídico: se pueden producir partículas de transducción no replicativas que portan el vector pGW80A0001 a partir de GW24 por medio de un procedimiento de inducción de mitomicina C que se demostró por primera vez en *E. coli* y ahora es una técnica estándar para obtener profagos de bacterias lisogenizadas. Otsuji, N. *et al.*, *Induction of Phage Formation in the Lysogenic Escherichia coli K-12 by Mitomycin C*. Nature, 1959. 184(4692): p. 1079-1080. Este procedimiento de inducción de profago da como resultado la inducción del ciclo lítico de $\phi 80\alpha$ en el que el profago se escinde del genoma de GW24, produce elementos estructurales de fago y empaqueta ADN concatamérico de pGW80A0001 en partículas de fago descendiente, como se representa en la figura 2. El lisado celular resultante se recoge a continuación y contiene partículas de transducción no replicativas, consistiendo cada una en partículas de bacteriófago $\phi 80\alpha$ que portan un concatámero lineal de ADN de pGW80A0001.

Ejemplo 3: sistema de empaquetamiento basado en SaPIbov2 que carece de integrasa

El siguiente es un ejemplo del diseño y construcción de un sistema de empaquetamiento basado en SaPIbov2 para producir partículas de transducción no replicativas.

Los materiales usados para desarrollar el sistema de empaquetamiento se enumeran a continuación:

Los siguientes materiales se pueden usar para desarrollar un sistema de empaquetamiento basado en SaPIbov2 que carece de integrasa.

Cepas bacterianas:

RN451 es una cepa de *S. aureus* lisogenizada con bacteriófago $\phi 11$.

JP2131 es RN451 que se ha lisogenizado con SaPIbov2. Véase Maiques, E. *et al.*, Role of Staphylococcal Phage and SaPI Integrase in Intra- and Interspecies SaPI Transfer. J. Bacteriol., 2007. 189(15): p. 5608-5616.

JP2488 es la cepa JP2131 en la que el gen *int* se ha delecionado de SaPIbov2 (SaPIbov2 Δ int). Maiques, E. *et al.*, Role of Staphylococcal Phage and SaPI Integrase in Intra- and Interspecies SaPI Transfer. J. Bacteriol., 2007. 189(15): p. 5608-5616.

Bacteriófago:

Se puede obtener el bacteriófago $\phi 11$ a partir de la cepa RN0451 de *S. aureus* por medio de un procedimiento de inducción de mitomicina C que se describió por primera vez en *E. coli* y ahora es una técnica estándar para obtener profagos de bacterias lisogenizadas. Otsuji, N. *et al.*, *Induction of Phage Formation in the Lysogenic Escherichia coli K-12 by Mitomycin C*. Nature, 1959. 184(4692): p. 1079-1080.

Promotores:

Se puede usar P_{clpB} como promotor en este ejemplo. El promotor del gen $clpB$ es un promotor constitutivo usado para controlar la expresión del gen int . La secuencia del promotor del gen $clpB$ (P_{clpB}) de *S. aureus* se describió por primera vez en 2004. Frees, D., *et al.*, Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 2004. 54(5): p. 1445-1462. También se empleó por primera vez para controlar la expresión génica en un plásmido en 2004. Arnaud, M., A. Chastanet y M. Debarbouille, *New Vector for Efficient Allelic Replacement in Naturally Nontransformable, Low-GC-Content, Gram-Positive Bacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004. 70(11): p. 6887-6891. El promotor se puede obtener a partir de RN4220 de *S. aureus* usando cebadores descritos en 2004. *Id.*

Producción de colisógeno de $\phi 11$ / SaPIbov2 Δint (RN451($\phi 11$ SaPIbov2 Δint)): la cepa JP2488 ($\phi 11$ SaPIbov2 Δint) se puede producir lisogenizando JP2488 con $\phi 11$.

Delección de $terS$ de $\phi 11$ (RN451 ($\phi 11\Delta terS$ ($\phi 11\Delta terS$ SaPIbov2 Δint)): la cepa RN451($\phi 11\Delta terS$ SaPIbov2 Δint) se puede producir por delección del gen $\phi 11 terS$ de RN451($\phi 11$ SaPIbov2 Δint), como se describe en Tormo, M.A. *et al.*, *Staphylococcus aureus Pathogenicity Island DNA Is Packaged in Particles Composed of Phage Proteins*. *J. Bacteriol.*, 2008. 190(7): p. 2434-2440.

Incorporación de $P_{clpB-int}$ en el genoma de *S. aureus* (RN451($\phi 11\Delta terS$ SaPIbov2 Δint $P_{clpB-int}$)): RN451($\phi 11\Delta terS$ SaPIbov2 Δint $P_{clpB-int}$) se puede producir fusionando en primer lugar P_{clpB} e int por medio de técnicas de biología molecular estándar, a continuación insertando la fusión $P_{clpB-int}$ en el genoma de RN451 ($\phi 11\Delta terS$ SaPIbov2 Δint) y a continuación seleccionando clones que tienen $P_{clpB-int}$ insertada fuera de las regiones SaPIbov2 y $\phi 11$.

Producción de partículas de $\phi 11$ que portan solo concatámeros de SaPIbov2 Δint $P_{clpB-int}$: las partículas de $\phi 11$ que portan solo concatámeros de SaPIbov2 Δint $P_{clpB-int}$ se pueden producir por medio de inducción de mitomicina C de RN451($\phi 11\Delta terS$ SaPIbov2 Δint $P_{clpB-int}$), como se describe por Otsuji, N. *et al.*, *Induction of Phage Formation in the Lysogenic Escherichia coli K-12 by Mitomycin C*. *Nature*, 1959. 184(4692): p. 1079-1080. El lisado celular contiene partículas de transducción no replicativas, consistiendo cada una en proteínas estructurales del bacteriófago $\phi 11$ que portan un concatámero lineal de ADN derivado de GI.

Un experto en la materia comprenderá cómo construir las NRTP usando los materiales mencionados anteriormente y técnicas genéticas y de biología molecular bien conocidas en la técnica.

Ejemplo 4: partículas de transducción indicadoras de SarS basadas en delección de $terS$ /complementación

El siguiente es un ejemplo de un sistema indicador de SarS basado en indicador de inductor que emplea una partícula de transducción no replicativa basada en delección de $terS$ /complementación.

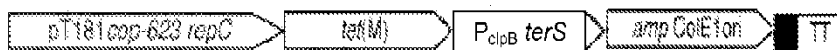
Gen indicador: luciferasa bacteriana ($luxAB$). Los genes $luxA$ y $luxB$ son de *Vibrio harveyi*. Carecen de un promotor transcripcional y cada uno contiene su propio sitio de unión al ribosoma.

Promotor del gen Spa (P_{spa}): el promotor del gen spa se usará para controlar la expresión de los genes $luxAB$.

Construcción de la fusión $P_{spa-luxAB}$: los genes $luxAB$ se pueden fusionar a la secuencia del promotor P_{spa} de modo que los genes $luxAB$ se enlazan funcionalmente al promotor P_{spa} .

Construcción del vector indicador que expresa $luxAB$

el vector indicador que expresa $luxAB$ se puede construir por medio de técnicas de biología molecular estándar incorporando el producto de fusión $P_{spa-luxAB}$ en el MCS del vector transportador representado a continuación.



El vector transportador de *E. coli/S. aureus* que porta orígenes de replicación de *E. coli* (ColE1ori) y *S. aureus* (pT181cop-623 repC), genes de resistencia a ampicilina (amp) y tetraciclina (tet(M)), el gen de la terminasa pequeña ($terS$) de $\phi 11$ bajo el control de un promotor constitutivo (P_{clpB}), un sitio de clonación múltiple (MCS) y una secuencia de terminación de la transcripción (TT).

Números de acceso de GenBank para secuencias de casete:

J01764 (replicones pT181)

M21136 (tetA(M))

Número de acceso aún no disponible (P_{clpB})

REGIÓN AF424781: 16526..16966 (terS)

5

L09137 (amp ColE1 ori)

M62650 (TT)

10 La propagación del vector para llevar a cabo manipulaciones *in vitro* y para la verificación de manipulaciones se puede lograr por medio del Top 10 de *E. coli* y el vector modificado final se puede introducir a continuación en RN0451 Δ terS de *S. aureus*. Las partículas de transducción que portan el vector transportador se pueden producir a partir de los transformantes RN0451 Δ terS por medio de un procedimiento de inducción de mitomicina C que se describió por primera vez en *E. coli* 1959 y ahora es una técnica estándar para obtener profagos de bacterias lisogenizadas. Otsuji, N., *et al.*, Induction of Phage Formation in the Lysogenic Escherichia coliK-12 by Mitomycin C. *Nature*, 1959. **184**(4692): p. 1079-1080. El lisado celular se recoge a continuación y contiene partículas de transducción no replicativas, consistiendo cada una en proteínas estructurales del bacteriófago ϕ 11 que portan un concatámero lineal de ADN plasmídico que puede indicar la presencia de SarS en células de *S. aureus* diana.

20 **Ejemplo 5: partículas de transducción indicadoras de β -lactamasa basadas en delección de terS/complementación**

El siguiente es un ejemplo de un sistema indicador de β -lactamasa basado en indicador de enzima intracelular que emplea una partícula de transducción no replicativa basada en delección de terS/complementación.

25

Gen indicador: luciferasa de Renilla (*ruc*)

Promotor: el promotor puede ser P_{blaZ} . El promotor de beta-lactamasa constitutivo se puede usar para dirigir la expresión del gen *ruc*.

30

Sustrato encajado: coelenterazina-fosfato encajado como se describe en Daniel Sobek, J.R., *Enzyme detection system with caged substrates*, 2007, Zymera, Inc.

35 *Construcción de la fusión $P_{\text{blaZ-}ruc}$:* Los genes *ruc* se pueden fusionar a la secuencia del promotor P_{blaZ} de modo que los genes *ruc* se enlacen funcionalmente al promotor P_{blaZ} .

*Construcción del vector indicador que expresa *ruc*:* el vector indicador que expresa *ruc* se puede construir por medio de técnicas de biología molecular estándar incorporando el producto de fusión $P_{\text{blaZ-}ruc}$ en el MCS del vector transportador representado en la sección V, A, 3), i) anterior.

40

45 La propagación del vector para llevar a cabo manipulaciones *in vitro* y para la verificación de manipulaciones se puede lograr por medio del Top 10 de *E. coli* y el vector modificado final se puede introducir a continuación en RN0451 Δ terS de *S. aureus*. Las partículas de transducción que portan el vector transportador se pueden producir a partir de los transformantes RN0451 Δ terS por medio de un procedimiento de inducción de mitomicina C que se describió por primera vez en *E. coli* 1959 y ahora es una técnica estándar para obtener profagos de bacterias lisogenizadas. Otsuji, N., *et al.*, Induction of Phage Formation in the Lysogenic Escherichia coliK-12 by Mitomycin C. *Nature*, 1959. **184**(4692): p. 1079-1080. El lisado celular se recoge a continuación y contiene NRTP consistiendo cada una en proteínas estructurales del bacteriófago ϕ 11 que portan un concatámero lineal de ADN plasmídico que puede expresar luciferasa de Renilla dentro de células de *S. aureus* viables dentro de la gama de huéspedes de ϕ 11.

50

Ejemplo 6: partículas de transducción indicadoras de moléculas intracelulares basadas en delección de terS/complementación

55 El siguiente es un ejemplo de un sistema indicador basado en indicador de molécula intracelular que emplea una partícula de transducción no replicativa basada en delección de terS/complementación.

Promotor: el promotor puede ser P_{blaZ} . El promotor de beta-lactamasa constitutivo se puede usar para dirigir la expresión del gen *ruc*.

60

Aptámero intercambiable: los aptámeros intercambiables se pueden diseñar y construir como se describe en Samie Jaffrey, J.P., *Coupled recognition/detection system for in vivo and in vitro use*, 2010, Cornell University.

65 *Sustrato fluoróforo:* los sustratos fluoróforos correspondientes junto con los aptámeros intercambiables anteriores se pueden diseñar y construir como se describe en Samie Jaffrey, J.P., *Coupled recognition/detection system for in vivo and in vitro use*, 2010, Cornell University.

Construcción de la fusión P_{braZ}-SA: El gen SA se puede fusionar a la secuencia del promotor P_{braZ} de modo que el gen SA se enlace funcionalmente al promotor P_{braZ}.

5 *Construcción del vector indicador que expresa SA:* el vector indicador que expresa SA se puede construir por medio de técnicas de biología molecular estándar incorporando el producto de fusión P_{braZ}-SA en el MCS del vector transportador representado en el ejemplo 4 anterior. La propagación del vector para llevar a cabo manipulaciones *in vitro* y para la verificación de manipulaciones se puede lograr por medio del Top 10 de *E. coli* y el vector modificado final se puede introducir a continuación en RN0451ΔterS de *S. aureus*. Las partículas de transducción que portan el vector transportador se pueden producir a partir de los transformantes RN0451ΔterS por medio de un procedimiento de inducción de mitomicina C que se describió por primera vez en *E. coli* 1959 y ahora es una técnica estándar para obtener profagos de bacterias lisogenizadas. Otsuji, N. *et al.*, *Induction of Phage Formation in the Lysogenic Escherichia coli K-12 by Mitomycin C*. *Nature*, 1959. 184(4692): p. 1079-1080. El lisado celular se recoge a continuación y contiene partículas de transducción no replicativas, consistiendo cada una en proteínas estructurales del bacteriófago φ11 que portan un concatámero lineal de ADN plasmídico que puede expresar el SA dentro de células de *S. aureus* viables dentro de la gama de huéspedes de φ11.

Ejemplo 7: sistema indicador basado en partículas de transducción no replicativas

20 Las partículas de transducción no replicativas descritas anteriormente se pueden usar en un sistema indicador para detectar la presencia de bacterias viables por medio de la expresión de una molécula indicadora (por ejemplo, luxAB). Cuando esta partícula de transducción introduce un vector indicador (por ejemplo, PGW80A0001) en una célula dentro de la gama de huéspedes de la partícula de transducción, las células en las que el promotor (por ejemplo, P_{clpB}) se reconoce por el mecanismo de transcripción celular puede dirigir la expresión de la molécula indicadora dentro de esa célula.

30 Para someter a prueba la funcionalidad de las partículas de transducción no replicativas como indicadores para detectar la presencia de células de *S. aureus*, se desarrollaron diversos ensayos de indicadores SASM/SARM. En un modo de realización, se desarrolló una partícula de transducción no replicativa a partir de un bacteriófago específico de *S. aureus* y se incorporaron los genes de la luciferasa bacteriana luxAB bajo el control de un promotor constitutivo. Cuando la partícula de transducción no replicativa suministró ácido nucleico indicador en *S. aureus*, el promotor constitutivo expresó luxAB adecuado para indicar la presencia de un *S. aureus* viable.

35 Además, el antibiótico cefoxitina se añadió antes de, simultáneamente con, o después de la adición de las partículas de transducción en una muestra que contenía células de *S. aureus*. Si las células no fueron fenotípicamente resistentes a cefoxitina (es decir, no fueron SARM), la luminiscencia disminuyó o se eliminó, indicando que las células fueron SARM. Sin embargo, si las células fueron fenotípicamente resistentes a cefoxitina (es decir, fueron SARM), se observó una luminiscencia incrementada o detectable, indicando que las células fueron SARM.

Función del ensayo de indicador celular viable basado en partículas de transducción no replicativas

45 Se analizó la función de la partícula de transducción no replicativa como indicador. La gama de huéspedes de transducción de la partícula de transducción no replicativa basada en bacteriófago φ80α se examinó en 101 aislados clínicos de SARM. El ensayo de transducción se llevó a cabo exponiendo cultivos de cada aislado bacteriano cultivado en TSB modificado al lisado celular GW24 que contenía las partículas de transducción no replicativas y cultivando la mezcla en medios sólidos que contenían tetraciclina.

50 En este ejemplo, la partícula de transducción no replicativa portó un marcador seleccionable de tetraciclina. Se esperaba que las células transducidas con las partículas de transducción no replicativas fueran resistentes a tetraciclina. Además, la transducción se examinó por medio de un ensayo de luminiscencia exponiendo cada aislado bacteriano en cultivo líquido al lisado celular que contenía las partículas de transducción no replicativas y evaluando la mezcla para determinar la actividad de luminiscencia de luciferasa bacteriana después de un período de incubación.

55 El ensayo de transducción mostró que la partícula de transducción no replicativa basada en φ80α pudo transducir todos los 101 aislados clínicos de SARM y ninguno de los estafilococos distintos de *S. aureus*.

60 La figura 21 muestra los resultados del ensayo de transducción en el que 36 SARM sensibles a tetraciclina se expusieron a partículas de transducción que portaban pGW80A0001 y a continuación se colocaron en placas de medios que contenían 5 ug/ml de tetraciclina. Los resultados muestran que las 36 cepas de SARM proliferaron en los medios que contenían tetraciclina debido a la transducción con pGW80A0001. Los experimentos de control en los que se colocaron los aislados de SARM en medios que contenían tetraciclina sin exposición a partículas de transducción no mostraron proliferación (no mostrado). Además, el aislamiento del plásmido a partir de cepas de SARM transducidas demostró la recuperación del plásmido pGW80A0001 como se confirma por medio de secuenciación del plásmido aislado. Los resultados de transducción demostraron por tanto que el origen de replicación del plásmido indicador presenta actividad en todos los aislados de SARM sometidos a prueba.

La figura 22 ilustra la luminiscencia medida a partir de 80 aislados clínicos de SARM y 28 aislados clínicos de *S. aureus* sensible a meticilina (SASM) transducidos con la partícula de transducción. En el experimento, los cultivos de SARM y SASM se cultivaron a una densidad óptica a 600 nm de 0,1 y a continuación se mezclaron 100 ul de los cultivos cultivados en TSB modificado con 10 ul de lisados celulares de GW24 que contenían partículas de transducción y se incubaron adicionalmente a 37 °C durante un período de 4 horas antes de someter a ensayo la luminiscencia. Las mediciones de luminiscencia se realizaron añadiendo 10 ul de una solución 1 mM de decanal, un aldehído que desencadena una reacción luminiscente dentro de las células que expresan luciferasa bacteriana. Como se esperaba, se observó luminiscencia tanto de SARM como de SASM transducidas con la partícula de transducción no replicativa específica de *S. aureus*. Además, cuando se añadió cefoxitina a los cultivos celulares al mismo tiempo que la adición de partículas de transducción, se observó luminiscencia de SARM pero no de SASM, demostrando así la capacidad de las partículas de transducción de indicar tanto la presencia de SASM como de SARM. Los resultados de luminiscencia demuestran por tanto que el promotor que dirige la expresión de luxAB presenta actividad en todos los aislados de *S. aureus* sometidos a prueba.

Optimización del ensayo de SARM de indicador de células viables basado en partículas de transducción no replicativas - Formulación de reactivo de partícula de transducción

La producción y formulación del reactivo de partícula de transducción no replicativas se optimizó para una formulación final. En resumen, se realizó una fermentación a escala de 15 l usando medios TSB incluyendo inducción con peróxido de GW24. El lote de fermentador de 15 l se inoculó a partir de un cultivo de inóculos durante la noche de 200 ml (una proporción de inóculo de un 1,3 % (v/v)). El cultivo se indujo a una DO de 0,8 con peróxido de hidrógeno y se enfrió hasta 25 °C después de la inducción sin control de pH o DO. El sobrenadante de cultivo se recogió por filtración de flujo tangencial (TFF) a la mañana siguiente con el propósito de aclarar las partículas de transducción de fagos de los restos celulares. A continuación, el material se concentró adicionalmente y se diafiltró en tampón SM sin gelatina y se almacenó a 2-8 °C antes de la filtración estéril final y el almacenamiento.

A continuación se detalla un resumen detallado del proceso:

Proliferación en matraz de inóculos

- (1) Inocular 200 ml de TSB que contiene 5 ug/ml de tetraciclina con GW24
- (2) Incubar a 37 °C, 200 rpm durante 10-18 horas.

Inoculación para fermentación (15 l de TSB con 5 ug/ml de tetraciclina)

- (1) Preparar el patín del fermentador con las siguientes condiciones de fermentación: 37 °C, agitación a 250 rpm, flujo de aire a 15 lpm y contrapresión a 20,7 kPa (3 psig).
- (2) Inocular el fermentador usando 200 ml del cultivo de inóculos durante la noche.

Inducir cultivo

- (1) Una vez que la DO 600 nm alcanza 0,8 (0,6-0,9), inducir el cultivo con H₂O₂ 0,5 mM
- (2) Incrementar el punto de ajuste de temperatura del fermentador hasta 42 °C

Condiciones posteriores a la inducción y seguimiento

- (1) Una vez se completa la inducción de 30 minutos, restablecer la temperatura objetivo del fermentador a 25 °C
- (2) Una hora después del enfriamiento, apagar la alimentación de aire al fermentador y ajustar la agitación a cero
- (3) Realizar seguimiento del cultivo de fermentación a intervalos de una hora, o con más frecuencia según sea necesario, hasta que la DO 600 nm haya disminuido a 0,40 o inferior.

Recogida/Aclaración

- (1) Después de que la DO600 de cultivo de fermentación haya alcanzado un mínimo menor que o igual a 0,40, tomar una muestra aséptica de 20 ml y añadir 30 µl de benzonasa al fermentador.
- (2) Restablecer la agitación a 250 rpm. Permitir 60 minutos con agitación para la incubación de benzonasa.
- (3) Aclarar la muestra de EOF con una centrifugación de 15 minutos a 3000 g.
- (4) Pasar el material aclarado a través de un filtro de membrana de 0,45 µM

Concentración e intercambio de tampones

- (1) Concentrar el cultivo aclarado por TFF usando una membrana de lámina plana de 500 kDa 10 veces.
- (2) Diafiltrar el cultivo concentrado a un volumen constante frente a SM Buffer sin gelatina usando la membrana TFF de 500 kDa usada para la concentración

Filtración final

- (1) Filtrar el material con tampón intercambiado concentrado a través de un filtro de 0,2 µm.
- (2) Almacenar el material de fago filtrado final a 2-8 °C.

Se pueden usar diversos otros reactivos y formulaciones como es conocido para los expertos en la técnica para

derivar la formulación.

Optimización del ensayo de SARM de indicador de células viables basado en partículas de transducción no replicativas - Formulación de medio de proliferación

5 Se optimizó una formulación de medio de proliferación para el ensayo de SARM de indicador de células viables basado en NRTP. Para producir luminiscencia en el ensayo de SARM basado en NRTP, el medio debe estar equilibrado para proliferación de *Staphylococcus aureus* y tener una concentración adecuada de cationes y aditivos para favorecer la transducción de NRTP. Se conocía que el medio TSBmod usado en ensayos previos a este estudio de desarrollo tenía problemas de precipitación que afectarían la estabilidad del medio. La formulación de medio de proliferación requirió estabilidad en la formulación final con un objetivo de 1 año a temperatura ambiente.

Procedimientos: preparación de células para el ensayo de SARM

(1) Diez cepas únicas de SARM para el ensayo de subconjunto y una cepa única de SASM se sometieron a prueba en el ensayo de SARM.
(2) Los cultivos nocturnos se iniciaron en una placa profunda de 96 pocillos a una dilución 1:50 en TSB de una reserva congelada de un solo uso y se incubaron a 37 °C en un agitador orbital durante >15 horas. MRSA/MSSA (8 µl) en TSB (392 µl)
(3) Al día siguiente, un cultivo de día a una dilución 1:50 del cultivo durante la noche se inició en TSB en una placa pocillos profundos de 96 pocillos (392 µl de TSB + 8 ul de células) y se incubó a 37 °C en un agitador orbital durante 4 horas.
(4) Las células se centrifugaron en una centrífuga durante 5 minutos a una fuerza de 1800 g y 10 °C, se aspiró el medio gastado sin alterar el sedimento.
(5) Las células centrifugadas se lavaron en Tris-HCl 50 mM, pH 7,2, se centrifugó, se aspiró con tampón sin alterar el sedimento y se resuspendió en 400 µl de RPMI. Se usa RPMI para reducir la variabilidad en el estado metabólico de las células y para imitar el bajo metabolismo como se encuentra en muestras clínicas.
(6) La placa se cubrió con un cierre AirPore y se incubó en la mesa durante 48 h.
(7) Se leyó la DO transfiriendo 200 µl de cultivo de RPMI en una placa de DO de pocillos poco profundos y se usó un pocillo en blanco con medio de RPMI solo para restar la DO en blanco.
(8) Las células se normalizaron a DO 0,1 en 100 µl.
(9) Se realizó otra dilución 1:10 en RPMI para producir una DO de 0,005.

15 Se preparó medio base de ensayo para someterse a prueba como se muestra en la tabla 2 y se muestra un conjunto representativo de modificaciones de medio en preparación para el ensayo de SARM en la tabla 3.

Tabla 2: Medio base para el desarrollo de la formulación en medio de proliferación

Componentes	TSB	B2	BSS-2	Notas
Digerido enzimático de harina de soja (g)	3	0	3	Ajustar pH a 7,2 con NaOH 10 N. Someter a autoclave o a filtrado esterilizado
Digerido enzimático de caseína (g)	17	10	10	
Extracto de levadura (g)	ND	25	25	
Cloruro de sodio (g)	5	25	25	
Fosfato de dipotasio (g)	2,5	1	0	
alfa-D-glucosa (g)	2,5	5	5	
Volumen (litro)	1	1	1	

Tabla 3: Modificaciones de medio base para el desarrollo de formulación en medio de proliferación

Concentración de sal/ aditivos para modificación							
Medio base (30 ml)	Número mod.	CaCl ₂ (mM)	MgCl ₂ (mM)	BGP (mM)	Tris-HCl pH7,0 (mM)	EDTA (mM)	HEPES (mM)
B2	M53	5,0	2,0	0,0	50,0	10,0	0,0
BSS-2	M50	10,0	2,0	60,0	50,0	10,0	0,0
BSS-2	M54	6,7	3,3	60,0	50,0	0,0	0,0
BSS-2	M55	5,0	5,0	60,0	50,0	0,0	0,0

Concentración de sal/ aditivos para modificación							
Medio base (30 ml)	Número mod.	CaCl ₂ (mM)	MgCl ₂ (mM)	BGP (mM)	Tris-HCl pH7,0 (mM)	EDTA (mM)	HEPES (mM)
BSS-2	M56	6,7	3,3	60,0	0,0	0,0	10,0
BSS-2	M57	5,0	5,0	60,0	0,0	0,0	10,0
TSB	M1 (original)	5,0	10,0	60,0	0,0	0,0	0,0
TSB	M58	5,0	10,0	60,0	0,0	11,1	0,0

A cada preparación de medio, se le añadió NRTP y cefoxitina de acuerdo con la tabla 4 a continuación para preparar el reactivo de medio de NRTP:

5 **Tabla 4: combinación de medio de proliferación de ensayo de SARM/ reactivo de partícula de transducción**

30 ml medio	Concentración final
Cefoxitina	5 ug/ml
Lisado GW24	30X

El ensayo de SARM se ejecutó con las siguientes etapas:

(1) Configuración de placa de ensayo: añadir 198 µl de reactivo de medio de fago y 2,0 µl de cada dilución de bacterias DO 0,05 y DO 0,005 en RPMI (aproximadamente equivalente a 20.000 y 2.000 UFC/ml, respectivamente) o 2,0 ul de RPMI como blanco.
(2) Placa de ensayo de incubación: incubar la placa de ensayo en agitador orbital a ~100 rpm durante 4 horas a 37 °C.
(3) Preparar el luminómetro (Molecular Devices SpectraMax L): lavar la línea de reactivo con etanol al 70 % seguido de agua DI y a continuación cebar con el reactivo de sustrato. Configurar el programa informático como Fast Kinetic con inyección de 50 µl de reactivo de sustrato a 250 µl/s después de 10 puntos de referencia y leer en 40 puntos cada 0,25 segundos.
(4) Ejecutar el ensayo: Someter a prueba cada placa de dilución bacteriana, después de dejar que la placa se equilibre a temperatura ambiente durante 5 minutos.

10

Análisis

(1) Determinar el límite de corte promediando RLU en blanco en todos los replicador y puntos temporales y añadiendo tres desviaciones estándar.
(2) Determinar RLU máxima para cada muestra usando SoftMaxPro.
(3) Determinar si la RLU máxima fue mayor que la RLU de corte y, de ser así, a continuación se usaron los datos de muestra para las comparaciones del rendimiento de medio.
(4) Normalizar todos los valores de RLU máx. a la RLU máx. en TSB M1 (medio en uso hasta que comience el desarrollo) para la cepa que se analiza en la dilución específica.
(5) Promediar los valores de RLU normalizados en todas las cepas de SARM para un medio en particular y su modificación
(6) Promediar los promedios para las dos placas de dilución, dando lugar en última instancia a un valor numérico único que representa el incremento en veces en el rendimiento en base a RLU de un medio en particular a través de 10 cepas diferentes de SARM en diluciones de 2 células sometidas a prueba.

Resultados del ensayo de SARM de indicador de células viables basado en NRTP

- 15 Determinación de RLU de corte: el promedio y desviación estándar de la RLU se calculó en todos los puntos temporales (25) para cada replicado en blanco (4). El valor de corte se calculó para cada placa como el promedio de RLU en blanco más tres desviaciones estándar.
- 20 Determinación de mejoras relativas: la RLU máxima se exportó para cada muestra (blancos, SARM y SARM en todas las diluciones) de SoftMaxPro y se comparó con la RLU de corte. Si la muestra tenía 2 puntos de datos mayores que el valor de corte para la concentración de fagos, entonces se utilizó el valor de RLU máximo para el análisis.
- 25 Los valores se normalizaron dividiendo una RLU máxima particular entre la RLU máxima de su condición de control

(esa cepa en medios original TSB M1, en la dilución que se analiza). Las proporciones obtenidas se promediaron en 10 SARM para cada condición de medio y cada dilución, como se muestra en la tabla 5. El promedio de las dos diluciones también se muestra en la tabla.

5 **Tabla 5: Resultados del ensayo de SARM de diversas formulaciones del medio de proliferación**

Medio		Placa 1	Placa 2	Promedio para ambas diluciones
B2	M53	1,89	1,88	1,89
BSS-2	M50	1,37	1,47	1,42
BSS-2	M54	1,50	1,76	1,63
BSS-2	M55	1,82	2,90	2,36
BSS-2	M56	2,38	6,00	4,19
BSS-2	M57	2,00	3,92	2,96
TSB	M1	1,00	1,00	1,00
TSB	M58	1,18	0,96	1,07

Conclusiones

- 10 BSS2-M56 presentó el mejor rendimiento en promedio en los diversos medios sometidos a prueba. El medio basado en tampón HEPES respondió mejor que el medio tamponado con Tris-HCl. Es conocido que HEPES es un sistema tamponador biológicamente favorable a diferencia de Tris-HCl. La base/caldo a base de B2 tuvo un mejor rendimiento que el caldo a base de TSB.
- 15 Se pueden usar diversos otros reactivos y formulaciones como es conocido para los expertos en la técnica para derivar la formulación. Se desarrollaron otras formulaciones adecuadas por medio de experimentos similares como se describe anteriormente. Los ejemplos de otras formulaciones adecuadas se incluyen a continuación en las tablas 6, 7 y 8.

20 **Tabla 6: Formulación de medio BSC**

Componentes BSC	Cantidad
Digerido enzimático de caseína	14,5 g
Extracto de levadura	35,5 g
Cloruro de sodio	35,5 g
alfa-D-glucosa	7 g
Vol. total	1 l

Tabla 7: Modificación de medio BSC

BSC-M64	
Nombre químico	Conc. final (ensayo)
BGP (mM)	60,0
HEPES (mM)	10,0
LiCl (mM)	84,0
BSC	Hasta 1 l

25 **Tabla 8: Modificación de medio de partícula de transducción**

Formulación de partícula de transducción (PM4)	
Productos químicos	Conc. final (ensayo)

Formulación de partícula de transducción (PM4)	
Productos químicos	Conc. final (ensayo)
CaCl ₂ (M)	0,00667
MgCl ₂ (M)	0,00335
HEPES (M)	0,01000
reserva de lisado GW24	0,01250
Acida de sodio (%)	0,0006
Agua	Hasta 1 ml

Optimización del ensayo de SARM de indicador de células viables basado en partículas de transducción no replicativas - Formulación de reactivo de sustrato

5 Para producir luminiscencia en el ensayo de SARM, el reactivo de sustrato debe incluir un aldehído como sustrato para la luciferasa. Una formulación de aldehído alifático desarrollada inicialmente (tridecanal 4,2 mM en TSB) no era estable y formó una emulsión heterogénea en lugar de una solución. Este ejemplo explica el desarrollo de una formulación de reactivo de sustrato que aborda estos problemas con un objetivo de 6 meses a temperatura ambiente o 2-8 °C de estabilidad.

10 Este ejemplo describe las etapas que se tomaron para desarrollar el reactivo de sustrato para una formulación final.

Procedimientos

15 Todos los experimentos de cribado y estabilidad se sometieron a prueba usando un "sistema modelo" que consiste en la cepa RN4220 de *S. aureus* que alberga un plásmido que expresa LuxAB. El procedimiento de preparación y prueba típico fue como sigue.

(1) Cultivo durante la noche: 2 ml de TSB+1 ul de 10 mg/ml de tetraciclina+1 colonia de bacterias del sistema modelo de la placa TSA, agitando a 225 rpm durante la noche a 37 °C
(2) Cultivo de día: cultivo durante la noche diluido 1:50 o 1:100 en TSB+5 ug/ml de tetraciclina, agitando a 225 rpm durante 1,5-2 horas a 37 °C.
(3) Normalizar el cultivo de día: se midió 1 ml de cultivo de día en Nanodrop con cubeta a 600 nm, en blanco con TSB+5 ug/ml de tetraciclina. se diluyó hasta 0,1 DO con TSB+5 ug/ml de tetraciclina.
(4) Cultivo diluido para someter a prueba: cultivo diluido 0,1 DO con TSB + 5 ug/ml de tetraciclina a una dilución 1:200, 1:2000 y 1:20000 que fue aproximadamente equivalente a 100000, 10000 y 1000 UFC/ml.
(5) Bacterias de placa: se añadieron 200 ul de cada dilución y un blanco (TSB+5 ug/ml de tetraciclina sin bacterias) en tres replicados a una placa de ensayo blanca Greiner Bio-one para cada sustrato a analizar.
(6) Preparar el luminómetro (SpectraMax L): lavar la línea de reactivo con etanol al 70 % seguido de agua DI y a continuación cebar con el sustrato. Configurar el programa informático como Fast Kinetic con inyección de 50 ul de sustrato a 250 ul/s después de 10 puntos de referencia y leer en 40 puntos cada 0,25 segundos.
(7) Ejecutar el ensayo: someter a prueba cada formulación de reactivos de sustrato con lavado y cebado de SpectraMax L entre cada sustrato. Llevar todos los reactivos del sustrato a temperatura ambiente antes de realizar la prueba.

20 Todos los experimentos de confirmación se sometieron a prueba usando el ensayo de SARM para garantizar resultados similares en el ensayo real como el sistema modelo usado para seleccionar nuevas formulaciones.

(1) Preparar cultivo: se cultivaron diez cepas de SARM de bajo rendimiento y una cepa de SASM en fase logarítmica en TSB en un bloque de pocillos profundos de 2 ml. Las células se centrifugaron, se lavaron con 1x PBS, a continuación se resuspendieron en medio RPMI.
(2) Normalizar bacterias: medir 200 ul de cultivo RPMI y blanco de RPMI en placa transparente Greiner Bio-one en VersaMax a 600 nm. Restar DO de blanco de cada cepa. Normalizar cada cepa a DO 0,05 en medio de RPMI.
(3) Diluir bacterias: Diluir cultivo DO 0,05 1:10 en medio de RPMI a DO 0,005.
(4) Preparar el reactivo de medio de fago: Añadir fago, cefoxitina y piruvato de sodio a BSS-M56 incluyendo:
a. cefoxitina (5 ug/ml)
b. reserva de lisado GW24 (0,03X)

c. piruvato de sodio (0,025 M)
(5) Configurar placa de ensayo = añadir 198 ul de reactivo de medio de fago y 2 ul de cada dilución de bacterias (DO 0,05 y DO 0,005 en RPMI, aproximadamente equivalente a 20000 o 2000 UFC/ml) o 2 ul de RPMI como un blanco en dos replicados.
(6) Incubar placa de ensayo = incubar placa de ensayo en agitador orbital a ~100 rpm (velocidad 3) durante 4 horas a 37 °C.
(7) Preparar el luminómetro (SpectraMax L) = lavar la línea de reactivo con etanol al 70 % seguido de agua DI y a continuación cebar con el sustrato. Configurar el programa informático como Fast Kinetic con inyección de 50 ul de sustrato a 250 ul/s después de 10 puntos de referencia y leer en 40 puntos cada 0,25 segundos.
(8) Ejecutar el ensayo = Someter a prueba cada formulación de reactivos de sustrato con lavado y cebado de SpectraMax L entre cada sustrato.

Los experimentos para el desarrollo de la formulación de reactivo de sustrato se diseñaron para mejorar lo siguiente:

(1) Mejorar la solubilidad añadiendo de tensioactivos (Tween 20, Triton X-100, NP-40, Brij-35, SNS, etc.), añadiendo disolventes (etanol, metanol, DMSO, etc.), añadiendo aceites no volátiles (aceite de ricino)
(2) Mejorar la estabilidad añadiendo estabilizantes (trietanolamina, ciclodextrina, etc.), añadiendo antioxidantes (vitamina E, acetato de vitamina E, vitamina E PEG 1000, oxirasa, etc.), ajustar el procedimiento de adición de tridecanal (con tensioactivo, con disolvente, en la solución final, con antioxidante, etc.), almacenar tridecanal y reactivo de sustrato en nitrógeno para reducir la oxidación del aldehído, y reducir la posibilidad de contaminación microbiana añadiendo conservantes tales como ProClin y por filtración estéril del reactivo de sustrato.
(3) Mejorar el rendimiento del ensayo por medio de ajuste del pH de la formulación y sistema de tampón de pH
(4) Mejorar el rendimiento global determinando el aldehído con la mayor producción de RLU (aldehídos sometidos a prueba de 6-14 carbonos en múltiples formulaciones para determinar si se observó una mejora en la solubilidad, estabilidad y rendimiento de ensayo).
(5) Mejorar el rendimiento general añadiendo antiespumante para reducir la espumación durante la preparación del reactivo y la adición de reactivo a la muestra durante el ensayo.

5 Análisis y resultados

La reacción cinética se trazó para cada muestra y se ajustó una línea al promedio en cada punto de lectura de tres repeticiones. Típicamente, los resultados mostraron una dilución 1:2000 de bacterias del sistema modelo DO 0,1, aproximadamente equivalente a 10.000 UFC/ml o 2.000 UFC/ensayo.

La RLU máxima normalizada a la del reactivo de sustrato de referencia se analizó para los experimentos de estabilidad. En cada punto temporal de estabilidad, la RLU máxima para cada muestra se normalizó a la RLU máxima del sustrato de referencia. La RLU máxima normalizada se representó con respecto a puntos temporales y se representó una regresión lineal con un IC de un 95 %.

15 Conclusiones

Los parámetros clave ajustados a partir de la formulación de referencia para producir una formulación de reactivo de sustrato final se resumen en la tabla 9.

20 **Tabla 9: Resumen de resultados del desarrollo de la formulación de reactivo**

Modificación al reactivo de sustrato	Motivo
Tridecanal 4,2 mM+TSB	Reactivo de sustrato original
Retirar TSB	Reducir la posibilidad de contaminación
Añadir Tween 20 al 1 %	Mejorar la solubilidad
Ajustar hasta pH 3 con tampón dibásico de ácido cítrico 0,1 M al 79,45 %-fosfato de sodio 0,2 M al 19,55 %	Mejorar el rendimiento de ensayo
Añadir tridecanal directamente al tensioactivo concentrado	Mejorar la estabilidad
Añadir filtrado de reactivo del sustrato a través de membrana PES de 0,2 um	Mejorar la estabilidad
Añadir ProClin 300 al 0,05 %	Mejorar la estabilidad
Añadir trietanolamina	Mejorar la estabilidad

Cambiar Tween 20 al 1 % a Triton X-100 al 0,5 %	Mejorar la estabilidad, mejorar la solubilidad
Cambiar de tampón dibásico de ácido cítrico 0,1 M al 79,45 %-fosfato de sodio 0,2 M al 19,55 %, a tampón de ácido cítrico 0,1 M al 82 %-citrato d sodio 0,1 M al 18 %, mantener a pH 3	Mejorar el rendimiento de ensayo, reducir la posibilidad de precipitación con la retirada del tampón fosfato
Añadir 100 ppm de antiespumante Y30	Mejorar el rendimiento de ensayo
Añadir acetato de vitamina E al 0,5 %	Mejorar la estabilidad, reducir la precipitación
Cambiar el fabricante principal de tridecanal de Alfa Aesar a Sigma/OmegaChem	Mejorar el rendimiento de ensayo
Cambiar acetato de vitamina E al 0,5 % a vitamina E PEG 1000 al 1-2 %	Mejorar el rendimiento del ensayo, mejorar la solubilidad, mejorar la estabilidad

Se prepararon dos formulaciones de reactivo de sustrato para dos temperaturas de almacenamiento diferentes, una para el almacenamiento a 2-8 °C y otra a 18-24 °C.

- 5 Formulaciones de reactivo de sustrato finales almacenadas a 2-8 °C. Formulación: Triton X-100 al 0,5 %+ tridecanal 4,2 mM + acetato de vitamina E al 0,5 % + 100 ppm antiespumante Y30+ trietanolamina al 0,5 % + ácido cítrico 0,1 M al 82 % + citrato de sodio 0,1 M al 18 % a pH 3 + ProClin 300 al 0,05 %. La formulación no precipitó después de 1 mes a 2-8 °C y se pudieron detectar cepas de SARM igual que el día 0.
- 10 Formulaciones de reactivo de sustrato finales almacenadas a 18-24 °C. Formulación: Triton X-100 al 0,5 % + tridecanal 6,3 mM + 100 ppm antiespumante Y30 + trietanolamina al 0,5 % + ácido cítrico 0,1 M al 82 % + citrato de sodio 0,1 M al 18 % a pH 3 + succinato de a-tocoferol-PEG 1000 al 2 %+ ProClin 300 al 0,05 %. La formulación no precipitó después de 1 mes a 18-24 °C y se pudieron detectar cepas de SARM igual que el día 0.
- 15 Se pueden usar diversos otros reactivos y formulaciones como es conocido para los expertos en la técnica para derivar la formulación.

Rendimiento analítico del ensayo de SARM de indicador de células viables basado en partículas de transducción no replicativas

- 20 Se examinó el rendimiento analítico del ensayo de SARM NRTP optimizado, incluyendo un análisis del límite de detección del ensayo y un análisis de la reactividad cruzada e interferencia microbiana del ensayo cuando se puso a prueba con organismos no diana.

25 **A) Ensayo del límite de detección**

- 30 El límite de detección del ensayo de NRTP se evaluó determinando la menor cantidad de células SARM que representan diversas cepas que podrían producir una señal de unidad de luz relativa (RLU) por encima de un valor umbral determinado a partir de muestras en blanco. Las cepas de SARM incluyeron los tipos SCCmec I, II y IV, así como una cepa SARM que porta la variante del gen mecA mecC, una cepa de SARM que los ensayos de PCR de SARM aprobados por la FDA no han podido detectar.

Los siguientes materiales clave se usaron en el estudio de rendimiento clínico:

- 35 Reactivo de medio de proliferación: BSS-M56
- Reactivo de sustrato: las formulaciones de reactivo de sustrato finales se almacenarán a 18-24 °C como se describe anteriormente.
- 40 Reactivo de partícula de transducción: base BSS-M56 con 10 ug/ml (es decir, 2X concentración) de cefoxitina y reactivo de partícula de transducción como se describe anteriormente a una 2X concentración.

Protocolo de estudio del LdD:

- 45 Cultivo durante la noche: para cada cepa de SARM y una cepa de control negativo de SASM, se inocularon 2 ml de TSB con una colonia de la cepa cultivada previamente en placas de TSA. Los cultivos de SARM durante la noche incluyeron 5 ug/ml de cefoxitina. Todas las muestras se incubaron durante la noche a 37 °C en una incubadora con agitación.

Cultivo de día: se transfirieron 20 ul de cada uno de los cultivos nocturnos a un nuevo tubo de cultivo que contenía 2 ml de reactivo de medio de proliferación. A continuación se incubaron los inóculos a 37 °C con agitación durante aproximadamente 1 h 45 min, hasta que la DO(600 nm) alcanzó 0,1.

5 Diluciones en serie:

a) se repartieron 1000 ul de cada una de las muestras en la fila A de una placa de 96 pocillos de pozo profundo de 2 ml.

10 b) A continuación se llenaron las filas restantes (B-H) con 900 ul de reactivo de medio de proliferación.

c) A continuación se prepararon diluciones en serie de 10 veces tomando 100 ul de la fila A y mezclando en la fila B, etc., de modo que la fila H contenía muestras de material de la fila A a una dilución de 10^{-7} .

15 Enumeración de carga bacteriana: Se colocaron 5 ul de cada pocillo de la fila E en una placa de TSA que se inclinó a continuación para permitir que la mancha de líquido se extendiera sobre la placa (para facilitar más tarde el recuento de colonias). (La fila E es una dilución 10^{-4} de la fila A). A continuación se incubaron las placas durante la noche a 37 °C.

20 Preparación del ensayo:

a) Los pocillos de una placa de ensayo de 96 pocillos blancos se llenaron con 100 ul de 2x reactivo de partícula de transducción.

25 b) Las filas F y G (es decir, diluciones de 10^{-5} y 10^{-6} veces de la fila A, respectivamente) se usaron a continuación para llenar los pocillos de la placa de ensayo de 96 pocillos que contenía el reactivo de partícula de transducción de modo que cada muestra se añadió a la placa en cuatro replicados.

30 c) A continuación se selló la placa con un cierre transpirable y se incubó durante 4 horas a 37 °C con agitación moderada, 50 rpm.

Al final de las 4 horas, se retiró la placa de la incubadora y se midió de inmediato la luminiscencia en un SpectraMax L que inyectó 50 µl del reactivo de sustrato y se midió la luminiscencia durante un período de 1 minuto.

35 Análisis:

Los datos de luminiscencia de cada muestra se representaron como RLU frente al tiempo. Se usaron muestras en blanco para determinar un valor de corte calculado a partir de todos los puntos temporales de las muestras en blanco usando la siguiente fórmula: (media RLU blanco + 3* DE RLU blanco)

40 A continuación se obtuvo el pico promedio de RLU de inyección posterior de sustrato para cada muestra para determinar la muestra de mayor dilución para la que se generó un valor de RLU que estaba por encima del valor de corte de las muestras en blanco. Los recuentos de unidades formadoras de colonias (UFC) a la mayor dilución para la que se generó un valor de RLU que estaba por encima del valor de corte de las muestras en blanco se determinaron a partir del estudio de enumeración, y este recuento de UFC se informó como el LdD en el estudio.

Resultados:

50 Se determinó que el LdD para todas las muestras de SARM sometidas a prueba fue inferior a 10 UFC. La tabla 11 resume los resultados de los menores LdD obtenidos en el estudio.

Tabla 11: resultados de los menores LdD obtenidos en el estudio de LdD.

Tipo SCCmec	LdD (UFC)
I	3
II	2
IV	3
mecC	1

55 Todas las cepas de SARM sometidas a prueba dieron como resultado menos de 10 UFC detectadas con el ensayo de NRTP por encima de un valor de corte calculado a partir de muestras en blanco. SASM no generó valores de RLU por encima del valor de corte de las muestras en blanco.

Los valores de RLU mostrados a la mayor dilución para la que se generó un valor de RLU que estaba por encima del

valor de corte de las muestras en blanco se representaron como el promedio de los valores de RLU y la desviación estándar para los cuatro replicados sometidos a prueba para cada muestra. El eje horizontal se establece en el corte de muestras en blanco y los recuentos de UFC para la muestra que generó cada punto de datos de RLU se superponen con los datos. Todas las muestras de SARM generaron valores de RLU por encima del valor de corte, mientras que SASM no.

Estudio de reactividad cruzada e interferencia microbiana

Se realizó un estudio de reactividad cruzada e interferencia microbiana. El propósito del estudio fue someter a prueba un conjunto de cepas bacterianas comúnmente encontradas en muestras clínicas y conocidas por estar potencialmente en la gama de huéspedes del bacteriófago $\phi 80\alpha$ en el ensayo de SARM para ver si existió reactividad cruzada o interferencia de estas cepas con el fago o sustrato usado en la prueba.

Los experimentos previos con muestras clínicas habían dado como resultado resultados positivos falsos con una presencia de *Enterococci faecalis* y *Staphylococcus epidermidis* según lo indicado por la presencia de colonias azules y blancas al plaquear en placas de *Staph aureus* BBL™ CHROMagar™. Además, *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua* pueden estar dentro de la gama de huéspedes infecciosos o penetrantes del fago $\phi 80\alpha$, lo que también puede contribuir a la reactividad cruzada en el ensayo de SARM. El estudio sometió a prueba *Enterococci faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua* para determinar la reactividad cruzada/interferencia con el ensayo de viabilidad de SARM. Cada cepa se sometió a prueba con un alto número de células en el orden de 10^6 , 10^7 o 10^8 células en el volumen de ensayo. Las pruebas se realizaron sin la adición de lisado GW24 para abordar la autoluminiscencia potencial de las cepas.

El experimento 1 sometió a prueba diversas cepas (MSSA-S121, NRS# 9-*Staphylococcus haemolyticus*, NRS # 6-*Staphylococcus epidermidis*, ATCC 12228-*Staphylococcus epidermidis*, ATCC 15305- *Staphylococcus saprophyticus*, ATCC 29212-*Enterococcus faecalis*, ATCC 60193-*Candida albicans*, ATCC 12453-*Proteus mirabilis*) para determinar la luminiscencia con un alto número de células en condiciones de ensayo normales.

Experimento 2: se volvió a someter a ensayo un subconjunto de cepas que eran luminiscentes del experimento 1 en presencia de diversos antibióticos a diversas concentraciones para desactivar la luminiscencia de fondo.

Experimento 3: se sometieron a prueba *E. faecalis* y S32 (SARM) con diversas formulaciones de sustrato desarrolladas como se describe anteriormente sin lisado GW24 y sin incubación.

Experimento 4: se sometieron a prueba ATCC 33090-*Listeria innocua* y ATCC 19111-*Listeria monocytogenes* para determinar la señal de fondo y luminiscencia inespecífica y se volvieron a someter a prueba con diversas formulaciones de sustrato desarrolladas como se describe anteriormente junto con *E. faecalis* y *S. epidermidis*.

Experimento 5: se volvió a someter a prueba *E. faecalis* con una formulación de sustrato final desarrollada como se describe anteriormente.

Las formulaciones de reactivo de sustrato sometidas a prueba en este estudio se resumen en la tabla 9.

Tabla 10: Formulaciones de reactivo de sustrato

Experimento	Sustrato	Descripción
1	Sustrato original	Tween20 al 1 % + tridecanal 4,2 mM, pH 3,0
2	Sustrato original	
3	Sustrato 1	Tridecanal 6,3 mM + acetato de vitamina E al 0,5 %, pH 3,0
	Sustrato 2	Nonanal 20 mM + acetato de vitamina E al 0,5 %, pH 3,0
	Sustrato 3	Tridecanal 8,4 mM + acetato de vitamina E al 0,5 %, pH 3,0
	Sustrato 4	Tridecanal 6,3 mM + succinato de a-tocoferol-PEG 1000 al 1 %, pH 3,0
4	Sustrato original	Tween20 al 1 % + tridecanal 4,2 mM, pH 3,0
	Sustrato 5	Triton al 0,5 % + tridecanal 4,2 mM (Sigma) + acetato de vitamina E al 0,5 %, pH 3,0
5	Sustrato 6	Tridecanal 6,3 mM + VitE PEG al 2 %, pH 3,0

Procedimientos:

Las siguientes fueron etapas realizadas para el ensayo de SARM.

5 A) Cepas cultivadas para los experimentos 1-5

El día antes del ensayo, se inició un cultivo durante la noche en una placa profunda de 96 pocillos a una dilución 1:50 en TSB de una reserva congelada de un solo uso y se incubó a 37 °C en un agitador orbital durante > 15 horas. Bacterias (8 ul) en TSB (392 ul).

10 La absorbancia del cultivo se midió en Versamax. Se estableció la TSB como blanco en la plantilla en SoftmaxPro. Se midió la densidad óptica (DO) a 600 nm.

El día del ensayo, se resuspendieron las células a una DO 0,5 para configurar los ensayos. Se preparó BSS-M56 para los experimentos 1-5.

15 B) Se preparó el reactivo de medio de partícula de transducción para todos los experimentos 1, 2, 4 y 5 (no se usó reactivo de partícula de transducción en el experimento 3): 15 ug/ml de cefoxitina + reserva de lisado GW24 como se describe anteriormente a 30X.

20 C) Preparación de muestra: Se realizaron diversas diluciones a partir de cultivos durante la noche de cepas. Todas las cepas se diluyeron en BSS M56.

D) El ensayo de SARM se ejecutó para los experimentos 1-5

25 Se cargó el medio con o sin fago y cefoxitina a 5 µg/ml en la placa de ensayo. Se añadieron 2,5 ul de células. Se incubó la placa de ensayo con una tapa de placa a 37 °C en un agitador orbital con la velocidad establecida a aproximadamente 100 rpm durante 4 horas.

30 A continuación, se midieron las placas de ensayo en el SpectraMax L con los siguientes parámetros de ensayo estándar:

Luminiscencia cinética rápida

35 Lectura durante 20 puntos temporales a intervalos de 0,5 segundos. Se inyectó el sustrato con un inyector M con 50 ul/pocillo a 250 ul/s incluyendo 5 lecturas de referencia. No se estableció temperatura de incubación y se leyó a temperatura ambiente.

Se cebó el SpectraMax L con reactivo de sustrato antes de realizar el ensayo.

40 Se analizaron los resultados con lo siguiente:

A) Límite de corte determinado promediando RLU en blanco en todos los replicador y puntos temporales y añadiendo tres desviaciones estándar.

45 B) RLU máxima determinada para cada muestra usando SoftMaxPro.

C) Se determinó si la RLU máxima era mayor que la RLU de corte y, de ser así, a continuación se usaron los datos de muestra para el análisis.

50 **Resumen de resultados**

Experimento 1: Se sometieron a prueba diversas cepas para determinar la reactividad cruzada e interferencia usando la formulación de sustrato original, de las sometidas a prueba, NRS# 9- *S. haemolyticus*, NRS # 6- *S. epidermidis* y *E. faecalis* dieron positivo falso en el ensayo de MRSA.

55 Experimento 2: De las tres cepas sometidas a prueba, NRS #9 y *E. faecalis* dieron positivo en MRSA con todas las condiciones de cefoxitina sometidas a prueba. Las tres cepas (NRS #9, *E. faecalis*, NRS #6) dieron positivo cuando no se usó reactivo de partícula de transducción en el ensayo, lo que indica que la luminiscencia inespecífica no fue dependiente del reactivo de partícula de transducción sino que fue dependiente del reactivo de sustrato y la cepa. El carbohidrato (carbencilina) en todas las concentraciones sometidas a prueba fue eficaz para retirar la señal de positivo falso.

60 Experimento 3: *E. faecalis* dio una señal positiva sin reactivo de partícula de transducción. La cepa de SARM S32 también dio una señal positiva sin reactivo de partícula de transducción. Este resultado fue indicativo de que el reactivo del sustrato provocó luminiscencia de fondo. El sustrato 4 fue eficaz para eliminar la señal de fondo en el ensayo.

65

Experimento 4: Se sometieron a prueba las cepas ATCC 33090 -*Listeria innocua*, ATCC 19111-*Listeria monocytogenes*, para determinar la luminiscencia con reactivo de partícula de transducción y reactivo de sustrato YA QUE *Listeria sp.* puede estar dentro de la gama de huéspedes del bacteriófago usado en el ensayo de SARM. Se observó luminiscencia de *L. innocua* con y sin reactivo de partícula de transducción usando la formulación de sustrato original, lo que indica que la luminiscencia se debió a una reacción inespecífica potencialmente con el sustrato. El sustrato 5 fue eficaz para eliminar la luminiscencia de *Listeria* pero no de *E. faecalis*.

Experimento 5: Se volvió a someter a prueba *E. faecalis* con el sustrato 6. En dos ejecuciones independientes en dos días diferentes con alta carga de células a DO 0,5, el ensayo proporcionó resultados negativos.

Conclusiones

El estudio de reactividad cruzada demostró la luminiscencia de fondo de varias especies bacterianas a altas cargas. La producción de luz no requirió reactivo de partícula de transducción y determinadas formulaciones de sustrato que utilizan iones fosfato contribuyeron a la señal inespecífica. Debido a que no se observó producción de luz de especies de reacción cruzada por el uso del reactivo de partícula de transducción, en el caso de que $\alpha 80\alpha$ penetre en especies de reacción cruzada, se evita la producción de luz por la falta de actividad del promotor PclpB de *S. aureus* que se enlaza funcionalmente a los genes de la luciferasa bacteriana y/o la falta de actividad del origen de replicación pT181 de *S. aureus* dentro de estas especies.

El reemplazo del tampón de fosfato de sodio dibásico en la formulación con citrato de sodio y ácido cítrico eliminó la luminiscencia de fondo de todas las especies de reacción cruzada sometidas a prueba, excepto *E. faecalis*. El sustrato 6 con el ingrediente añadido de succinato de α tocoferol-PEG 1000 eliminó la señal inespecífica restante de *E. faecalis*.

Rendimiento clínico del ensayo de SARM de indicador de células viables basado en partículas de transducción no replicativas - Resultados con referencia al plaqueado directo en CHROMAgar SARM II

Se desarrolló un ensayo de detección de SARM empleando partículas de transducción no replicativas (NRTP) que expresan luxAB basadas en $\phi 80\alpha$. El ensayo consistió en añadir NRTP a una muestra clínica sospechosa de contener SARM, incubar la muestra durante un período de 4 horas a 37 °C y a continuación someter a ensayo la muestra incubada inyectando un aldehído en la muestra mientras se mide la luminiscencia con un tubo fotomultiplicador. Los resultados del ensayo se compararon con los del medio cromogénico disponible comercialmente diseñado para la detección de SARM como referencia para determinar la sensibilidad y especificidad del ensayo. Se esperaba que el ensayo basado en NRTP se correlacionara bien con la referencia basada en cultivo ya que ambos requieren la presencia de células de SARM viables y ambos se basan en la expresión del fenotipo de SARM. Los resultados mostraron una correlación excelente con la referencia.

El propósito del estudio fue determinar el rendimiento del ensayo de SARM basado en NRTP con referencia a CHROMAgar SARM II a partir de pruebas de muestras de hisopados nasales residuales recogidos con el propósito del cribado de SARM.

Alcance:

Las muestras de hisopados nasales no identificadas recogidas de pacientes con el propósito de vigilancia de SARM por una institución clínica se sometieron a prueba para detectar la presencia de SARM usando el ensayo de SARM basado en NRTP, CHROMAgar SARM II, CHROMAgar SA y agar con sangre TSA por medio de plaqueo directo y por medio de cultivo enriquecido seguido de plaqueo. Los resultados del ensayo de SARM basado en NRTP se compararon con los resultados del ensayo CHROMAgar SARM II para calcular la sensibilidad y especificidad del ensayo de SARM basado en NRTP con referencia a CHROMAgar SARM II.

Los siguientes materiales clave se usaron en el estudio de rendimiento clínico:

Reactivo de medio de proliferación: BSS-M56

Reactivo de sustrato: las formulaciones de reactivo de sustrato finales se almacenarán a 18-24 °C como se describe anteriormente

Reactivo de partícula de transducción: base BSS-M56 con 10 ug/ml (es decir, 2X concentración) de cefoxitina y reactivo de partícula de transducción como se describe anteriormente a una 2X concentración.

Procedimientos

Descripción de muestra clínica: Se proporcionaron tubos de transporte de muestra que contenían Amies líquido (220093 - BD BBL™ CultureSwab™ Liquid Amies) a una institución clínica para recoger hisopados nasales

- residuales no identificados recogidos por la institución clínica. Antes de colocar los hisopados nasales en el tubo de transporte de muestra proporcionado, la institución clínica usó el hisopado para realizar su propio cribado de SARM de cultivo directo sembrando en estrías el hisopado en una placa de cultivo. Más específicamente, se recogieron muestras de narinas anteriores en los procedimientos estándar internos de la institución clínica y usando el hisopado de recogida estándar de la institución clínica. La institución clínica realizó a continuación un cribado de cultivo directo con el hisopado. A continuación se añadió el hisopado residual al tubo de transporte de muestra en el que la punta del hisopo se sumergió en el tampón Amies en el tubo de transporte de muestra. Las muestras se mantuvieron a continuación a temperatura ambiente durante 2-24 horas antes del procesamiento adicional.
- 5
- 10 Manejo de muestra: Tras recibirlas, las muestras se almacenaron durante la noche a temperatura ambiente en un armario de bioseguridad en vertical para garantizar la inmersión del hisopado en el tampón Amies del tubo de transporte de muestra. Después del almacenamiento durante la noche, las muestras se procesaron adicionalmente como sigue.
- 15 Preparación de muestra clínica
- Usando una pipeta de 1 ml, se añadieron 300 µl de reactivo de medio de proliferación a tubos Falcon de 15 ml.
- 20 Los hisopados de hisopados nasales residuales se retiraron del tubo de transporte original y se sumergieron en el reactivo de medio de proliferación en un tubo Falcon correspondiente. El contenido del hisopo se eluyó a continuación en el reactivo de medio de proliferación en el tubo Falcon balanceándolo de un lado a otro en el reactivo de medio de proliferación 4-6 veces. El hisopado se volvió a colocar a continuación en el tubo de transporte original y se almacenó a 2-8 °C hasta el final del estudio, mientras que las muestras clínicas eluidas en el tubo Falcon se transfirieron a tubos de 1,5 ml y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su procesamiento adicional.
- 25
- Ejecución del ensayo de SARM NRTP: Las siguientes muestras se cargaron directamente en una placa de ensayo de 96 pocillos blanca.
- 30 Muestras clínicas: 100 µl del material eluido de cada muestra clínica individual.
- Control positivo de SARM: 2 µl de un cultivo de DO 0,1 completamente mezclado de un aislado de SARM conocido en 98 µl de reactivo de medio de proliferación por triplicado.
- 35 Control negativo de SASM: 2 µl de un cultivo de DO 0,1 completamente mezclado de un aislado de SASM conocido en 98 µl de reactivo de medio de proliferación por triplicado.
- Blancos: 100 µl de reactivo de medio de proliferación por triplicado.
- 40 A cada muestra, se añadieron 100 µl de reactivo de partícula de transducción. La placa de ensayo se colocó a continuación en una incubadora establecida a 37 °C, agitando en un agitador orbital durante 4 horas. Al final de las 4 horas, se retiró la placa de la incubadora y se midió de inmediato la luminiscencia en un SpectraMax L que inyectó 50 µl del reactivo de sustrato y se midió la luminiscencia durante un periodo de 1 minuto.
- 45 Plaqueo de bacterias para enumeración de UFC de muestra clínica: Cada muestra clínica eluida se plaqueó para determinar los recuentos de colonias bacterianas en CHROMAgar SARM II, CHROMAgar SA y agar con sangre (TSA II) por medio de cultivo directo y enriquecido como sigue. Se determinaron recuentos de UFC en el organismo por plaqueo directo. Se determinaron recuentos de UFC de SARM por plaqueo en CHROMAgar SARM II. Se determinaron recuentos de UFC de *S. aureus* por plaqueo en placa CHROMAgar SA. Se determinaron recuentos de UFC de cualquier organismo con proliferación soportada por agar con sangre TSA por plaqueo en agar con sangre TSA. En el caso de que el plaqueo directo no produjera colonias debido a que la carga de organismos estaba por debajo del límite de detección de las placas usadas, también se realizó un enriquecimiento de muestra incubando una porción de la muestra clínica eluida en TSB durante la noche a 37 °C con agitación y a continuación de nuevo por plaqueo del cultivo enriquecido en CHROMAgar SARM II. Todas las placas se incubaron durante 20-24 horas a 37 °C. Después de la incubación, se registraron los recuentos de UFC de cualquier colonia que aparecían en cada placa.
- 50
- 55
- 60 Análisis: La presencia y carga de UFC de SARM, *S. aureus* y organismos totales por muestra clínica eluida se calcularon en base a los recuentos de UFC obtenidos en CHROMAgar SARM II, CHROMAgar SA y agar con sangre TSA, respectivamente.
- Análisis del ensayo de NRTP: Los datos de cada muestra se representaron como RLU frente al tiempo.
- 65 Determinación del valor de corte: El valor de corte del ensayo se calculó a partir de todos los puntos temporales de las muestras en blanco usando la siguiente fórmula: (media RLU blanco + 3* DE RLU blanco).

Determinación positiva de SARM: Se determinó que la RLU de cada punto temporal después de la inyección del sustrato estaba por encima o por debajo del valor de corte del ensayo. Si dos o más puntos de datos después de la inyección estaban por encima del valor de corte del ensayo, a continuación la muestra se designó como "SARM positivo".

5 **Resultados:** Los resultados positivos de SARM del ensayo de NRTP se compararon con los del cultivo directo y enriquecido de plaqueo en CHROMAgar SARM II. Los siguientes cálculos se llevaron a cabo para determinar la sensibilidad y especificidad del ensayo de NTRP con referencia a CHROMAgar SARM II.

<ul style="list-style-type: none"> • Positivo verdadero (TP) ○ Muestra que produjo un resultado positivo de SARM tanto en el ensayo de NRTP como en CHROMAgar SARM II
<ul style="list-style-type: none"> • Negativo verdadero (TN) ○ Muestra que produjo un resultado negativo de SARM tanto en el ensayo de NRTP como en CHROMAgar SARM II
<ul style="list-style-type: none"> • Positivo falso (FP) ○ Muestra que produjo un resultado positivo de SARM en el ensayo de NRTP y un resultado negativo de SARM en CHROMAgar SARM II
<ul style="list-style-type: none"> • Negativo falso (FN) ○ Muestra que produjo un resultado negativo de SARM en el ensayo de NRTP y un resultado positivo de SARM en CHROMAgar SARM II
<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilidad = TP/(TP+FN)
<ul style="list-style-type: none"> • Especificidad = TN/(TN+FP)

10 **Resultados con referencia al plaqueo directo en CHROMAgar SARM II**

La tabla 11 muestra los siguientes resultados que se obtuvieron comparando el ensayo de NRTP con referencia al plaqueo directo en CHROMAgar SARM II.

15 **Tabla 11. Resultados del ensayo de NRTP frente al plaqueo directo en los resultados de CHROMAgar SARM II**

Muestras totales	Positivo CHROMAgar SARM II	Negativo CHROMAgar SARM II	Positivo ensayo de NRTP	Negativo ensayo de NRTP	Positivo verdadero	Negativo verdadero	Positivo falso	Negativo falso
69	7	62	12	57	7	57	5	0

20 En base a los datos anteriores, se calculó que la sensibilidad y especificidad del ensayo con referencia al plaqueo directo en CHROMAgar SARM II fue:

Sensibilidad = 100 %

Especificidad = 92 %

25 **Rendimiento clínico del ensayo de SARM de indicador de células viables basado en partículas de transducción no replicativas - Resultados con referencia al cultivo enriquecido, seguido de plaqueo en CHROMAgar SARM II**

30 En base a los resultados con referencia al plaqueo directo en CHROMAgar SARM II, todas las muestras clínicas se volvieron a someter a prueba con referencia al cultivo enriquecido, seguido de plaqueo en CHROMAgar SARM II. La justificación para las pruebas de seguimiento se basó en la posibilidad de que los resultados positivos falsos en comparación con el plaqueo directo puedan ser positivos verdaderos que se detectaron por el ensayo de NRTP, pero que se hayan podido pasar por alto en el plaqueo directo. Una porción de las muestras de hisopados eluidos restantes se volvieron a someter a prueba por medio del ensayo de NRTP como se describe anteriormente. Otra porción de las muestras de hisopados eluidos restantes también se sometieron a prueba por medio de cultivo enriquecido, seguido de plaqueo en CHROMAgar SARM II. Las pruebas de cultivo enriquecido consistieron en añadir 100 ul del material de hisopado eluido restante a 2 ml de TSB e incubar a 37 °C con agitación durante un período de 18-24 horas. El cultivo resultante se sembró en estrías a continuación en CHROMAgar SARM II para determinar la presencia de SARM en el cultivo. La tabla 12 resume los datos tanto del plaqueo directo como del enriquecimiento seguido de ensayos de plaqueo, solo se muestran las muestras que produjeron un resultado positivo de SARM en el ensayo de NRTP o CHROMAgar SARM II.

40 **Tabla 12: Resultados del ensayo de NRTP frente a plaqueo directo y cultivo enriquecido seguido de plaqueo**

en CHROMAgar SARM II

Solo se muestran las muestras que produjeron un resultado positivo de SARM en el ensayo de NRTP o bien CHROMAgar SARM II.

N.º de muestra	Ensayo de NRTP	CHROMAgar SARM II directo	Enriquecimiento + ensayo de NRTP	Enriquecimiento + CHROMAgar SARM II
1	+	+	+	+
2	+	+	+	+
3	+	+	+	+
4	+	+	+	+
5	+	+	+	+
6	+	+	+	+
7	+	+	+	+
8	+	-	+	+
9	+	-	+	+
10	+	-	+	+
11	+	-	+	+
12	+	-	+	-

5 La tabla 13 muestra los siguientes resultados que se obtuvieron comparando el ensayo de NRTP con referencia al cultivo enriquecido de muestras clínicas, seguido de plaqueo en CHROMAgar SARM II.

Tabla 13. Resultados del ensayo de NRTP frente a resultados del cultivo enriquecido seguido de plaqueo en CHROMAgar SARM II

Muestras totales	Positivo CHROMAgar SARM II	Negativo CHROMAgar SARM II	Positivo ensayo de NRTP	Negativo ensayo de NRTP	Positivo verdadero	Negativo verdadero	Positivo falso	Negativo falso
69	11	58	12	57	11	57	1	0

15 En base a los datos anteriores, se calculó que la sensibilidad y especificidad del ensayo con referencia al cultivo enriquecido seguido de plaqueo en CHROMAgar SARM II fue:

Sensibilidad = 100 %

Especificidad = 98,3 %

Ejemplo 8: Ensayo basado en NRTP para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana: correlación de la concentración inhibidora mínima con la producción de luminiscencia

25 En otro ejemplo, se desarrolló un ensayo de susceptibilidad a cefoxitina de *S. aureus* para determinar la concentración inhibidora mínima de cefoxitina requerida para inhibir la proliferación de *S. aureus* resistente a cefoxitina. A diferencia de un ensayo de resistencia a cefoxitina de SARM como se describe anteriormente, que diferencia *S. aureus* sensible a cefoxitina de resistente a cefoxitina, el ensayo de susceptibilidad a cefoxitina de SARM en este ejemplo describe el desarrollo de un ensayo para determinar la cantidad mínima de cefoxitina necesaria para inhibir la proliferación de *S. aureus* en presencia de cefoxitina.

30 Los siguientes materiales clave se usaron en el estudio de rendimiento clínico:

Reactivo de medio de proliferación: BSS-M56

35 Reactivo de sustrato: las formulaciones de reactivo de sustrato finales se almacenarán a 18-24 °C como se describe en el ejemplo 7.

Reactivo de partícula de transducción: base BSS-M56 con 10 ug/ml (es decir, 2X concentración) de cefoxitina y reactivo de partícula de transducción como se describe en el ejemplo 7 a una 2X concentración Protocolo de estudio MIC.

40

Cultivo durante la noche: Para cada cepa de SARM (NRS35 y S7) y una cepa de control negativo de SASM (MSSA121), se inocularon 2 ml de TSB con una colonia de la cepa cultivada previamente en placas de TSA. Los cultivos de SARM durante la noche incluyeron 5 ug/ml de cefoxitina. Todas las muestras se incubaron durante la noche a 37 °C en una incubadora con agitación.

5 Cultivo de día: se transfirieron 20 ul de cada uno de los cultivos nocturnos a un nuevo tubo de cultivo que contenía 2 ml de reactivo de medio de proliferación. A continuación se incubaron los inóculos a 37 °C con agitación durante aproximadamente 1 h 45 min, hasta que la DO(600 nm) alcanzó 0,1.

10 **Determinación de MIC por plaqueo:**

a) Cada uno de los cultivos de día se sembró en estrías en placas de TSA que contenían cefoxitina a 4, 8, 16, 32, 64 y 128 ug/ml.

15 b) Las placas se incubaron durante 18 horas a 37 °C para determinar la proliferación.

Preparación del ensayo de NRTP:

20 a) Los pocillos de una placa de ensayo de 96 pocillos blancos se llenaron con 100 ul de 2x reactivo de partícula de transducción.

b) Para cada uno de los cultivos de día, se llenaron a continuación cinco pocillos con 100 ul de cultivo de día.

25 c) Para cada uno de los cultivos de día, se añadió cefoxitina a un pocillo cada uno de modo que la concentración de cefoxitina en el pocillo fue de 4, 8, 16, 32, 64 y 128 ug/ml.

d) A continuación se selló la placa con un cierre transpirable y se incubó durante 4 horas a 37 °C con agitación moderada, 50 rpm.

30 Al final de las 4 horas, se retiró la placa de la incubadora y se midió de inmediato la luminiscencia en un SpectraMax L que inyectó 50 µl del reactivo de sustrato y se midió la luminiscencia durante un período de 1 minuto.

Análisis:

35 Se representó el valor de luminiscencia máximo después de la adición de reactivo de sustrato de cada muestra. Se usaron valores de RLU de muestra SASM para determinar un valor de corte calculado usando la siguiente fórmula: (Media RLU SASM + 3* DE RLU SASM).

Resultados:

40 La figura 23 muestra los resultados de proliferación de *S. aureus* a 4, 8, 16, 32, 64 y 128 ug/ml de cefoxitina. La figura 24 muestra los valores de RLU obtenidos por el ensayo de NRTP en presencia de 4, 8, 16, 32, 64 y 128 ug/ml de cefoxitina. El eje x en la figura 24 se establece en el valor de corte de RLU SASM.

45 Como se puede observar en la figura 23, NRS25 SARM presentó una MIC de 128 ug/ml de cefoxitina, mientras que S7 SARM presentó una MIC de 64 ug/ml de cefoxitina. En consecuencia, NRS25 SARM presentó luminiscencia apreciable por encima del valor de corte de RLU SASM a una concentración de cefoxitina de hasta 64 ug/ml de cefoxitina, mientras que S7 SARM presentó luminiscencia por encima del valor de corte de RLU SASM a una concentración de cefoxitina de hasta 32 ug/ml.

50 En base a los datos anteriores, el ensayo de NRTP demuestra que los valores de RLU obtenidos del ensayo se correlacionan con los resultados de MIC y, por tanto, el ensayo de NRTP se puede usar para desarrollar ensayos de susceptibilidad a antibióticos.

55 **Ejemplo 9: ensayo de indicador de transcrito: mecanismo de cambio conformacional de represión cis por bloqueo de RBS de la traducción de LuxAB activada por el transcrito del gen mecA de SARM**

Como se describe anteriormente, se puede diseñar un transcrito indicador de modo que la traducción de la secuencia de gen indicador se bloquee por represión cis del sitio de unión al ribosoma (RBS) del gen indicador.

60 Las siguientes herramientas se usaron para diseñar los transcritos indicadores.

1) Se calculó la estructura secundaria de ARN usando un programa de estructura secundaria, tal como Mfold (<http://mfold.rna.albanv.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>).

65 2) Se calcularon las interacciones de ARN intermoleculares usando un programa informático tal como la predicción

RNA-RNA InterACTion usando Integer Programming (RactIP) (<http://rna.naist.jp/ractip/>).

3) Se visualizó la estructura secundaria de ARN usando Visualization Applet for RNA (VARNA) (<http://varna.lri.fr/>).

5 La figura 25 muestra una estructura secundaria del transcrito de *mecA* generada en base a la conformación de menor energía calculada por MFold y visualizada con VARNA. El bucle terminal 23 (T23) contiene una secuencia YUNR UUGG que consiste en las bases 1.487-1.490 de la secuencia de transcrito de *mecA*. El análisis de la estructura secundaria del transcrito del gen *mecA* reveló varias regiones de ARNmc que eran adecuadas para diseñar un indicador *luxAB* reprimido en cis que se puede desreprimir por medio de interacciones entre el indicador y una región ARNmc.

15 Como se muestra en detalle en la figura 26, el bucle terminal 23 (T23) del transcrito de *mecA* contiene una secuencia consenso YUNR. Se ha demostrado que una secuencia consenso YUNR (pYrimidine-Uracil-Nucleotide-pURine) es una diana crítica para los complejos de ARN intermoleculares en los sistemas naturales. Se diseñó una secuencia de represión cis para formar una estructura tallo-bucle con el RBS de la secuencia indicadora, de modo que la secuencia de represión cis bloquee la unión de una ARN polimerasa al RBS de la secuencia indicadora. La secuencia indicadora se expuso tras la unión del bucle de la estructura tallo-bucle de represión cis con T23 del transcrito de *mecA*.

20 Como se muestra en la figura 27, se añadió una secuencia de represión cis 2701 al extremo 5' de los genes *luxAB* y se diseñó para formar una estructura tallo-bucle que bloquea la secuencia de RBS ("AAGGAA") 2702 del gen *luxA*. Se predijo que la estructura tallo-bucle de represión cis bloquea la secuencia de RBS de *luxA* ("AAGGAA"), en base a la conformación de menor energía del transcrito de *luxAB*, incluyendo la secuencia de represión cis en el extremo 5' del transcrito de *luxAB*, como se calcula por MFold y se visualiza con VARNA.

25 Los primeros 61 nucleótidos de los genes *luxAB* reprimidos en cis se muestran en la FIG. 7, hasta el codón de inicio AUG del gen *luxA*. La secuencia de RBS "AAGGAA" incluye las bases 47-52. Este bucle terminal del transcrito indicador se diseñó para interactuar con (unirse al) bucle terminal 23 (T23) del transcrito de *mecA*, que contiene una secuencia YUNR.

30 El bucle terminal de la secuencia de represión cis se diseñó para interactuar con T23 del transcrito de *mecA*, de modo que la hibridación del transcrito de *luxAB* reprimida en cis y el transcrito de *mecA* por medio de la interacción del bucle desde la estructura tallo-bucle de represión cis y T23 del transcrito de *mecA* da como resultado la exposición del RBS del gen *luxA*. La figura 28 muestra las interacciones intermoleculares predichas entre la secuencia *mecA* de T23 y la secuencia de represión cis en el transcrito de *luxAB* calculado por RactIP y visualizado por VARNA. Las líneas indican el emparejamiento de bases entre el transcrito de *mecA* y el transcrito de *luxAB* reprimido en cis. La interacción entre las dos secuencias da como resultado la exposición de la secuencia de RBS de *luxA* AAGGAA y, por tanto, la desrepresión del indicador *luxAB*.

40 **Ejemplo 10: ensayo de indicador de transcrito: procedimientos de detección de transcritos o genes diana usando un sistema indicador *mecA* - *luxAB***

45 En otro ejemplo, se proporciona un procedimiento para detectar un gen *mecA* diana usando un sistema indicador *mecA-luxAB*. Aquí, *mecA* es el transcrito diana, y *luxAB* es la molécula indicadora.

45 **1. Construcción de la construcción indicadora**

50 Un vector que comprende una construcción indicadora que codifica *luxAB* se puede construir por medio de técnicas de biología molecular estándar incorporando la construcción indicadora en un vector transportador que se puede propagar tanto en *E. coli* como en *S. aureus*. El vector puede contener un origen de replicación que es funcional en *E. coli* y un marcador seleccionable que se expresa en *E. coli* y es adecuado para permitir la proliferación de células de *E. coli* transformadas con el vector y cultivadas en condiciones selectivas. El vector también puede contener un origen de replicación que es funcional en *S. aureus* y un marcador seleccionable que se expresa en *S. aureus* y es adecuado para permitir la proliferación de células de *E. coli* transformadas con el vector y cultivadas en condiciones selectivas. La propagación del vector para llevar a cabo manipulaciones *in vitro* y para la verificación de manipulaciones se puede lograr por medio de una cepa de clonación de laboratorio adecuada de *E. coli* y el vector modificado final se puede introducir a continuación en cepas de *S. aureus*.

60 La construcción indicadora se puede introducir en primer lugar en una célula de *S. aureus* para transcribir la construcción y producir el transcrito indicador.

60 **2. Construcción de un transcrito indicador reprimido en cis**

65 Se proporcionan procedimientos para construir un transcrito indicador reprimido en cis que se puede unir a un transcrito diana de *mecA*. El transcrito indicador se puede construir por medio de técnicas de biología molecular estándar. Los genes *luxA* y *luxB* sirven como genes indicadores y se pueden derivar de *Vibrio harveyi*. Los genes

carecen de un promotor transcripcional, y cada uno contiene su propio sitio de unión ribosómica (RBS). Cuando ambos genes *luxA* y *luxB* se traducen en una célula, las proteínas *luxA* y *luxB* se complejan para formar la enzima luciferasa activa (LuxAB). Véase Farinha, M.A. a A.M. Kropinski, Construction of broad-host-range plasmid vectors for easy visible selection and analysis of promoters. J. Bacteriol., 1990. 172(6): p. 3496-3499.

5 La secuencia de represión cis se puede situar hacia 5' de los genes *luxAB* y hacia 3' de un promotor e incluye una secuencia que es complementaria al RBS de *luxA*. Una secuencia conectora puede separar las regiones complementarias de la secuencia de represión cis y la secuencia de *luxA*. Después de la transcripción del vector, las regiones complementarias de la secuencia de represión cis y el complejo de secuencia de RBS de *luxA* crean un tallo-bucle que evita el acoplamiento de un ribosoma y por tanto la traducción.

15 El tallo-bucle del transcrito indicador se diseña para desestabilizar y formar un complejo abierto cuando interactúa con una secuencia de transcrito de *mecA* natural (endógena a la célula). Para activar la traducción de la secuencia del gen *luxA*, el transcrito de *mecA* natural sirve como un ARN de activación trans que se une al transcrito indicador reprimido en cis y abre el tallo-bucle inhibidor que secuestra el RBS del gen *luxA*. Una vez que el RBS no está secuestrado por la secuencia de represión cis, se puede producir la traducción de *luxA*. La transcripción de la construcción indicadora se logra enlazando funcionalmente la secuencia indicadora a un promotor constitutivo, hacia 5' de la secuencia de represión cis.

20 Un ejemplo de una secuencia del gen *mecA* diana se muestra en la figura 29. La secuencia es una secuencia de ADN de locus del gen *mecA* (de *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus* SA40, genoma completo GenBank: CP003604.1; SEQ ID NO:15) y se puede usar para generar una construcción indicadora que comprende una secuencia indicadora y una secuencia de represión cis. Se muestran la posición -10 2901, la posición de inicio de transcripción 2902, el RBS 2903, la región codificante (en gris 904) y la secuencia de terminación de la transcripción 2905.

30 La figura 30 muestra una secuencia de transcrito de *mecA* ejemplar que se puede usar para diseñar un transcrito indicador (SEQ ID NO:16), de acuerdo con un modo de realización de la invención. El RBS 3001 y la secuencia codificante 3002 se muestran para *mecA*.

35 La figura 31 es un ejemplo de una secuencia de ADN de locus del gen *luxAB* que se puede usar para diseñar un transcrito indicador, de acuerdo con un modo de realización de la invención. La secuencia de ADN de locus del gen *luxAB* se obtuvo a partir de los genes de *Vibrio fischeri luxA* y *luxB* para las subunidades alfa y beta de luciferasa (GenBank: X06758.1) (SEQ ID NO: 17). Se muestran la posición -10 3101, la posición de inicio de transcripción 3102, el RBS para *luxA* 3103, la secuencia codificante de *luxA* 3104 (sombreado gris), el RBS para *luxB* 3105 y la secuencia codificante de *luxB* (sombreado gris) 3106.

40 La figura 32 es un ejemplo de una secuencia de transcrito de *luxAB* que se puede usar para diseñar un transcrito indicador (SEQ ID NO:18). Se muestran el RBS para *luxA* 3201, la secuencia codificante de *luxA* 3202 (sombreado gris), el RBS para *luxB* 3203 y la secuencia codificante de *luxB* (sombreado gris) 3204.

45 La figura 33 es un ejemplo de una secuencia de transcrito reprimida en cis de *luxAB* que se puede usar en un transcrito indicador (SEQ ID NO:19). Se muestran la secuencia de represión cis (cuadro de línea discontinua) 3301, el RBS para *luxA* 3302, la secuencia codificante de *luxA* 3303 (sombreado gris), el RBS para *luxB* 3304 y la secuencia codificante de *luxB* (sombreado gris) 3305.

3. Procedimientos para detectar la presencia o ausencia de un transcrito diana de *mecA* usando el transcrito indicador

50 Se proporcionan ejemplos para detectar la presencia o ausencia de un transcrito diana de *mecA* en una célula usando los transcritos indicadores. La figura 34 muestra un ejemplo de una célula que comprende un vector 3400 que codifica un transcrito indicador 1410, donde no existe un transcrito de *mecA* endógeno en la célula 3401 (por ejemplo, el genoma de la célula no contiene el gen *mecA*). En este caso, la secuencia de represión cis 3420 se une al RBS 3430 de los genes *luxAB*. En algunos modos de realización, la secuencia de represión cis 3420 se puede unir a una porción de o la totalidad del RBS del gen *luxA*, el RBS del gen *luxB*, o ambos. Este acontecimiento de unión bloquea y evita la traducción de los genes *luxAB*, y la molécula indicadora (por ejemplo, luciferasa) no se produce en la célula. Por tanto, no se detecta señal, lo que indica la ausencia del gen *mecA* en la célula.

60 En otro ejemplo, la célula incluye un transcrito endógeno de *mecA* (por ejemplo, el genoma de la célula contiene el gen *mecA*). La figura 35 muestra un vector 3400 introducido en una célula 3401. El vector 3400 codifica el transcrito indicador 3410, que incluye una secuencia de represión cis 3420 y una secuencia indicadora (genes *luxA* y *luxB*). Cuando el transcrito de *mecA* 3510 presente en la célula se une a la secuencia de represión cis 1420, se abre el bucle de horquilla inhibidor y se expone el RBS 3430 para el gen *luxA*. Se puede producir la traducción de las secuencias indicadoras (*luxA* y *luxB*), dando como resultado la formación de una enzima *luxAB* 3520. La enzima *luxAB* 3520 produce una señal luminiscente detectable 3530. De esta manera, el vector indicador de transcrito 3400 indica la presencia de transcritos de *mecA* endógenos 3510 dentro de una célula 3401.

REFERENCIAS CITADAS

1. Michael G. Schmidt, D.A.S., Caroline Westwater, Joseph W. Dolan, Brian D. Hoel, Philip A. Werner, James S. Norris, Laura M. Kasman, *Nucleic Acid Delivery and Expression*, 2005.
2. Kreiswirth, B.N. *et al.*, The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. *Nature*, 1983. 305(5936): p. 709-712.
8. Ubeda, C. *et al.*, Specificity of staphylococcal phage and SaPI DNA packaging as revealed by integrase and terminase mutations. *Molecular Microbiology*, 2009. 72(1): p. 98-108.
9. Otsuji, N. *et al.*, Induction of Phage Formation in the Lysogenic *Escherichia coli* K-12 by Mitomycin C. *Nature*, 1959. 184(4692): p. 1079-1080.
10. Brantl, S. (2007) Regulatory mechanisms employed by cis-encoded antisense RNAs. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 102-109.
11. Isaacs, F.J. *et al.* (2004) Engineered riboregulators enable post-transcriptional control of gene expression. *Nat. Biotechnol.* 22, 841-847.
12. Pfeiffer, V. *et al.* (2009) Coding sequence targeting by MicC RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 840-846.
13. Opdyke, J.A. *et al.* (2004) GadY, a small-RNA regulator of acid response genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186, 6698-6705.
14. Carriere, C., *et al.*, *Conditionally replicating luciferase reporter phages: Improved sensitivity for rapid detection and assessment of drug susceptibility of Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997. 35(12): p. 3232-3239.
15. Merten, O.-W. and M. Al-Rubeai, *Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols*. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 737. 2011.
16. Lofdahl, S., J.E. Sjoström y L. Philipson, *CLONING OF RESTRICTION FRAGMENTS OF DNA FROM STAPHYLOCOCCAL BACTERIOPHAGE-PHI-11*. *Journal of Virology*, 1981. 37(2): p. 795-801.
17. Charpentier, E., *et al.*, *Novel Cassette-Based Shuttle Vector System for Gram-Positive Bacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004. 70(10): p. 6076-6085.
18. Novick, R.P., I. Edelman y S. Lofdahl, *Small staphylococcus-*aureus* plasmids are transduced as linear multimers that are formed and resolved by replicative processes*. *Journal of Molecular Biology*, 1986. 192(2): p. 209-220.
19. Westwater, C., *et al.*, Development of a P1 phagemid system for the delivery of DNA into Gram-negative bacteria. *Microbiology*, 2002. 148(4): p. 943-950.
20. Norris, J.U., *et al.*, *Tissue-Specific and Pathogen-Specific Toxic Agents and Ribozymes*. 1999.
21. Maiques, E., *et al.*, Role of Staphylococcal Phage and SaPI Integrase in Intra- and Interspecies SaPI Transfer. *J. Bacteriol.*, 2007. 189(15): p. 5608-5616.
22. Frees, D., *et al.*, Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 2004. 54(5): p. 1445-1462.
23. Arnaud, M., A. Chastanet y M. Debarbouille, New Vector for Efficient Allelic Replacement in Naturally Nontransformable, Low-GC-Content, Gram-Positive Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004. 70(11): p. 6887-6891.
24. Tormo, M.A., *et al.*, *Staphylococcus aureus* Pathogenicity Island DNA Is Packaged in Particles Composed of Phage Proteins. *J. Bacteriol.*, 2008. 190(7): p. 2434-2440.
25. Arthur, M., *et al.*, The VanS sensor negatively controls VanR-mediated transcriptional activation of glycopeptide resistance genes of Tn1546 and related elements in the absence of induction. *J. Bacteriol.*, 1997. 179(1): p. 97-106.
26. Karlsson, S., *et al.*, Expression of *Clostridium difficile* Toxins A and B and Their Sigma Factor TcdD Is Controlled by Temperature. *Infect. Immun.*, 2003. 71(4): p. 1784-1793.

27. Daniel Sobek, J.R., Enzyme detection system with caged substrates, 2007, Zymera, Inc.
28. Samie Jaffrey, J.P., Coupled recognition/detection system for in vivo and in vitro use, 2010, Cornell University.
- 5 29. Good, L., Translation repression by antisense sequences. Cellular and Molecular Life Sciences, 2003. 60(5): p. 854-861.
30. Sabine, B., Antisense-RNA regulation and RNA interference. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression, 2002. 1575(1-3): p. 15-25.

10

LISTADO DE SECUENCIAS INFORMAL

SEQ ID NO: 1

5 Sitio pac de P1 natural

CCACTAAAAAGCATGATCATTGATCACTCTAATGATCAACATGCAGGTGATCACATTGCGGC
TGAAATAGCGGAAAAACAAAGAGTTAATGCCGTTGTCAGTGCCGCAGTCGAGAATGCCAAGC
GCCAAAATAAGCGCATAAATGATCGTTCAGATGATCATGACGTGATCACCCGC

SEQ ID NO: 2

10

Sitio pac de P1 con mutaciones sinónimas, las letras en minúscula significan bases mutadas

CCACTAAAAAGCATGATaATaGAcCACTCTAAcGAcCAACATGCAGGgGAgCACATTGCGGC
TGAAATAGCGGAAAAgCAgAGgGTgAATGCCGTTGTCAGTGCCGCAGTCGAGAATGCCAAGC
GCCAAAATAAGCGCATAAAcGAcCGTTCAGAcGAcCATGACGTtATtACCCGC

15 SEQ ID NO: 3

Replicón lítico de P1 que contiene el promotor P536 controlado por represor C1, el promotor P53 antisentido, los genes repl, y una delección sin cambio de pauta de lectura del gen kilA

CACTATAGGGCGAATTGGCGGAAGGCCGTCAAGGCCGCATTTGGGCCCGGCGCGCCGGATCC
GCTAGCTCTAGACTGGCAGGTTTCTGAGCAGATCGTCCAACCCGATCTGGATCGGGTCAGAA
AAATTTGCTCTAATAAATTTTCGTTTTCTAAGTGCAAAGAATCACCATTTTCGAGCTGGTGATT
GAAGGTTGATGCAAATTTGGAGAAAAAATGCAACAAACATTCAATGCGGATATGAATATATC
AAACCTTCATCAAAATGTCGATCCTTCAACCACTCTGCCCGTTATTTGTGGTGTGAAATTA
CGACCGACCGCGCTGGCCGTTACAACCTTAATGCTCTACACAGAGCGAGCGGACTCGGTGCC
CATAAAGCGCCAGCTCAATGGCTAAGAACGCTGTGAGCTAAACAGCTCATCGAAGAGCTTGA
AAAAGAACTATGCAGAATTGCATAGTTTTCGTTCACAAGCAATGGAAGCAGGATTTCTTTCA
CGACTCGTATAACCGGCAAAGGTCAGCAGTGGCTGATGAAGCGATTGCTTGATGCTGGTGTG
CTGGTACCTGTGCGGCAACGCGCTAACAGACGTAGTAAGAACCACCAGCATTGTAATGCTG
GCTAAAGTCACTTTCCTGAGCTGTATAACGATGAGCGATTTTACTTTTTCTGGCTATGAATT
GGCCTGCTTTGTAACACACTCCGGTCTATCCCGTAGCGCCGGGCATATCCTGTGCAATGTG
CAAATCTCGCGGCAACAACAGTGAATACTTCATTCAAGCCTCACCGCCTGATCGCGGCA
GAAACTGGTTATAGCCAATCAACCGTTCGTTTCGTGCATTCGTTGAAGCTGTAAACAAAGGAAT
TCTGTCTGTAGAGATTGTTATCGGCGATCACCGTGAACGTCGCGCTAACCTGTACCGGTTTA
CACCATCCTTTTTGGCCTTCGCACAACAAGCCAAAAATGCGCTGATAGAAAGCAAATTAAG
ATCTCTTCAGCGGCAACCAAGGTTAAAGCTGTTCTCGCTAAGACATTGGCTTTATTTAATTT
TTTATCCACACCCCATGTCAAATGATACCCCTCCCTGTGAGGATGACGTGGCAATAA

20

ES 2 780 827 T3

AGAATAAGAAGTCACAAGTTAAAAAACAAAAAGATCAGTTTCCGGCGGTGCCGGAACAACC
AGCCTCAAAAAATTGACTTCATGGATCGCTAAGGCAAAAGCAAAGGCTGACAATCTGCGGTT
ATCCAAAAACGCACTCAAAAACATGAGTTCAAGCAGAAAGTAGAGGCGGCTGCGCGGAAAT
ATGCTTACCTGAAGAACAAGCGTTCGCCTGATATTGGCGGGATATCAAACCTTCGATAACCTA
CCGCATTGCATGACGGTAAACGAAGCTCTTAATGCGGTTTTAGCCAAAAATAAAGATAACGA
ACAATGGGGTATACCGGCAGGATTCAGAGGGTAATGAATTGCTCTAATTATAACCATGCATA
CTTTCAACACCTCTAGTTTGCCATGAGGCAAACCTCATAGGTGTCCTGGTAAGAGGACACTGT
TGCCAAAACCTGGACGCCCATTTATTGCAATTAATAAACAACCTAACGGACAATTCTACCTAAC
AATAAGTGGCTTAAAAAACCCGCCCGGGGTTTTTTTTATCTAGAGCTAGCGGATCCGGC
GCGCCGGGCCCTTCTGGGCCTCATGGGCCTTCCGCTCACTGCCCGCTTTCCAG

SEQ ID NO: 4

5 Secuencia del promotor Pblast

CGTCAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACA
TTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAG
GAAGAGT

SEQ ID NO: 5

10

Origen de replicación del plásmido pT191 de *S. aureus*, variante en el número de copias pT181cop-623 repC

TTTGCGGAAAGAGTTAGTAAGTTAACAGAAGACGAGCCAAACCTAAATGGTTTTAGCAGGAAA
CTTAGATAAAAAAATGAATCCAGAATTATATTCAGAACAGGAACAGCAACAAGAGCAACAAA
AGAATCAAAAACGAGATAGAGGTATGCACTTATAGAACATGCATTTATGCCGAGAAAACCTTA
TTGGTTGGAATGGGCTATGTGTTAGCTAACTTGTTAGCGAGTTGGTTGGACTTGAATTGGGA
TTAATCCCAAGAAAGTACCGGCTCAACAACCCATAAAGCCCTGTAGGTTCCGNCCAATAAGG
AAATTGGAATAAAGCAATAAAAGGAGTTGAAGAAATGAAATTCAGAGAAGCCTTTGAGAATT
TTATAACAAGTAAGTATGTACTTGGTGTTTTTAGTAGTCTTAACTGTTTACCAGATAATACAA
ATGCTTAAATAAAAAAAGACTTGATCTGATTAGACCAAATCTTTTGATAGTGTTATATTAAT
AACAAAATAAAAAGGAGTCGCTCACGCCCTACCAAAGTTTGTGAACGACATCATTCAAAGAA
AAAAACACTGAGTTGTTTTTATAATCTTGTATATTTAGATATTAACGATATTTAAATATAC
ATCAAGATATATATTTGGGTGAGCGATTACTTAAACGAAATTGAGATTAAGGAGTCGATTTT
TTATGTATAAAAACAATCATGCAAATCATTCAAATCATTTGGAAAATCACGATTTAGACAAT
TTTTCTAAAACCGGCTACTCTAATAGCCGGTTGGACGCACATACTGTGTGCATATCTGATCC
AAAATTAAGTTTTGATGCAATGACGATCGTTGGAAATCTCAACCGAGACAACGCTCAGGCC
TTTCTAAATTTATGAGTGTAGAGCCCCAAATAAGACTTTGGGATATTCTTCAAACAAAGTTT
AAAGCTAAAGCACTTCAAGAAAAAGTTTATATTGAATATGACAAAGTGAAAGCAGATAGTTG
GGATAGACGTAATATGCGTATTGAATTTAATCCAAACAAACTTACACGAGATGAAATGATTT
GGTTAAAACAAAATATAATAAGCTACATGGAAGATGACGGTTTTTACAAGATTAGATTTAGCC
TTTGATTTTGAAGATGATTTGAGTGACTIONTATGCAATGTCTGATAAAGCAGTTAAGAAAAC
TATTTTTTATGGTCGTAATGGTAAGCCAGAAACAAAATATTTTTGGCGTGAGAGATAGTAATA
GATTTATTAGAATTTATAATAAAAAGCAAGAACGTAAAGATAATGCAGATGCTGAAGTTATG
TCTGAACATTTATGGCGTGTAGAAATCGAACTTAAAAGAGATATGGTGGATTACTGGAATGA
TTGCTTTAGTGATTTACATATCTTGCAACCAGATTGGAAAACCTATCCAACGCACTGCCGATA
GAGCAATAGTTTTTATGTTATTGAGTGATGAAGAAGAATGGGGAAAGCTTCACAGAAATCT
AGAACAAAATATAAGAATTTGATAAAAGAAATTTGCCAGTCGATTTAACGGACTTAATGAA
ATCGACTTTAAAAGCGAACGAAAAACAATTGCAAAAACAATCGATTTTTGGCAACATGAAT
TTAAATTTTGGAAATAGTGACATATTAATATTACTIONTGAACAAAATGATATATTTAAACTAT

TCTAATTTAGGAGGATTTTTTTATGAAGTGTCTATTTAAAAATTTGGGGAATTTATATGAGG
TGAAAGAATAATTTACCCCTATAAACTTTAGCCACCTCAAGTAAAGAGGTAAAATTGTTTAG
TTTATATAAAAAATTTAAAGGTTTGTTTTATAGCGTTTTATTTTGGCTTTGTATTCTTTCAT
TTTTTAGTGTATTAAATGAAATGGTTTTAAATGTTTCTTTACCTGATATTGCAAATCATTTT
AATACTACTCCTGGAATTACAACTGGGTAAACACTGCATATATGTAACTTTTTTCGATAGG
AACAGCAGTATATGGAAAATTATCTGATTATATAAATATAAAAAAATTGTTAATTATTGGTA
TTAGTTTGAGCTGTCTTGTTTCATTGATTGCTTTTTATTGGGCCACCTAGGCAAATATGCTC
TTACGTGCTATTATTTAAGTGAATTTTAAAAGGAGTTAATAAATATGCGGCAAGGTATTCT
TAAATAAACTGTCAATTTGATAGCGGGAACAAATAATTAGATGTCCTTTTTTTAGGAGGGCTT
AGTTTTTTGTACCCAGTTTAAAGAATACCTTTATCATGTGATTCTAAAGTATCCAGAGAATAT
CTGTATGCTTTGTATACCTATGGTTATGCATAAAAAATCCCAGTGATAAAAAGTATTTATCACT
GGGATTTTTATGCCCTTTTGGGTTTTTGAATGGAGGAAAATCACATGAAAATTATTAATATT
GGAGTTTTAGCTCATGTTGATGCAGGAAAACTACCTAACAGAAAGCTTATATATAACAG
TGGAGCGATTACAGAATTAGGAAGCGTGGACAAAGGTACAACGAGGACGGATAATACGCTTT
TAGAACGTCAGAGAGGAATTACAATTCAGACAGGAATAACCTCTTTTCAGTGGGAAAATACG
AAGGTGAACATCATAGACACGCCAGGACATATGGATTTCTTAGCAGAAGTATATCGTTCATT
ATCAGTTTTAGATGGGGCAATTCTACTGATTTCTGCAAAGATGGCGTACAAGCACAACTC
GTATATTATTTTCATGCACTTAGGAAAATGGGGATTTCCACAATCTTTTTTATCAATAAGATT
GACCAAAATGGAATTGATTTATCAACGGTTTATCAGGATATTAAGAGAACTTTCTGCCGA
AATTGTAATCAAACAGAAGGTAGAAGTGTATCCTAATATGTGTGTGACGAACTTTACCGAAT
CTGAACAATGGGATACGGTAATAGAGGGAAACGATAACCTTTTAGAGAAATATATGTCCGGT
AAATCATTAGAAGCATTGGAAGTGAACAAGAGGAAAGCATAAGATTTAGAAATTGTTCTCT
GTTCCCTCTTTATCATGGAAGTGCAAAAGTAATATAGGGATTGATAACCTTATAGAAGTTA
TTACTAATAAAATTTTATTCATCAACACATCGAGGTCCGTCTGAACTTTGCCGAAATGTTTTC
AAAATTGAATATACAAAAAAGACAACGTCTTGATATATACGCCCTTTATAGTGGAGTACT
ACATTTACGAGATTCGGTTAGAGTATCAGAAAAAGAAAAAATAAAAGTTACAGAAATGTATA
CTTCAATAAATGGTGAATTATGTAAGATTGATAGAGCTTATTCTGGAGAAATGTTATTTTG
CAAAATGAGTTTTTTGAAGTTAAATAGTGTCTTGGAGATACAAAATATTGCCACAGAGAAA
AAAGATTGAAAATCCGCACCCTCTACTACAAACAACCTGTTGAACCGAGTAAACCTGAACAGA
GAGAAATGTTGCTTGATGCCCTTTTGGAAATCTCAGATAGTGATCCGCTTCTACGATATTAC
GTGGATTCTACGACACATGAAATTATACTTTCTTTCTTAGGGAAAGTACAAATGGAAGTGAT
TAGTGCCTGTTGCAAGAAAAGTATCATGTGGAGATAGAACTAAAAGAGCCTACAGTCATTT
ATATGGAGAGACCGTTAAAAAATGCAGAAATATAACCATTACATCGAAGTGCCGCCAAATCCT
TTCTGGGCTTCCATTGGTTTATCTGTATCACCGCTTCCGTTGGGAAGTGAATGCAGTATGA
GAGCTCGGTTTTCTTTGGATACTTAAATCAATCATTTCAAATGCAGTTATGGAAGGGGTAC
GCTATGGTTGCGAACAAGGATTATATGGTTGGAATGTGACGGATTGTAATACTGTTTTAAG
TACGGTTTATACTATAGCCCTGTTAGTACTCCAGCAGATTTTCGGATGCTTACTCCTATTGT
ACTGGAGCAAGCCTTTAGAAAAGCTGGAACAGAATTGTTAGAGCCATATCTTAGTTTTAAG
TTTATGCACCACAGGAATATCTTTCNCGGGCATATAACGATGCTCCCAAATATTGTGCAAAT

ES 2 780 827 T3

ATCGTAAATACTCAACTGAAAAATAATGAGGTCATTATTATTGGAGAAATTCCTGCTCGATG
TATTCAAGATTATCGCAATGATTTAACTTTTTTTACAAATGGGCTTAGTGTTTGTTTAGCAG
AGCTAAAAGGATATCAGGTTACCACTGGCGAACCTGTTTGCAGACCCGTCGTCTAAATAGT
CGGATAGATAAAGTAAGATATATGTTCAATAAAATAACTTAGTGCGTTTTATGTTGTTATAT
AAATATGGTTTTCTTATTAAATAAGATGAAATATTCTTTAATATAGATTTGAATTAAGTGGA
AAGGAGGAGATTGTTATTATAAACTACAAGTGGATATTGTGTCCTATTTGTGGAAATAAAAC
AAGACTACGAATACGAGTGGATACTATACTTAAAAATTTCCCTTTATACAGCCCCAAATGTA
AGAACGAACTTTAATTAATGTTCAAAAAATGAATATAATAACAATCAAAGAGCCAGACGCC
AAGACGCAGAGCCGATAATTTGAGAAATGAAACTCTCATCTTATCGGCTCTTTTTGTTTATC
TGAATTTTACTGACTAGCCTTCAATATTTCC

SEQ ID NO: 6

5 gen pacA de P1, las letras en minúscula significan la secuencia del sitio pac deletcionada

GTGACCTGGGACGATCACAAGAAGAATTTTGTCTCGCCTGGCGCGAGATGGTGGTTACACCAT
CGCACAGTATGCCGCCGAGTTTAATCTTAACCCTAATACCGCACGTCGTTATCTCCGTGCCT
TCAAAGAAGACACCAGGACTACGGACAGCCGCAAGCCAAATAAGCCAGTCAGGAAGccacta
aaaagcatgatcattgatcactctaataatgatcaacatgcaggtgatcacattgcggctgaaat
agcgggaaaaacaaagagttaatgccggtgtcagtgccgcagtcgagaatgccaagcgcctaaa
ataagcgcataaatgatcgttcagatgatcatgacgtgatcaccgcgGCCACCGGACCTTA
CGTGATCGCCTGGAACGCGACACCCTGGATGATGATGGTGAACGCTTTGAATTCGAAGTTGG
CGATTACCTGATAGATAACGTTGAAGCGCGGAAGGCCGCGCGCTATGTTGCGTCGGTCCG
GGGCCGATGTTCTGGAACCACTCTTCTGGAAAAGTCTCTTTCTCATCTCCTTATGCTGGAG
AACGCCAGGGATACGTGTATTTCGCTGGTGCAGGAAATGCGCGATCAGCAAAAAGACGATGA
TGAAGGTACTCCGCCTGAATACCGTATCGCGAGCATGCTAAACAGCTGTTCCGCGCAGATAA
GCAGCCTGATCAACACCATTTACAGCATCCGGAATAACTATCGAAAAGAAAGCCGGGAGGCC
GAAAAGCACGCTTTATCTATGGGGCAAGCTGGCATTGTTAAGCTGGCATAACGAACGAAAGCG
TGAAAATAACTGGTCAAGTGTGGAAGCGGCTGAATTCATCGAGGCGCATGGAGGAAAAGTGC
CGCCCCTGATGCTGGAGCAAATCAAAGCCGATCTGCGTGCTCCTAAGACCAATACCGATGAT
GAGGAAAACCAAACAGCATCTGGCGCTCCATCACTTGAAGATCTGGATAAAATCGCGCGAGA
ACGGGCCCGCCAGCCGCGCGCTGATGCCGATTGTGGATTGAGCATCGTAGAGAAGAAATTG
CCGATATCGTCGATACAGGTGGTTATGGTGTGTCGATGCGGAAGGCATATCAAACGAAGCA
TGGCTTGAACAGGATCTGGACGAAGACGAGGAGGAAGACGAAGAAGTTACCCGCAAACCTGTA
CGGGGATGATGATTAA

SEQ ID NO: 7

10 Gen pacA de P1 natural

GTGACCTGGGACGATCACAAGAAGAATTTTGCTCGCCTGGCGCGAGATGGTGGTTACACCAT
CGCACAGTATGCCGCCGAGTTTAACTCTTAACCCTAATACCGCACGTCGTTATCTCCGTGCCT
TCAAAGAAGACACCAGGACTACGGACAGCCGCAAGCCAAATAAGCCAGTCAGGAAGCCACTA
AAAAGCATGATCATTGATCACTCTAATGATCAACATGCAGGTGATCACATTGCGGCTGAAAT
AGCGGAAAAACAAAGAGTTAATGCCGTTGTCAGTGCCGCAGTCGAGAATGCGAAGCGCCAAA
ATAAGCGCATAAATGATCGTTTCAAGATGATCATGACGTGATCACCCGCGCCCACCGGACCTTA
CGTGATCGCCTGGAACGCGACACCCTGGATGATGATGGTGAACGCTTTGAATTCGAAGTTGG
CGATTACCTGATAGATAACGTTGAAGCGCGGAAGGCCGCGCGCTATGTTGCGTCCGTCCG
GGGCCGATGTTCTGGAAACCACTCTTCTGGAAAAGTCTCTTTCTCATCTCCTTATGCTGGAG
AACGCCAGGGATACGTGTATTTCGCCTGGTGCAGGAAATGCGCGATCAGCAAAAAGACGATGA
TGAAGGTACTCCGCCTGAATACCGTATCGCGAGCATGCTAAACAGCTGTTCCGCGCAGATAA
GCAGCCTGATCAACACCATTTACAGCATCCGGAATAACTATCGAAAAGAAAGCCGGGAGGCG
GAAAAGCACGCTTTATCTATGGGGCAAGCTGGCATTGTTAAGCTGGCATAACGAACGAAAGCG
TGAAAATAACTGGTCAGTGCTGGAAGCGGCTGAATTCATCGAGGCGCATGGAGGAAAAGTGC
CGCCCCTGATGCTGGAGCAAATCAAAGCCGATCTGCGTGCTCCTAAGACCAATACCGATGAT
GAGGAAAACCAAACAGCATCTGGCGCTCCATCACTTGAAGATCTGGATAAAAATCGCGCGAGA
ACGGGCCCGCCAGCCGCCGCGCTGATGCCGCATTGTGGATTGAGCATCGTAGAGAAGAAATTG
CCGATATCGTCGATACAGGTGGTTATGGTGTGTCGATGCGGAAGGCATATCAAACGAAGCA
TGGCTTGAACAGGATCTGGACGAAGACGAGGAGGAAGACGAAGAAGTTACCCGCAAACCTGTA
CGGGGATGATGATTAA

SEQ ID NO: 8

5 Gen terS, los caracteres en minúscula significan secuencias delecionadas

ATGAACGAAAAACAAAAGAGATTTCGCAGATGAATATATAATGAATGGATGTAATGGTAAAAA
AGCAGCAATTTTCAGCAggttatagtaagaaaacagcagagtctttagcaagtcgattggttaa
gaaatgtaaatgttttcggaatatattaagaacgattagaacagatacaagaagagcgttta
atgagcattacagaagctttagcgttatctgcttctattgctagaggagaacctcaagaggc
ttacagtaagaaatatgaccatttaaacgatgaagtggaaaaagaggttacttacacaatca
caccaacttttgaagagcgtcagagatctattgaccacataactaaaagttcatggtgcgat
atcgacaaaaaagaaattactcagaagaatattgagattaatattAGATCTATTGACCACAT
ACTAAAAGTTTCATGGTTCGTATATCGACAAAAAAGAAATTACTCAGAAGAATATTGAGATTA
ATATTGGTGAGTACGATGACGAAAGTTAA

SEQ ID NO: 9

10 Secuencia que contiene el gen terS natural

ES 2 780 827 T3

AATTGGCAGTAAAGTGGCAGTTTTTGATACCTAAAATGAGATATTATGATAGTGTAGGATAT
TGACTATCTTACTGCGTTTTCCCTTATCGCAATTAGGAATAAAGGATCTATGTGGGTTGGCTG
ATTATAGCCAATCCTTTTTTAATTTTAAAAAGCGTATAGCGCGAGAGTTGGTGGTAAATGAA
ATGAACGAAAAACAAAAGAGATTTCGCAGATGAATATATAATGAATGGATGTAATGGTAAAAA
AGCAGCAATTTTCAGCAGGTTATAGTAAGAAAACAGCAGAGTCTTTAGCAAGTCGATTGTTAA
GAAATGTTAATGTTTTCGGAATATATTTAAAGAACGATTAGAACAGATACAAGAAGAGCGTTTA
ATGAGCATTACAGAAGCTTTAGCGTTATCTGCTTCTATTGCTAGAGGAGAACCCTCAAGAGGC
TTACAGTAAGAAATATGACCATTTAAACGATGAAGTGGAAAAAGAGGTTACTTACACAATCA
CACCAACTTTTGAAGAGCGTCAGAGATCTATTGACCACATACTAAAAGTTCATGGTGCAT
ATCGACAAAAAGAAATTAAGTACTCAGAAGAATATTGAGATTAATATTGGTGGTACGATGACGA
AAGTTAAATTAACCTTTAACAAACCATCTAATGTTTTCAACAG

SEQ ID NO: 10

5 Gen de la integrasa de SaPibov2

TCATAAATATTTAACTATTTCTTTCTGTGTACTAGGGTACAAATGACCGTATCGGTTATATA
CTTCATTACTATCAGCATGGCCTAAACGCTGTGCTATTACCATGATACTTTCGCCATGATTG
ACTAGCATAGACGCATGGCTATGTCTTAACTCATGAATTACAATTCTAGGGAATGTCTGACC
GTCTGGTAGTTGTTTCATCTAATACTTTTAAATGCAGCGGTAAACCAACGATCTATAGTTGATT
CACTATAAGCTTTGAAGAATGTACCGAATAATACATAATCATCTTTATATACATTGTTTTCT
TTGTACCATTTTAAATATTTCTTTGATATCATTTCATCATGTGAACAGGTAAGTATATATCACG
TATTGCTGCTTTTGTTTTAGGGGCTGTCACTTCACCGTGATAGTCTGTTTTGTAAATATGTA
TGAAATCATCATCATAGTTAATATCACGCCATGTGAGGGCTCTAATTTTCGCCCTTACGTGCA
CCAGAGTAAAACAGTAGCTTAAAGAATAACTTTTGTGTTGTGTAGCTAAAGCCTCATAGAA
TTGATTGAATTGTTCTAATGTCCAATAGTTCAAACGCTTATTTGATTCTATTTCAAAGTTAC
CTACTAGAGAGGCTACATTTTGTCTTAGATCATGAACTTCATAGCATGGTTAAGTAACGAT
ACTAAGAACACGTGCATTTTCTTTAGGTAATCTCCAGAGTGTCCCTCTTTTAACTTCGTATT
CTGAAACTTCATAATATCTTGTGTAGTCATATTAACACGTCCATAGACTTAAAATAGGGTA
GCAAATGGTTGTTTGTATGTGTCTTTAATGCTTTTCACTAGATGACTTACGACGTGCAGAA
TACCACTCTATACTCATCTACGAGCTTATCAAAGGGCAGTTTGTTTATCTGTCCTACACC
CTCTAACTCGTCCATAATTTCAATTACATTTCTTCAATGCCTCTTTACGCTGTTTAAAGCCAC
TCTTTTTTATTTCTTTACGTTGATTAAATTTATCATAGTATTTTATACGAAAATAGTATGTA
CCACGTTTAGCGTCTTTATATATGTTGTGGGATAGGTTTAAAGTTGTGTTCTATGGGAATCAC

10 SEQ ID NO: 11

Secuencia completa de pGWP10001

CTCGGGCCGTCTCTTGGGCTTGATCGGCCTTCTTGCGCATCTCACGCGCTCCTGCGGGCGGCC
TGTAGGGCAGGCTCATACCCCTGCCGAACCGCTTTTGTGAGCCGGTCGGCCACGGCTTCCGG
CGTCTCAACGCGCTTTGAGATTCCCAGCTTTTCGGCCAATCCCTGCGGTGCATAGGCGCGTG
GCTCGACCGCTTGCGGGCTGATGGTGACGTGGCCACTGGTGGCCGCTCCAGGGCCTCGTAG
AACGCCTGAATGCGCGTGTGACGTGCCTTGCTGCCCTCGATGCCCCGTTGCAGCCCTAGATC
GGCCACAGCGGCCGCAAACGTGGTCTGGTTCGCGGGTTCATCTGCGCTTTGTTGCCGATGAACT
CCTTGGCCGACAGCCTGCCGTCTGCGTCAGCGGCACCACGAACGCGGTTCATGTGCGGGCTG
GTTTCGTACGGTGGATGCTGGCCGTACGATGCGATCCGCCCGTACTTGTCCGCCAGCCA
CTTGTGCGCCTTCTCGAAGAACGCCGCCTGCTGTTCTTGGCTGGCCGACTTCCACCATTCCG
GGCTGGCCGTTCATGACGTACTCGACCGCCAACACAGCGTCTTTCGCGCCGCTTCTCTGGCAGC
AACTCGCGCAGTCGGCCCATCGCTTCATCGGTGCTGCTGGCCGCCCAGTGTCTGTTCTCTGG
CGTCTGCTGGCGTCAGCGTTGGGCGTCTCGCGCTCGCGGTAGGCGTGCTTGAGACTGGCCG
CCACGTTGCCCATTTTCGCCAGCTTCTTGCATCGCATGATCGCGTATGCCGCCATGCCTGCC
CCTCCCTTTTGGTGTCCAACCGGCTCGACGGGGGACGCGCAAGGCGGTGCCTCCGGCGGGCC
ACTCAATGCTTGAGTATACTCACTAGACTTTGCTTCGCAAAGTCGTGACCGCTACGGCGGC
TGCGGCGCCCTACGGGCTTGCTCTCCGGGCTTCGCCCTGCGCGGTGCTGCGCTCCCTTGCC
AGCCCGTGGATATGTGGACGATGGCCGCGAGCGGCCACCGGCTGGCTCGCTTCGCTCGGCCC
GTGGACAACCCTGCTGGACAAGCTGATGGACAGGCTGCGCCTGCCACGAGCTTGACCACAG
GGATTGCCACCCGGCTACCACTATAGGGCGAATTGGCGGAAGGCCGTCAAGGCCGCATTTGG
GCCCGGCGCGCCGGATCCGCTAGCTCTAGACCTTAGACCAGCCAGGACAGAAATGCCTCGA
CTTCGCTGCTGCCAAGGTTGCCGGGTGACGCACACCGTGGAAACGGATGAAGGCACGAACC
CAGTGGACATAAGCCTGTTTCGGTTCGTAAGCTGTAATGCAAGTAGCGTGCCGTTCCGGGGCC
TTTTGACATGTGACTTTTCGTTACCCTCGCGTCAAAAAGAGTTTTTACGAAAGGAAGCATAAG
TGACCTGGGACGATCACAGAAGAATTTTGTGCTCGCTGGCGCGAGATGGTGGTTACACCATC
GCACAGTATGCCGCCGAGTTTAATCTTAACCCTAATACCGCACGTCGTTATCTCCGTGCCTT
CAAAGAAGACACCAGGACTACGGACAGCCGCAAGCCAAATAAGCCAGTCAGGAAGCCACTAA
AAAGCATGATCATTGATCACTCTAATGATCAACATGCAGGTGATCACATTGCGGCTGAAATA
GCGGAAAAACAAAGAGTTAATGCCGTTGTCAGTGCCGCGAGTCGAGAATGCGAAGCGCCAAAA
TAAGCGCATAAATGATCGTTCAGATGATCATGACGTGATCACCCGCGCCACCGGACCTTAC
GTGATCGCCTGGAACGCGACACCCCTGGATGATGATGGTGAACGCTTTGAATTCGAAGTTGGC
GATTACCTGATAGATAACGTTGAAGCGCGGAAGGCCGCGCGCTATGTTGCGTCGGTCCGG
GGCCGATGTTCTGGAAACCACTCTTCTGGAAAAGTCTCTTTCTCATCTCCTTATGCTGGAGA
ACGCCAGGGATACGTGTATTCGCCCTGGTGCAGGAAATGCGCGATCAGCAAAAAGACGATGAT
GAAGGTACTCCGCCTGAATACCGTATCGCGAGCATGCTAAACAGCTGTTCCGCGCAGATAAG
CAGCCTGATCAACACCATTTACAGCATCCGGAATAACTATCGAAAAGAAAGCCGGGAGGCGG

AAAAGCACGCTTTATCTATGGGGCAAGCTGGCATTGTTAAGCTGGCATAACGAACGAAAGCGT
 GAAAATAACTGGTCAGTGCTGGAAGCGGCTGAATTCATCGAGGCGCATGGAGGAAAAGTGCC
 GCCCCTGATGCTGGAGCAAATCAAAGCCGATCTGCGTGCTCCTAAGACCAATACCGATGATG
 AGGAAAACCAAACAGCATCTGGCGCTCCATCACTTGAAGATCTGGATAAAATCGCGCGAGAA
 CGGGCCGCCAGCCGCCGCGCTGATGCCGCATTGTGGATTGAGCATCGTAGAGAAGAAAATTGC
 CGATATCGTTCGATACAGGTGGTTATGGTGATGTTCGATGCCGAAGGCATATCAAACGAAGCAT
 GGCTTGAACAGGATCTGGACGAAGACGAGGAGGAAGACGAAGAAGTTACCCGCAAACCTGTAC
 GGGGATGATGATTAATTAATAAAACCCGCCCGGGGGTTTTTTTTATCTAGAGCTAGCGGAT
 CCGGCGCGCCGGGCCCTTCTGGGCCTCATGGGCCTTCCGCTCACTGCCCGCTTTCAGCACT
 ATAGGGCGAATTGGCGGAAGCCGTCAAGGCCGCATTTGGGCCCGGCGCGCCGGATCCGCTA
 GCTCTAGACTGGCAGGTTTCTGAGCAGATCGTCCAACCCGATCTGGATCGGGTCAGAAAAAT
 TTGCTCTAATAAATTTTCGTTTTCTAAGTGCAAAGAATCACCATTTTCGAGCTGGTGATTGAAG
 GTTGATGCAAATTTGGAGAAAAATGCAACAAACATTCAATGCGGATATGAATATATCAAAC
 CTTTCATCAAATGTCGATCCTTCAACCACTCTGCCCGTTATTTGTGGTGTTGAAATTACGAC
 CGACCGCGCTGGCCGTTACAACCTTAATGCTCTACACAGAGCGAGCGGACTCGGTGCCATA
 AAGCGCCAGCTCAATGGCTAAGAACGCTGTCAGCTAACAGCTCATCGAAGAGCTTGAAAAA
 GAAACTATGCAGAATTGCATAGTTTCGTTTACAAGCAATGGAAGCAGGATTTCTTTCACGAC
 TCGTATAACCGGCAAAGGTCAGCAGTGGCTGATGAAGCGATTGCTTGATGCTGGTGTGCTGG
 TACCTGTGCGGCAACGCGCTAACAGACGTAGTAAGAACCACCAGCATTTGTAATGCTGGCTA
 AAGTCACTTTCTGAGCTGTATAACGATGAGCGATTTTACTTTTTCTGGCTATGAATTGGCC
 TGCTTTGTAAACACACTCCGGTCTATCCCGTAGCGCCGGGCATATCCTGTGCAATGTGCAAA
 TCTCGCGGCAACAACCAGTGAATACTTCATTCACAAGCCTCACCGCCTGATCGCGGCAGAAA
 CTGGTTATAGCCAATCAACCGTCGTTTCGTGCATTCCGTGAAGCTGTAAACAAAGGAATTCG
 TCTGTAGAGATTGTTATCGGCGATCACCGTGAACGTGCGGCTAACCTGTACCGGTTTACACC
 ATCCTTTTTGGCCTTCGCACAACAAGCCAAAAATGCGCTGATAGAAAGCAAATTAAGATCT
 CTTTCAGCGGCAACCAAGGTTAAAGCTGTTCTCGCTAAGACATTGGCTTTATTTAATTTTTTA
 TCCACACCCCATGTCAAATGATACCCCTCCCTGTCAGGATGACGTGGCAATAAAGAA
 TAAGAAGTCACAAGTTAAAAAAACAAAAAGATCAGTTTCCGGCGGTGCCGGAACAACCAGCC
 TCAAAAAATTGACTTCATGGATCGCTAAGGCAAAGCAAAGGCTGACAATCTGCGGTTATCC
 AAAAAACGCACTCAAAAAATGAGTTCAAGCAGAAAGTAGAGGCGGCTGCGCGGAAATATGC
 TTACCTGAAGAACAAGCGTTCGCCTGATATGGCGGGATATCAAACCTCGATAACCTACCGC
 ATTGATGACGGTAAACGAAGCTCTTAATGCGGTTTTAGCCAAAAATAAAGATAACGAACAA
 TGGGGTATACCGGCAGGATTCAGAGGGTAATGAATTGCTCTAATTATAACCATGCATACTTT
 CAACACCTCTAGTTTGCCATGAGGCAAACCTCATAGGTGTCTGGTAAGAGGACACTGTTGCC
 AAAACTGGACGCCCCATTATTGCAATTAATAAACAACCTAACGGACAATTCTACCTAACATA
 AGTGGCTTAAAAAAACCCGCCCGGCGGGTTTTTTTTATCTAGAGCTAGCGGATCCGGCGCGC
 CGGGCCCTTCTGGGCCTCATGGGCCTTCCGCTCACTGCCCGCTTTCAGCCAGCCTTCGACC
 ACATACCCACCGGCTCCAACCTGCGCGGCTGCGGCCTTGCCCATCAATTTTTTTAATTTTC
 TCTGGGGAAAAGCCTCCGGCCTGCGGCCTGCGGCTTCGCTTGCCGGTTGGACACCAAGTGG

AAGGCGGGTCAAGGCTCGCGCAGCGACCGCGCAGCGGCTTGGCCTTGACGCGCCTGGAACGA
CCCAAGCCTATGCGAGTGGGGGCAGTCGAAGGCGAAGCCCGCCCGCCTGCCCCCGAGACCT
GCAGGGGGGGGGGGGGCGCTGAGGTCTGCCTCGTGAAGAAGGTGTTGCTGACTCATAACCAGGC
CTGAATCGCCCCATCATCCAGCCAGAAAGTGAGGGAGCCACGGTTGATGAGAGCTTTGTTGT
AGGTGGACCAGTTGGTGATTTTGAACTTTTGCTTTGCCACGGAACGGTCTGCGTTGTGCGGA
AGATGCGTGATCTGATCCTTCAACTCAGCAAAAAGTTGATTTATTCAACAAAGCCGCCGTCC
CGTCAAGTCAGCGTAATGCTCTGCCAGTGTTACAACCAATTAACCAATTCTGATTAGAAAAA
CTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTIATTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTT
GAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACCTCACCGAGGCAGTTCATAGGATGGCAAGA
TCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTC
GTCAAAAATAAGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATG
GCAAAAGCTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCA
AAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCATTTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATAC
GCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTG
CCAGCGCATCAACAATATTTTACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTT
TTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGAT
GGTCGGAAGAGGCATAAATTCGGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCAT
TGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAAT
CGATAGATTGTCGCACCTGATTGCCCGACATTATCGCGAGCCATTATACCCATATAAATC
AGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCTCGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCA
TAACACCCCTTGTAATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCATGATGATATATTT
TTATCTTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACACAACGTGGCTTTCCCCCCCCCCT
GCAGGTCCCGAGCCTCACGGCGGCGAGTGCGGGGGTTCCAAGGGGGCAGCGCCACCTTGGGC
AAGGCCGAAGGCCGCGCAGTCGATCAACAAGCCCGGAGGGGCCACTTTTTGCCGGAGGGGG
AGCCGCGCCGAAGGCGTGGGGGAACCCCGCAGGGGTGCCCTTCTTTGGGCACCAAAGAACTA
GATATAGGGCGAAATGCGAAAGACTTAAAAATCAACAACCTAAAAAAGGGGGGTACGCAACA
GCTCATTGCGGCACCCCCGCAATAGCTCATTGCGTAGGTTAAAGAAAATCTGTAATTGACT
GCCACTTTTACGCAACGCATAATTGTTGTGCGCGCTGCCGAAAAGTTGCAGCTGATTGCGCAT
GGTGCCGCAACCGTGCGGCACCCCTACCGCATGGAGATAAGCATGGCCACGCAGTCCAGAGA
AATCGGCATTCAAGCCAAGAACAAGCCCGTCACTGGGTGCAAACGGAACGCAAAGCGCATG
AGGCGTGGGCCGGGCTTATTGCGAGGAAACCCACGGCGGCAATGCTGCTGCATCACCTCGTG
GCGCAGATGGGCCACCAGAACGCCGTGGTGGTCAGCCAGAAGACACTTTCOAAGCTCATCGG
ACGTTCTTTGCGGACGGTCCAATACGCAGTCAAGGACTTGGTGGCCGAGCGCTGGATCTCCG
TCGTGAAGCTCAACGGCCCCGGCACCGTGTGCGCCTACGTGGTCAATGACCGCGTGGCGTGG
GGCCAGCCCCGCGACCAGTTGCGCCTGTGCGTGTTCAGTGCCGCCGTGGTGGTTGATCACGA
CGACCAGGACGAATCGCTGTTGGGGCATGGCGACCTGCGCCGCATCCCGACCTGTATCCGG
GCGAGCAGCAACTACCGACCGGCCCGGGCAGGAGCCGCCAGCCAGCCCGGCATTCCGGGC
ATGGAACCAGACCTGCCAGCCTTGACCGAAACGGAGGAATGGGAACGGCGCGGGCAGCAGCG
CCTGCCGATGCCCGATGAGCCGTGTTTTCTGGACGATGGCGAGCCGTTGGAGCCGCCGACAC

GGGTCACGCTGCCGCGCCGGTAGCACTTGGGTTGCGCAGCAACCCGTAAGTGCCTGTTCCA
 GACTATCGGCTGTAGCCGCCTCGCCGCCCTATACCTTGTCTGCCTCCCCGCGTTGCGTCGCG
 GTGCATGGAGCCGGGCCACCTCGACCTGAATGGAAGCCGGCGGCACCTCGCTAACGGATTCA
 CCGTTTTTATCAGGCTCTGGGAGGCAGAATAAATGATCATATCGTCAATTATTACCTCCACG
 GGGAGAGCCTGAGCAAACCTGGCCTCAGGCATTTGAGAAGCACACGGTCACACTGCTTCCGGT
 AGTCAATAAACCGGTAAACCAGCAATAGACATAAGCGGCTATTTAACGACCCTGCCCTGAAC
 CGACGACCGGGTGAATTTGCTTTTGAATTTCTGCCATTTCATCCGCTTATTATACTTATTCA
 GGCGTAGCACCCAGGCGTTTAAAGGGCACCAATAACTGCCTTAAAAAATTACGCCCCGCCCTG
 CCACTCATCGCACTCGTCAGGTGGCACTTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTT
 TATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTT
 CAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAAGTTTGGAAATATTTGTTTTTCGTATCAACCACC
 AGGTGAAACTCATAAGCTAAGTAATGGATCGCTTTGTTTCGGCTTGGTATCGCCTCAGAAGAG
 TAGGGTTTGATACATATTGGACCTTAGAACATCATTTTACAGAGTTTGGTCTTACGGGAAAT
 TTATTTGTTGCTGCGGCTAACCTGTTAGGAAGAACTAAAAATTAAATGTTGGCACTATGGG
 GGTGTTATTCCGACAGCACACCCAGTTTCGACAGTTAGAAGACGTTTTATTATTAGATCAAA
 TGTTCGAAAGGTCGTTTTAATTTTGAACCGTTTCGAGGGCTATACCATAAAGATTTTCGAGTA
 TTTGGTGTGATATGGAAGAGTCTCGAGCAATTACTCAAAATTTCTACCAGATGATAATGGA
 AAGCTTACAGACAGGAACCATTAGCTCTGATAGTGATTACATTCATTTCTAAGGTTGATG
 TATATCCCAAAGTGTACTCAAAAAATGTACCAACCTGTATGACTGCTGAGTCCGCAAGTACG
 ACAGAATGGCTAGCAATACAAGGGCTACCAATGGTTCTTAGTTGGATTATTGGTACTAATGA
 AAAAAAGCACAGATGGAACCTCTATAATGAAATTGCGACAGAATATGGTCATGATATATCTA
 AAATAGATCATTGTATGACTTATATTTGTTCTGTTGATGATGATGCACAAAAGGCGCAAGAT
 GTTTGTCGGGAGTTTCTGAAAAATTGGTATGACTCATATGTAAATGCGACCAATATCTTTAA
 TGATAGCAATCAAACCTCGTGGTTATGATTATCATAAAGGTCAATGGCGTGATTTTGTTTTAC
 AAGGACATACAAACACCAATCGACGTGTTGATTATAGCAATGGTATTAACCCTGTAGGCACT
 CCTGAGCAGTGTATTGAAATCATTCAACGTGATATTGATGCAACGGGTATTACAAACATTAC
 ATGCGGATTTGAAGCTAATGGAACCTGAAGATGAAATAATTGCTTCCATGCGACGCTTTATGA
 CACAAGTCGCTCCTTTCTTAAAAGAACCCTAAATAAATTACTTATTTGATACTAGAGATAATA
 AGGAACAAGTTATGAAATTTGGATTATTTTTTTCTAAACTTTTCAGAAAGATGGAATAACATCT
 GANGAAACGTTGGATAATATGGTAAAGACTGTCACGTTAATTGATTCAACTAAATATCATTT
 TAATACTGCCTTTGTTAATGAACATCACTTTTCAAAAAATGGTATTGTTGGAGCACCTATTA
 CCGCAGCTGGTTTTTTTATTAGGGTTAACAAATAAATTACATATTGGTTCATTAATCAAGTA
 ATTACCACCCATCACCTGTACGTGTAGCAGAAGAAGCCAGTTTATTAGATCAAATGTCAGA
 GGGACGCTTCATTCTTGGTTTTTAGTACTGCGAAAGTGATTTTCGAAATGGAATTTTTTTAGAC
 GTCATATCTCATCAAGGCAACAACAATTTGAAGCATGCTATGAAATAATTAATGACGCATTA
 ACTACAGGTTATTGTCATCCCCAAAACGACTTTTATGATTTTCCAAAGGTTTCAATTAATCC
 AACTGTTACAGTGAGAATGGACCTAAGCAATATGTATCCGCTACATCAAAGAAGTCGTCA
 TGTGGGCAGCGAAAAAGGCACTGCCTTTAACATTTAAGTGGGAGGATAATTTAGAAACCAA
 GAACGCTATGCAATTTCTATATAATAAACAGCACACAATATGGTATTGATATTTCCGATGT

TGATCATCAATTAAGTGTAAATTGCGAACTTAAATGCTGATAGAAGTACGGCTCAAGAAGAAG
 TGAGAGAATACTTAAAAGACTATATCACTGAACTTACCCTCAAATGGACAGAGATGAAAAA
 ATTAAGTGCATTATTGAAGAGAATGCAGTTGGGTCTCATGATGACTATTATGAATCGACAAA
 ATTAGCAGTGGAAAAACAGGGTCTAAAAATATTTTATTATCCTTTGAATCAATGTCCGATA
 TTAAAGATGTAAAAGATATTATTGATATGTTGAACCAAAAAATCGAAATGAATTTACCATAA
 AGTAGTACTGTTGTAATTCATTAAGCATTCTGCCGACATGGAAGCCATCACAGACGGCATGA
 TGAACCTGAATCGCCAGCGGCATCAGCACCTTGTGCGCCTTGGTATAATATTTGCCCATGGT
 GAAAACGGGGGCGAAGAAGTTGTCCATATTGGCCACGTTTAAATCAAACTGGTGAACTCA
 CCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAAACATATTCTCAATAAACCCCTTTAGGGAAATAGGCCAGG
 TTTTCACCGTAACACGCCACATCTTGCGAATATATGTGTAGAACTGCCGGAAATCGTCTGTG
 GTATTCCTCCAGAGCGATGAAAACGTTTCAGTTTGCTCATGGAAAACGGTGTAACAAGGGT
 GAACACTATCCCATATCACCAGCTCACCCTTTTCATTGCCATACGGAATTCGGGATGAGCA
 TTCATCAGGCGGGCAAGAATGTGAATAAAGGCCGGATAAACTTGTGCTTATTTTTCTTTAC
 GGTCTTTAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACATTGAGCAACTG
 ACTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATCCA
 GTGATTTTTTTCTCCATTTTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAATCTCGATAACTCAAAAATAC
 GCCCGGTAGTGATCTTATTTTATTATGGTGAAAGTTGGAACCTCTTACGTGCCGATCAACGT
 CTCATTTTCGCCAAAAGTTGGCCCAGGGCTTCCCAGTATCAACAGGGACACCAGGATTTATT
 TATTCTGCGAAGTGATCTTCCGTCACAGGTATTTATTTCGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATAC
 GCCTATTTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTT
 CGGGGAAATGTGCGCGCCCGCTTCTGCTGGCGCTGGGCCTGTTTCTGGCGCTGGACTTCC
 CGCTGTTCCGTCAGCAGCTTTTCGCCACGGCCTTGATGATCGCGGCGGCCTTGGCCTGCAT
 ATCCCGATTCAACGGCCCCAGGGCGTCCAGAACGGGCTTCAGGCGCTCCCGAAGGT

SEQ ID NO: 12

5 Secuencia del promotor P_{clpB} de *S. aureus*

GTCTAGTTAATGTGTAACGTAACATTAGCTAGATTTTTTTTATTCAAAAAATATTTACAAAT
 ATTAGGAAATTTAAGTGTAAGAGAGTTGATAAATGATTATATTGGGACTATAATATAATTAA
 GGTC

SEQ ID NO: 13

10 Locus de secuencia genómica de RN10616 que muestra la delección de terS de ϕ 80 α y complementación.

terS=texto en corchetes, Delección=subrayado, Complemento=negrita

15 ATTAGACAACAAACAAGTCATTGAAAATTCCGACTTATTATTCAAAAAGAAATTTGATAGCG
 CAGATATACAAGCTAGGTTAAAAGTAGGCGATAAGGTAGAAGTTAAAACAATCGGTTATAGA

ATACACTTTTTAAATTTATATCCGGTCTTATACGAAGTAAAGAAGGTAGATAAAACAATGATT
 AAACAAATACTAAGACTATTATTCTTACTAGCAATGTATGAGTTAGGTAAGTATGTAACCTGA
 GCAAGTATATATTATGATGACGGCTAATGATGATGTAGAGGTGCCGAGTGACTTCGCGAAGT
 TGAGCGATCAGTCAGATTTGATGAGGGCGGAGGTGACGGAGTAGATGATGTGGTTAGTCATA
 GCAATTATATTACTAGTCATCTTATTGTTTGGTGTGATGTTGCAAGCTGAACAGTTAAAAGG
 CGATGTGAAAGTTAAAGAGCGGGAGATAGAGATATTAAGAAGTAGATTGAGACATTTTGAAG
 ATTAAAAATATTTGTATGGAGGGTATTATGACTAAAAAGAAATATGGATTAAAAATTATCAA
 CAGTTTCGAAAGTTAGAAGATGAGTTGTGTGATTATCCTAATTATCATAAGCAACTCGAAGAT
 TTAAGAAGTAAAATAATGACACCATGGATTCCAACAGATACAAATATAGGCGGGGAGTTTGT
 ACCGTCTAATACATCGAAAACAGAAATGGCAGTAACTAATTATCTTTGTAGTATACGAAGAG
 GTAAAATCCTTGAGTTTAAAGAGCGCTATTGAACGTATAATCAACACATCAAGTAGGAAAGAA
 CGCGAATTCATTCAAGAGTATTATTTTAAATAAAAAGGAATTAGTGAAAGTTTGTGATGACAT
 ACACATTTCTGATAGAACTGCTCATAGAATCAAAGGAAAATCATATCTAGATTGGCGGAAG
 AGTTAGGGGAAGAGTGAAATTGGCAGTAAAGTGGCAGTTTTTTGATACCTAAAAAGAGATATT
 ATGATAGTGTAGGATATTGACTATCTTACTGCGTTTTCCCTTATCGCAATTAGGAATAAAGGA
 TCTATGTGGGTTGGCTGATTATAGCCAATCCTTTTTTAAATTTTAAAAAGCGTATAGCGCGAG
 AGTTGGTGGTAAATGAA

[ATGAACGAAAAACAAAAGAGATTCGCAGATGAATATATAATGAATGGATGTAATGGTAAA
AAAGCAGCAATTTAGCAGGTTATAGTAAGAAAACAGCAGAGTCTTTAGCAAGTCGATTGTT
AAGAAATGTTAATGTTTTCGGAATATATTAAGAACGATTAGAACAGATACAAGAAGAGCGTT
TAATGAGCATTACAGAAGCTTTAGCGTTATCTGCTTCTATTGCTAGAGGAGAACCCTCAAGAG
GCTTACAGTAAGAAATATGACCATTTAAACGATGAAGTGGAAAAAGAGGTTACTTACACAAT
CACACCAACTTTTGAAGAGCGTCAGAGATCTATTGACCACATACTAAAAGTTCATGGTGCCT
ATATCGACAAAAAGAAATTACTCAGAAGAATATTGAGATTAATATTGGTGAGTACGATGAC
GAAAGTTAA]]

ATTAAACTTTAACAACCATCTAATGTTTTCAACAGAAACATATTCCGAAATACTAACCAATT
 ACGATAACTTCACTGAAGTACATTACGGTGGAGGTTTCGAGTGGTAAGTCTCACGGCGTTATA
 CAAAAAGTTGTACTTAAAGCATTGCAAGACTGGAAAATATCCTAGGCGTATACTATGGCTTAG
 AAAAGTCCAATCAACAATTAAGATAGTTTATTTCGAAGATGTCAAAGATTGTTTGATAAACT
 TCGGTATTTGGGACATGTGCCTTTGGAATAAGACTGATAACAAAGTTGAATTGCCAAACGGC
 GCAGTTTTTTTTGTTTAAAGGATTAGATAAACCAGAGAAAATAAAGTCGATAAAAAGGCATATC
 AGACATAGTCATGGAAGAAGCGTCTGAATTCACACTAAATGATTACACGCAATTAACGTTGC
 GTTTGAGGGAGCGTAAACACGTGAATAAGCAAATATTTTTGATGTTTAAACCAGTATCTAAA
 CTGAATTGGGTTTATAAGTATTTCTTTGAACATGGTGAACCAATGGAAAATGTCATGATTAG
 ACAATCTAGTTATCGAGATAATAAGTTTCTTGATGAAATGACACGACAAAACCTTAGAGTTGT
 TAGCAAAATCGTAATCCAGCATATTACAAAATTTATGCGTTAGGTGAATTTTCTACACTAGAC
 AAATTGGTTTTCCCTAAGTATGAAAAACGTTTAAATAAATAAAGATGAGTTAAGACATTTACC
 TTCTTATTTTGGATTGGACTTTGGCTACGTTAATGATCCTAGTGCTTTTATACATTTCTAAAA
 TAGATGTAAAGAAAAAGAAGTTATACATCATTTGAAGAGTATGTTAAACAAGGTATGCTGAAT

ES 2 780 827 T3

GATGAAATAGCTAATGTCATAAAGCAACTTGGTTATGCTAAAGAAGAAATTACAGCAGATAG
TGCAGAACAAAAAGTATAGCTGAATTAAGGAATCTAGGGCTTAAAAGGATTTTACCAACCA
AAAAAGGGAAGGGCTCGGTTGTACAAGGGTTACAATTCTTAATGCAATTTGAAATCATTGTT
GATGAACGTTGTTTCAAGACTATTGAAGAGTTTGACAACTACACATGGCAAAGGACAAAGA
TACAGGTGAATATACCAATGAACCAGTAGATACATACAATCATTGTATCGATTTCGTTGCGTT
ATTCAGTGGAACGATTC

SEQ ID NO: 14

5 Secuencia completa de pGW80A001

GGCGCCATGGTTAAGGGCCCTTTGCGGAAAGAGTTAGTAAGTTAACAGAAGACGAACCAAAA
CTAAATGGTTTAGCAGGAACTTAGATAAAAAAATGAATCCAGAATTATATTCAGAACAGGA
ACAGCAACAAGAACAACAAAAGAATCAAAAACGAGATAGAGGTATGCACTTATAGAACATGC
ATTTATGCCGAGAAAACCTTATTGGTTGGAATGGGCTATGTGTTAGCTAACTTGTAGCGAGT
TGGTTGGACTTGAATTGGGATTAATCCCAAGAAAGTACCAACTCAACAACACATAAAGCCCT
GTAGGTTCCGACCAATAAGGAAATTGGAATAAAGCAATAAAAGGAGTTGAAGAAATGAAATT
CAGAGAAGCCTTTGAGAATTTTATAACAAGTAAGTATGTACTTGGTGTTTTAGTAGTCTTAA
CTGTTTACCAGATAATACAAATGCTTAAATAAAAAAAGACTTGATCTGATTAGACCAAATCT
TTTGATAGTGTTATATTAATAACAAAATAAAAAGGAGTCGCTCACGCCCTACCAAAGTTTGT
GAACGACATCATTCAAAGAAAAAACACTGAGTTGTTTTTATAATCTTGTATATTTAGATAT
TAAACGATATTTAAATATACATCAAGATATATATTTGGGTGAGCGATTACTTAAACGAAATT
GAGATTAAGGAGTCGATTTTTTATGTATAAAAACAATCATGCAAATCATTCAAATCATTTGG
AAAATCACGATTTAGACAATTTTTCTAAAACCGGCTACTCTAATAGCCGGTTGGACGCACAT
ACTGTGTGCATATCTGATCCAAAATTAAGTTTTGATGCAATGACGATCGTTGGAAATCTCAA
CCGAGACAACGCTCAGGCCCTTTCTAAATTTATGAGTGTAGAGCCCCAAATAAGACTTTGGG
ATATTTCTTCAAACAAAGTTTAAAGCTAAAGCACTTCAAGAAAAGTTTATATTGAATATGAC
AAAGTGAAAGCAGATAGTTGGGATAGACGTAATATGCGTATTGAATTTAATCCAAACAACT
TACACGAGATGAAATGATTTGGTTAAAACAAAATATAATAAGCTACATGGAAGATGACGGTT
TTACAAGATTAGATTTAGCCTTTGATTTTGAAGATGATTTGAGTGACTACTATGCAATGTCT
GATAAAGCAGTTAAGAAAACCTATTTTTTATGGTCGTAATGGTAAGCCAGAAACAAAATATTT
TGGCGTGAGAGATAGTAATAGATTTATTAGAATTTATAATAAAAAGCAAGAACGTAAAGATA
ATGCAGATGCTGAAGTTATGTCTGAACATTTATGGCGTGTAGAAATCGAACTTAAAAGAGAT
ATGGTGGATTACTGGAATGATTGCTTTAGTGATTTACATATCTTGCAACCAGATTGGAAAAC
TATCCAACGCACTGCGGATAGAGCAATAGTTTTTATGTTATTGAGTGATGAAGAAGAATGGG
GAAAGCTTCACAGAAATTCAGAACAAAATATAAGAATTTGATAAAAAGAAATTCGCCAGTC
GATTTAACGGACTTAATGAAATCGACTTTAAAAGCGAACGAAAAACAATTGCAAAAACAAAT
CGATTTTTGGCAACATGAATTTAAATTTTGGAAATAGTGTACATATTAATATTTACTGAACAA
AAATGATATATTTAAACTATTCTAATTTAGGAGGATTTTTTTTATGAAGTGTCTATTTAAAAA

TTTGGGGAATTTATATGAGGTGAAAGAATAATTTACCCCTATAAACTTTAGCCACCTCAAGT
 AAAGAGGTAAAATTGTTTAGTTTATATAAAAAATTTAAAGGTTTGTTTTATAGCGTTTTATT
 TTGGCTTTGTATTCCTTTCATTTTTTAGTGTATTAAATGAAATGGTTTTAAATGTTTTCTTAC
 CTGATATTGCAAATCATTTTAATACTACTCCTGGAATTACAACTGGGTAAACACTGCATAT
 ATGTTAACTTTTTTCGATAGGAACAGCAGTATATGGAAAATTTATCTGATTATATAAATATAAA
 AAAATTGTTAATTATTGCTATTAGTTTTGAGCTGTCTTGGTTCATTGATTGCTTTTTATTGGGC
 CCACCTAGGCAAATATGCTCTTACGTGCTATTATTTAAGTGACTATTTAAAAGGAGTTAATA
 AATATGCGGCAAGGTATTCTTAAATAAACTGTCAATTTGATAGCGGGAACAAATAATTAGAT
 GTCCTTTTTTAGGAGGGCTTAGTTTTTTGTACCCAGTTTAAGAATACC'TTTATCATGTGATT
 CTAAAGTATCCAGAGAATATCTGTATGCTTTGTATACCTATGGTTATGCATAAAAATCCCAG
 TGATAAAAGTATTTATCACTGGGATTTTTATGCCCTTTTGGGTTTTTGAATGGAGGAAAATC
 ACATGAAAATTATTAATATTGGAGTTTTAGCTCATGTTGATGCAGGAAAAACTACCTTAACA
 GAAAGCTTATTATATAACAGTGGAGCGATTACAGAATTAGGAAGCGTGGACAAAGGTACAAC
 GAGGACGGATAAATACGCTTTTAGAACGTGAGAGGAATTACAATTCAGACAGGAATAACCT
 CTTTTCAGTGGGAAAATACGAAGGTGAACATCATAGACACGCCAGGACATATGGATTTCTTA
 GCAGAAGTATATCGTTTATTATCAGTTTTTAGATGGGGCAATTTCTACTGATTTCTGCAAAAGA
 TGGCGTACAAGCACAACTCGTATATTATTTTATGCACCTTAGGAAAATGGGGATTCCCACAA
 TCTTTTTTATCAATAAGATTGACCAAATGGAATTGATTTTATCAACGGTTTTATCAGGATATT
 AAAGAGAACTTTCTGCCGAAATTGTAATCAAACAGAAGGTAGAAGTGTATCCCTAATATGTG
 TGTGACGAACTTTACCGAATCTGAACAATGGGATACGGTAATAGAGGGAAACGATAACCTTT
 TAGAGAAATATATGTCCGGTAAATCATTAGAAGCATTTGGAAC'TCGAACAAAGAGGAAAGCATA
 AGATTTCAGAATTGTTCTCTGTTCCCTCTTTATCATGGAAGTGCAAAAGTAATATAGGGAT
 TGATAACCTTATAGAAGTTATTACTAATAAATTTTATTTCATCAACACATCGAGGTCCGTCTG
 AACTTTGCCGAAATGTTTTCAAATTTGAATATACAAAAAAGACAACGTCTTGATATATA
 CGCCTTTATAGTGGAGTACTACATTTACGAGATTCGGTTAGAGTATCAGAAAAAGAAAAAAT
 AAAAGTTACAGAAATGTATACTTCAATAAATGGTGAATTAATGTAAGATTGATAGAGCTTATT
 CTGGAGAAATTGTTATTTTTGCAAAATGAGTTTTTTGAAGTTAAATAGTGTCTTGGAGATACA
 AAATCTATTGCCACAGAGAAAAAGATTGAAAATCCGCACCCTCTACTACAAACAACTGTTGA
 ACCGAGTAAACCTGAACAGAGAGAAATGTIGCTTGATGCCCTTTTGGAAATCTCAGATAGTG
 ATCCGCTTCTACGATATTACGTGGATTCTACGACACATGAAATTATACTTTCTTTCTTAGGG
 AAAGTACAAATGGAAGTGATTAGTGCACTGTTGCAAGAAAAGTATCATGTGGAGATAGAACT
 AAAAGAGCCTACAGTCATTTATATGGAGAGACCGTTAAAAAATGCAGAATATACCATTCA
 TCGAAGTGCCGCCAAATCCTTTCTGGGCTTCCATTGGTTTTATCTGTATCGCCGCTTCCGTTG
 GGAAGTGAATGCAGTATGAGAGCTCGGTTTCTCTTGGATACTTAAATCAATCATTTCAAAA
 TGCAGTTATGGAAGGGGTACGCTATGGTTGCGAACAAAGGATTATATGGTTGGAATGTGACGG
 ATTGTAAAATCTGTTTTAAGTACGGTTTTATACTATAGCCCTGTTAGTACTCCAGCAGATTTT
 CGGATGCTTACTCCTATTGTACTGGAGCAAGCCTTTAGAAAAGCTGGAACAGAATTGTTAGA
 GCCATATCTTAGTTTTAAAGTTTATGCACCACAGGAATATCTTTACGGGCATATAACGATG
 CTCCCAAATATTGTGCAAATATCGTAAATACTCAACTGAAAAATAATGAGGTCATTATTATT

GGAGAAATTCCTGCTCGATGTATTCAAGATTATCGCAATGATTTAACTTTTTTTTACAAATGG
GCTTAGTGTTTTGTTTTAGCAGAGCTAAAAGGATATCAGGTTACCACTGGCGAACCTGTTTGCC
AGACCCGTCGTCTAAATAGTCGGATAGATAAAGTAAGATATATGTTCAATAAAAATAACTTAG
TGCGTTTTATGTTGTTATATAAATATGGTTTCTTATTAAATAAGATGAAATATTCTTTAATA
TAGATTTGAATTAAGTGAAAGGAGGAGATTGTTATTATAAACTACAAGTGGATATTGTGT
CCTAGTTGTGGAAATAAAACAAGACTACGAATACGAGTGGATACTATACTTAAAAATTTCCC
TTTATACAGCCCCAAATGTAAGAACGAACTTTAATTAATGTTCAAAAAATGAATATAATAA
CAATCAAAGAGCCAGACGCCAAGACGCAGAGCCGATAATTTGAGAAATGAACTCTCATCTT
ATCGGCTCTTTTTGTTTTATCTGAATTTTACTGACTAGCCTTCAATATTTCCGCGGCCAGCTT
ACTATGCCATTATTAAGCTTGTAATATCGGAGGGTTTATTAATTGGCAGTAAAGTGGCAGTT
TTTGATACCTTAAATGAGATATTATGATAGTGTAGGATATTGACTATCGTACTGCGTTTCCC
TACCGCAAATTAGGAATAAAGGATCTATGTGGGTTGGCTGATTATAGCCAATCCTTTTTTAA
TTTTAAAAAGCGTATAGCGCGAGAGTTGGTGGTAAATGAAATGAACGAAAAACAAAAGAGAT
TCGCAGATGAATATATAATGAATGGATGTAATGGTAAAAAAGCAGCAATTACAGTAGGTTAT
AGTAAGAAAACAGCAGAGTCTTTAGCAAGTCGATTGTTAAGAAATGTTAATGTTTCGGAATA
TATTAAGAACGATTAGAACAGGTACAAGAAGAGCGTTTAAATGAGTATTACAGAAGCTTTAG
CGTTATCTGCTTCTATTGCTAGAGGAGAACCTCAAGAGGCTTACAGTAAGAAATATGACCAT
TTAAACGATGAAGTGGAAAAAGAGGTTACTTACACAATCACACCAACTTTTTGAAGAGCGTCA
GAGATCTATTGACCACATACTAAAAGTACATGGTGCATATATCGATAAAAAAGAAATTACTC
AGAAGAATATTGAGATTAATATTGGTGAGTACGATGACGAAAGTTAAATTGAACTTTAACAA
ACCGTCTAATGTTTTCAATAGCCGCGGGGGCCCAACACACCAACTTTTTGAAGAGCGTCAGAG
ATCTATTGACCACATACTAAAAGTACATGGTGCATATATCGATAAAAAAGAAATTACTCAGA
AGAATATTGAGATTAATATTGGTGAGTACGATGACGAAAGTTAAATTAACTTTAACAAACC
GTCTAATGTTTTCAATAGCCGCGGGGGCCCAACGAGCGGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGA
CACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAG
ACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAAC
GCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATG
GTTTTCTTAGACGTGAGGTGGCACTTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATT
TTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAAT
AATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCCCTTATTCCCTTTTTT
GCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGA
AGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTG
AGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGC
GCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCA
GAATGACTTGGTTGAGTACTCACCGGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAA
GAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACA
ACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCG
CCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGA
TGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCT

TCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTC
 GGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCG
 GTATCATTCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACG
 GGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGAT
 TAAGCATTTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTC
 ATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCT
 TAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTG
 AGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGG
 TGGTTTTTTTCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGA
 GCGCAGATACCAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTC
 TGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCG
 ATAAGTCGTGCTTACC GGTTGGACTCAAGACGATAGTTACC GGATAAGGCGCAGCGGTGCG
 GGCTGAACGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGAGCGAACGACCTACACCGAACCTGA
 GATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGG
 TATCCGGTAAGCGGCAGGGTTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGC
 CTGGTATCTTTATAGTCTTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGAT
 GCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTG
 GCCTTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCCTGCGTTATCCCCTGATTCGTGGATAA
 CCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGGCGGGTCTAGTTAATGTGTAACGTAACATTAGCTAG
 ATTTTTTTATTCAAAAAATATTTACAAATATTAGGAAATTTAAGTGTAAGAGTTGATAA
 ATGATTATATTGGGACTATAATATAATTAAGGTGCGATTGAAATTCGTTAACTAATTAATCACC
 AAAAAGGAATAGAGTATGAAGTTTGAAAATTTTGTTTTTTCGTATCAACCACCAGGTGAAAC
 TCATAAGCAAGTAATGGATCGCTTTGTTTCGGCTTGGTATCGCCTCAGAAGAGGTAGGGTTTG
 ATACATATTGGACCTTAGAACATCATTTTACAGAGTTTGGTCTTACGGGAAATTTATTTGTT
 GCTGCGGCTAACCTGTTAGGAAGAACTAAAACATTAATGTGTCGACTATGGGGGTTGTTAT
 TCCGACAGCACACCAGTTCGACAGTTAGAAGACGTTTTTATTATTAGATCAAATGTCGAAAG
 GTCGTTTTTAATTTTGGAACCGTTCGAGGGCTATACCATAAAGATTTTCGAGTATTTGCTGTT
 GATATGGAAGAGTCTCGAGCAATTACTCAAAATTTCTACCAGATGATAATGGAAAGCTTACA
 GACAGGAACCATTAGCTCTGATAGTGATTACATTC AATTTCC TAAGGTTGATGTATATCCCA
 AAGTGTACTCAAAAAATGTACCAACCTGTATGACTGCTGAGTCCGCAAGTACGACAGAATGG
 CTAGCAATACAAGGGCTACCAATGGTTCTTAGTTGGATTATTGGTACTAATGAAAAAAAAGC
 ACAGATGGAACCTCTATAATGAAATTGCGACAGAATATGGTCATGATATATCTAAAATAGATC
 ATTGTATGACTTATATTTGTTCTGTTGATGATGATGCACAAAAGGCGCAAGATGTTTGTCCG
 GAGTTTCTGAAAAATTGGTATGACTCATATGTAAATGCGACCAATATCTTTAATGATAGCAA
 TCAAACCTCGTGGTTATGATTATCATAAAGGTCAATGGCGTGATTTTGTTTTACAAGGACATA
 CAAACACCAATCGACGTGTTGATTATAGCAATGGTATTAACCCCGTAGGCACTCCTGAGCAG
 TGTATTGAAATCATTCAACGTGATATTGATGCAACGGGTATTACAAACATTACATGCGGATT
 TGAAGCTAATGGAAGTGAAGATGAAATAATTGCTTCCATGCGACGCTTTATGACACAAGTCCG
 CTCCTTTCTTAAAAGAACC TAAATAAATTACTTATTTGATACTAGAGATAATAAGGAACAAG

ES 2 780 827 T3

TTATGAAATTTGGATTATTTTTCTAAACTTTTCAGAAAGATGGAATAACATCTGAAGAAACG
TTGGATAATATGGTAAAGACTGTCACGTTAATTGATTCAACTAAATATCATTTTAATACTGC
CTTTGTTAATGAACATCACTTTTCAAAAAATGGTATTGTTGGAGCACCTATTACCGCAGCTG
GTTTTTTATTAGGGTTAACAAATAAATTACATATTGGTTCATTAAATCAAGTAATTACCACC
CATCACCCCTGTACGTGTAGCAGAAGAAGCCAGTTTATTAGATCAAATGTCAGAGGGACGCTT
CATTCTTGGTTTTAGTGACTGCGAAAGTGATTTCGAAATGGAATTTTTTAGACGTCATATCT
CATCAAGGCAACAACAATTTGAAGCATGCTATGAAATAATTAATGACGCATTAACTACAGGT
TATTGCCATCCCCAAAACGACTTTTATGATTTTCCAAAGGTTTCAATTAATCCCACTGTTA
CAGTGAGAATGGACCTAAGCAATATGTATCCGCTACATCAAAGAAGTTCGTCATGTGGGCAG
CGAAAAAGGCACTGCCTTTAACGTTTAAAGTGGGAGGATAATTTAGAAACCAAAGAACGCTAT
GCAATTCTATATAATAAAACAGCACACAATATGGTATTGATATTTCCGATGTTGATCATCA
ATTAAGTGAATGCGAACTTAAATGCTGATAGAAGTACGGCTCAAGAAGAAGTGAGAGAAT
ACTTAAAAGACTATATCACTGAACTTACCCTCAAATGGACAGAGATGAAAAAATTAAGTGC
ATTATTGAAGAGAATGCAGTTGGGTCTCATGATGACTATTATGAATCGACAAAATTAGCAGT
GGAAAAACAGGGTCTAAAAATATTTTATTATCCTTTGAATCAATGTCCGATATTAAAGATG
TAAAAGATATTATTGATATGTTGAACCAAAAAATCGAAATGAATTTACCATAATAAAATTA
AGGCAATTTCTATATTAGATTGCCTTTTTTGGCGCGCCTATTCTAATGCATAATAAATACTGA
TAACATCTTATATTTTGTATTATATTTTGTATTATCGTTGACATGTATAATTTTGATATCAA
AACTGATTTTCCCTCTATTATTTTCGAGATTTATTTTCTTAATTCTCTTTAACAACTAGA
AATATTGTATATACAAAAATTATAAATAATAGATGAATAGTTTAATTATAGGTGTTTCATCA
ATCGAAAAAGCAACGTATCTTATTTAAAGTGCGTTGCTTTTTTCTCATTTATAAGGTTAAAT
AATTCTCATATATCAAGCAAAGTGACA

SEQ ID NO: 15 (secuencia de ADN de locus del gen *mecA* (de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* SA40, genoma completo GenBank: CP003604.1))

TATACTACAAATGTAGTCTTATATAAGGAGGATATTGATGAAAAAGATAAAAAATTGTTCCAC
 TTATTTTAAATAGTTGTAGTTGTCTGGGTTTGGTATATATTTTTTATGCTTCAAAAGATAAAGAA
 ATTAATAATACTATTGATGCAATTGAAGATAAAAAATTTCAAACAAGTTTATAAAGATAGCAG
 TTATATTTCTAAAAGCGATAATGGTGAAGTAGAAATGACTGAACGTCCGATAAAAAATATATA
 ATAGTTTAGGCGTTAAAGATATAAACATTCAGGATCGTAAAATAAAAAAAGTATCTAAAAAT
 AAAAAACGAGTAGATGCTCAATATAAAATTTAAAACAAACTACGGTAACATTGATCGCAACGT
 TCAATTTAATTTTGTAAAGAAGATGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGATCATAGCGTCATTA
 TTCCAGGAATGCAGAAAGACCAAAGCATACATATTGAAAATTTAAAATCAGAACGTGGTAAA
 ATTTTAGACCGAAACAATGTGGAATTGGCCAATACAGGAACAGCATATGAGATAGGCATCGT
 TCCAAAGAATGTATCTAAAAAAGATTATAAAGCAATCGCTAAAGAACTAAGTATTTCTGAAG
 ACTATATCAAACAACAAATGGATCAAAATTTGGGTACAAGATGATACCTTCGTTCCACTTAAA
 ACCGTTAAAAAATGGATGAATATTTAAGTGATTTTCGCAAAAAAATTTTCATCTTACAACATA
 TGAAACAGAAAGTCGTAACCTATCCTCTAGAAAAAGCGACTTCACATCTATTAGGTTATGTTG
 GTCCCATTAACCTCTGAAGAATTTAAAACAAAAAGAATATAAAGGCTATAAAGATGATGCAGTT
 ATTGGTAAAAAGGGACTCGAAAACTTTACGATAAAAAGCTCCAACATGAAGATGGCTATCG
 TGTCACAATCGTTGACGATAATAGCAATACAATCGCACATACATTAATAGAGAAAAAGAAAA
 AAGATGGCAAAGATATTCAACTAACTATTGATGCTAAAGTTCAAAGAGTATTTATAACAAC
 ATGAAAAATGATTATGGCTCAGGTAAGTCTATCCACCCTCAAACAGGTGAATTATTAGCACT
 TGTAAGCACACCTTCATATGACGTCTATCCATTTATGTATGGCATGAGTAACGAAGAATATA
 ATAAATTAACCGAAGATAAAAAAGAACCTCTGCTCAACAAGTTCCAGATTACAACCTCACCA
 GGTTCAACTCAAAAAATATTAACAGCAATGATTGGGTTAAATAACAAAACATTAGACGATAA
 AACAAAGTTATAAAATCGATGGTAAAGGTTGGCAAAAAGATAAATCTTGGGGTGGTTACAACG
 TTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAAATATCGACTTAAAACAAGCAATAGAATCATCAGAT
 AACATTTTCTTTGCTAGAGTAGCACTCGAATTAGGCAGTAAGAAATTTGAAAAAGGCATGAA
 AAAACTAGGTGTTGGTGAAGATATACCAAGTGATTATCCATTTTATAATGCTCAAATTTCAA
 AAAAAATTTAGATAATGAAATATTATTAGCTGATTACAGGTTACGGACAAGGTGAAATACTG
 ATTAACCCAGTACAGATCCTTTCAATCTATAGCGCATTAGAAAATAATGGCAATATTAACGC
 ACCTCACTTATTTAAAAGACACGAAAAACAAAGTTTGGAAAGAAAAATATTTTCCAAAGAAA
 ATATCAATCTATTAACCTGATGGTATGCAACAAGTCGTAAATAAAAACACATAAAGAAGATATT
 TATAGATCTTATGCAAACCTTAATTGGCAAATCCGGTACTGCAGAACTCAAATGAAACAAGG
 AGAACTGGCAGACAAATTTGGGTGGTTTATATCATATGATAAAGATAATCCAAACATGATGA
 TGGCTATTAATGTTAAAGATGTACAAGATAAAGGAATGGCTAGCTACAATGCCAAAATCTCA
 GGTAAAGTGTATGATGAGCTATATGAGAACGGTAATAAAAAATACGATATAGATGAATAACA
 AAACAGTGAAGCAATCCGTAACGATGGTTGCTTCACTGTTTT

SEQ ID NO: 16 (secuencia de transcrito de *mecA*)

UAGUCUUAUAUAAGGAGGAUAUUGAUGAAAAAGAUAAAAUUGUCCACUUAUUUUAAUAGU
 UGUAGUUGUCGGGUUUGGUUAUAUUUUUAUGCUUCAAAAGAUAAAGAAAUAUAUAUACUA
 UUGAUGCAAUUGAAGAUAAAAUUUCAACAAGUUUAUAAAGAUAGCAGUUUAUUUCUAAA
 AGCGAUAAUGGUGAAGUAGAAAUGACUGAACGUCCGAUAAAAUAUAUAUAGUUUAGGCGU
 UAAAGAUUAACAUAUCAGGAUCGUAAAAUAAAAAAGUAUCUAAAAUAAAAACGAGUAG
 AUGCUCAAUAUAAAAUAAAACAAACUACGGUAACAUAUGAUCGCAACGUUCAUUUAAUUUU
 GUUAAAGAAGAUUGUAUGUGGAAGUUAGAUUGGGAUCAUAGCGUCAUUAUCCAGGAAUGCA
 GAAAGACCAAAGCAUACAUAUUGAAAAUUAAAAUCAGAACGUGGUAAAAUUUAGACCGAA
 ACAUUGUGGAAUUGGCCAAUACAGGAACAGCAUAUGAGAUAGGCAUCGUUCCAAAGAAUGUA
 UCUAAAAAGAUUAUAAAGCAAUCGCUAAAGAACUAAGUAUUUCUGAAGACUAUAUCAACA
 ACAAAUGGAUCAAAAUUGGGUACAAGAUGAUACCUUCGUUCCACUAAAAACCGUAAAAAAA
 UGGAUGAAUAUUUAAGUGAUUUUCGCAAAAAAUUUCAUUCUACAACUAAUGAAACAGAAAGU
 CGUAACUAUCCUCUAGAAAAAGCGACUUCACAUCUAUUAGGUUAUGUUGGUCCCAUAUAACUC
 UGAAGAAUUAAAACAAAAAGAAUAUAAAGGCUAUAAGAUGAUGCAGUUUAUUGGUAAAAAGG
 GACUCGAAAAACUUUACGAUAAAAGCUCCAACAUGAAGAUGGCUAUCGUGUCACAAUCGUU
 GACGAUAAUAGCAAUACAUCGCACAUAUAUAAUAGAGAAAAAGAAAAAGAUGGCAAAGA
 UAUUCAACUAACUAUUGAUGCUAAAGUUCAAAAGAGUAUUUAUAACAACAUGAAAAAUGAUU
 AUGGCUCAGGUACUGCUAUCCACCCUCAAAACAGGUGAAUUUAUAGCACUUGUAAGCACACCU
 UCAUAUGACGUCUAUCCAUUUAUGUAUGGCAUGAGUAACGAAGAAUAUAAUAAAUUAACCGA
 AGAUAAAAAGAACCUCUGCUCAACAAGUUCAGAUUAACAACUUCACCAGGUUCAACUCAA
 AAUAUUAACAGCAAUGAUUGGGUUAAAUAACAAAACAUAUAGACGAUAAAACAAGUUAUAAA
 AUCCAUGGUAAAGGUUGGCAAAAAGAUAAAUUCUUGGGGUGGUUACAACGUUACAAGAUUGA
 AGUGGUAAAUGGUAAUAUCGACUAAAAACAAGCAAUAGAAUCAUCAGAUACAUUUUCUUUG
 CUAGAGUAGCACUCGAAUJAGGCAGUAAGAAAUUUGAAAAAGGCAUGAAAAACUAGGUGUU
 GGUGAAGAUUAACCAAGUGAUUAUCCAUUUUAUAAUGCUCAAUUUCAAAACAAAAUUAGA
 UAAUGAAUAUUUAUAGCUGAUUCAGGUUACGGACAAGGUGAAAUAUGAUUAACCCAGUAC
 AGAUCCUUUCAUUCUAUAGCGCAUUAAGAAAUAUUGGCAAUAUUAACGCACCUCACUUAUUA
 AAAGACACGAAAAACAAAGUUUGGAAGAAAAUAUUUUUCCAAAGAAAAUAUCAUUCUAUU
 AACUGAUGGUUAGCAACAAGUCGUAAAUAAAAACAUAAGAAGAUUUUAUAGAUUUUAUG
 CAAACUUAUUUGGCAAUCCGGUACUGCAGAACUCAAUUGAAACAAGGAGAAACUGGCAGA
 CAAUUGGGUGGUUUUAUCAUAUGAUAAGAUAAUCCAAAACAUGAUGAUGGCUAUUAUUGU
 UAAAGAUGUACAAGAUAAAGGAAUGGCUAGCUACAUGCCAAAUCUCAGGUAAAGUGUAUG
 AUGAGCUUAUAGAGAACGGUAAUAAAAAUACGAUAUAGAUGAAUAACAAAACAGUGAAGCA
 AUCCGUAAACGAUGGUUGCUUCACUGUUUU

SEQ ID NO: 17 (secuencia de ADN de locus del gen *luxAB* (de los genes de *Vibrio fischeri luxA* y *luxB* para las subunidades alfa y beta de luciferasa, GenBank: X06758.1))

ES 2 780 827 T3

GGCTTAAATAAACAGAATCACCAAAAAGGAATAGAGTATGAAGTTTGGAAATATTTGTTTTT
CGTATCAACCACCAGGTGAAACTCATAAGCTAAGTAATGGATCGCTTTGTTTCGGCTTGGTAT
CGCCTCAGAAGAGTAGGGTTTGATACATATTGGACCTTAGAACATCATTTTACAGAGTTTGG
TCTTACGGGAAATTTATTTGTTGCTGCGGCTAACCTGTTAGGAAGAACTAAAACATTAATG
TTGGCACTATGGGGGTTGTTATTCCGACAGCACACCCAGTTCGACAGTTAGAAGACGTTTTA
TTATTAGATCAAATGTCGAAAGGTCGTTTTAATTTTGGAACCGTTCGAGGGCTATAACCATAA
AGATTTTCGAGTATTTGGTGTGATATGGAAGAGTCTCGAGCAATTACTCAAATTTCTACC
AGATGATAATGGAAAGCTTACAGACAGGAACCATTAGCTCTGATAGTGATTACATTCAATTT
CCTAAGGTTGATGTATATCCCAAAGTGTACTCAAAAATGTACCAACCTGTATGACTGCTGA
GTCCGCAAGTACGACAGAATGGCTAGCAATACAAGGGCTACCAATGGTTCTTAGTTGGATTA
TTGGTACTAATGAAAAAAAAGCACAGATGGAACCTCTATAATGAAATTGCGACAGAATATGGT
CATGATATATCTAAAATAGATCATTTGTATGACTTATATTTGTTCTGTTGATGATGATGCACA
AAAGGCGCAAGATGTTTTGTCGGGAGTTTCTGAAAAATTGGTATGACTCATATGTAAATGCCA
CCAATATCTTTAATGATAGCAATCAAACCTCGTGGTTATGATTATCATAAAGGTCAATGGCGT
GATTTTGTTTTACAAGGACATACAAACACCAATCGACGTGTTGATTATAGCAATGGTATTA
CCCTGTAGGCACTCCTGAGCAGTGTATTGAAATCATTCAACGTGATATTGATGCAACGGGTA
TTACAAACATTACATGCGGATTTGAAGCTAATGGAACCTGAAGATGAAATAAATTGCTTCCATG
CGACGCTTTATGACACAAGTCGCTCCTTTCTTAAAAGAACCCTAAATAAATTACTTATTTGAT
ACTAGAGATAATAAGGAACAAGTTATGAAATTTGGATTATTTTTTTCTAAACTTTCAGAAAGA
TGGAATAACATCTGANGAAACGTTGGATAATATGGTAAAGACTGTCACGTTAATTGATTCAA
CTAAATATCATTTAATACTGCCTTTGTTAATGAACATCACTTTTCAAAAAATGGTATTGTT
GGAGCACCTATTACCGCAGCTGGTTTTTTTATTAGGGTTAACAAATAAATTACATATTGGTTC
ATTAAATCAAGTAATTACCACCCATCACCTGTACGTGTAGCAGAAGAAGCCAGTTTATTAG
ATCAAATGTCAGAGGGACGCTTCATTCTTGTTTTTAGTGACTGCGAAAGTGATTTCGAAATG
GAATTTTTTAGACGTCATATCTCATCAAGGCAACAACAATTTGAAGCATGCTATGAAATAAT
TAATGACGCATTAACTACAGGTTATTGTCATCCCCAAAACGACTTTTATGATTTTCCAAAGG
TTTCAATTAATCCCACTGTTACAGTGAGAATGGACCTAAGCAATATGTATCCGCTACATCA
AAAGAAGTCGTCATGTGGGCAGCGAAAAAGGCACTGCCTTTAACATTTAAGTGGGAGGATAA
TTTAGAAACCAAAGAACGCTATGCAATTTCTATAATAAAAACAGCACAACAATATGGTATTG
ATATTTTCGGATGTTGATCATCAATTAACTGTAATTGCGAACTTAAATGCTGATAGAAGTACG
GCTCAAGAAGAAGTGAGAGAATACTTAAAAGACTATATCACTGAAACTTACCCTCAAATGGA
CAGAGATGAAAAAATTAAGTGCATTTATTGAAGAGAATGCAGTTGGGTCTCATGATGACTATT
ATGAATCGACAAAATTAGCAGTGAAAAAACAGGGTCTAAAAATATTTTATTATCCTTTGAA
TCAATGTCCGATATTAAAGATGTAAAAGATATTATTGATATGTTGAACCAAAAAATCGAAAT
GAATTTACCATAATAAAATTAAGGCAATTTCTATATTAGATTGCCTTTTTTAAATTTT

SEQ ID NO: 18 (secuencia de transcrito de *luxAB*)

AAUCACCAAAAAGGAAUAGAGUAUGAAGUUUGGAAAUAUUUGUUUUUCGUAUCAACCACCAG
GUGAAACUCAUAAGCUAAGUAAUGGAUCGCUUUGUUCGGCUUGGUAUCGCCUCAGAAGAGUA
GGGUUUGAUACAUAUUGGACCUUAGAACAUCAUUUACAGAGUUUGGUCUACGGGAAAUUU
AUUUGUUGCUGCGGCUAACCGUUGAGGAAGAACAUAUAAAUGUUGGCACUAUGGGGG
UUGUUAUUCCGACAGCACACCCAGUUCGACAGUUAGAAGACGUUUUAUUUAUAGAUCAAAUG
UCGAAAGGUCGUUUUAAUUUUGGAACCGUUCGAGGGCUAUACCAUAAAGAUUUUCGAGUAUU
UGGUGUUGAUUAUGGAAGAGUCUCGAGCAAUACUCAAAAUUUCUACCAGAUGAUAAUGGAAA
GCUUACAGACAGGAACCAUAGCUCUGAUAGUGAUUACAUAUCAAUUUCCUAAGGUUGAUGUA
UAUCCCAAAGUGUACUCAAAAAAUGUACCAACCUGUAUGACUGCUGAGUCCGCAAGUACGAC
AGAAUGGCUAGCAAUACAAGGGCUACCAAUGGUUCUUAGUUGGAUUUUGGUACUAAUGAAA
AAAAAGCACAGAUGGAACUCUAUAAUGAAAUUGCGACAGAAUAUGGUCAUGAUUAUUCUAAA
AUAGAUCAUUGUAUGACUUAUAUUGUUCUGUUGAUGAUGACACAAAAGGCGCAAGAUGU
UUGUCGGGAGUUUCUGAAAAAUUGGUAUGACUCAUAUGUAAAUGCGACCAAUAUCUUUAAUG
AUAGCAAUCAAAUCUGUGGUUAUGAUUAUCAUAAAGGUCAAUGGCGUGAUUUUGUUUACAA
GGACAUACAAACACCAAUCGACGUGUUGAUUAUAGCAAUGGUAUUAACCCUGUAGGCACUCC
UGAGCAGUGUAUUGAAAUCAUUAACGUGAUUAUGAUGCAACGGGUUAUUACAAACAUAUCAU
GCGGAUUUGAAGCUAAUGGAACUGAAGAUGAAAUAUUGCUUCCAUGCGACGCUUUUUGACA
CAAGUCGCUCUUUCUUAAAAGAACCUAUUAUUAUUAUUUUUGAUACUAGAGAUAAUAAG
GAACAAGUUAUGAAAUUUGGAUUUAUUUUUUCUAAACUUUCAGAAAAGAUUGGAUUAACAUCUGA
AGAAACGUUGGAUAAUAUGGUAAAAGACUGUCACGUUAAUUGAUUCAACUAAAUAUCAUUUA
AUACUGCCUUUGUUAUUGAACAUCAUUUUCAAAAAUGGUUUUGUUGGAGCACCUAUUACC
GCAGCUGGUUUUUUAUUAGGGUUAACAAAUAUUACAUAUUGGUUCAUUAUUCAAGUAAU
UACCACCAUCACCCUGUACGUGUAGCAGAAGAAGCCAGUUUAUAGAUCAAAUGUCAGAGG
GACGCUUCAUUCUUGGUUUUAGUGACUGCGAAAGUGAUUUCGAAAUGGAAUUUUUAGACGU
CAUAUCUCAUCAAAGGCAACAACAAUUUGAAGCAUGCUAUGAAAUAUUAUUGACGCAUUAAC
UACAGGUUAUUGUCAUCCCAAACGACUUUUAUGAUUUUCCAAGGUUUCAAUUAUCCAC
ACUGUUACAGUGAGAAUGGACCUAAGCAAUAUGUAUCCGCUACAUCAAAAGAAGUCGUCAUG
UGGGCAGCGAAAAGGCACUGCCUUUAACAUUUAAGUGGGAGGAUAAUUUAGAAACCAAAGA
ACGCUAUGCAAUUCUAUUAUAAUAAAACAGCAACAACAAUAUGGUUAUGAUUUUCGGAUGUUG
AUCAUCAUUUAACUGUAAUUGCGAACUUAAAUGCUGAUAGAAGUACGGCUCAGAAGAAGUG
AGAGAAUACUUAAAAGACUUAUACACUGAAACUUACCUCAAAUGGACAGAGAUGAAAAAAU
UAACUGCAUUAUUGAAGAGAAUGCAGUUGGGUCUCAUGAUGACUAUUAUGAAUCGACAAAAU
UAGCAGUGGAAAAAACAGGGUCUAAAAAUUUUUAUUAUCCUUUGAAUCAUUGUCCGAUAAU
AAAGAUGUAAAAGAUUAUUAUGAUUAUGUUGAACCAAAAAAUCGAAAUGAAUUUACCAUAAUA
AAAUUAAGGCAAUUUCUAUUAUAGAUUGCCUUUU

5 SEQ ID NO: 19 (secuencia de transcrito de *luxAB* reprimida en cis)

AAAGGCAUGAAAAACUUGGUAUCUUCACCAACACCUCUAGCUUUUUGAAGGAAUUGAGUAUGA
 AGUUUGGAAAUAUUGGUUGUUCGUUAUCAAACCACCAGGUGAAACUCAUAAGCUAAAGGCAUGA
 AAAAAUCUAGGUGAUUCUUCACCAACACCUCUAGUUUUUCAAGGAAUUGAGUAUGAAGUUUGGAA
 AUUUUUGUUUUUCGUUAUCAAACCACCAGGUGAAACUCAUAAGCUAAGUAAUUGGAUCGCUUUGU
 UCGGCUUGGUAUCGCCUCAGAAGAGUAGGGUUUGAUACAUAUUGGACCUUAGAACAUCAUUU
 UACAGAGUUUGGUCUUAACGGGAAAUUUAUUUGUUGCUGCGGCUAACCUGUUAGGAAGAACUA
 AAACAUAUAAUGUUGGCACUAUGGGGGUUGUUUAUUCGACAGCACACCCAGUUCGACAGUUA
 GAAGACGUUUUAUUUAUAGAUCAAAUGUCGAAAGGUCGUUUUAAUUUUGGAACCGUUCGAGG
 GCUAUACCAUAAAGAUUUUUCGAGUAUUUGGUUGUAUUGGAAGAGUCUCGAGCAAUUACUC
 AAAAAUUUCUACCAGAUGAUAAUGGAAAGCUUACAGACAGGAACCAUUAGCUCUGAUAGUGAU
 UACAUUCAAUUUCCUAAGGUUGAUGUAUAUCCCAAAGUGUACUCAAAAAUGUACCAACCUG
 UAUGACUGCUGAGUCCGCAAGUACGACAGAAUGGCUAGCAAUACAAGGGCUACCAAUGGUUC
 UUAGUUGGAUUUAUUGGUAC'UAAUGAAAAAAAAGCACAGAUGGAACUCUAUAAUGAAAUUGCG
 ACAGAAUAUGGUCUAUGAUUAUUCUAAAAUAGAUCAUUGUAUGACUUAUAUUUGUUCUGUUGA
 UGAUGAUGCACAAAAGGCGCAAGAUGUUUGUCGGGAGUUUCUGAAAAAUUGGUAUGACUCAU
 AUGUAAAUGCGCACCAAUAUCUUUAAUGAUAGCAAUCAAACUCGUGGUUAUGAUUAUCAUAAA
 GGUCAUUGGCGUGAUUUUGUUUACAAGGACAUACAACACCAAUCGACGUGUUGAUUAUAG
 CAAUGGUUAUAAACCUGUAGGCACUCCUGAGCAGUGUAUUGAAAUCAUUC AACGUGAUUUG
 AUGCAACGGGUAUUJACAAA CAUUA CAUGCGGAUUUGAAGCUAAUGGAA'UGAAGAUGAAAUA
 AUJGCUUCCAUGCGACGCUUUAUGACACAAGUCGCUCUUCUAAAA GAACCUAAA UAAU
 UACUUAUUUGAUACUAGAGAUAAUAAGGAACAAGUUAUGAAAUUUGGAUUUUUUUUCUAAA
 CUUUCAGAAAGAUGGAAUACAUCUGAAGAAACGUUGGAUAAUAUGGUAAGACUGUCACGU
 UAAUUGAUUCAACUAAAUAUCAUUUAAUACUGCCUUUGUUAUUGAACAUACAUUUUCAAAA
 AAUGGUUAUUGUUGGAGCACCUAUUACCGCAGCUGGUUUUUUAUUAGGGUUAACAAA UAAAU
 ACAUAUUGGUUCAUUAUAAU CAAGUAAUUAACCACCAUCACCCUGUACGUGUAGCAGAAGAAG
 CCAGUUUAUUAGAUCAAUUGUCAGAGGGACGCUUCAUUCUUGGUUUUAGUGACUGCGAAAGU
 GAUUUCGAAAUGGAAUUUUUAGACGUCAUUAUCUCAUCAAAGGCAACAACAAUUUGAAGCAUG
 CUAUGAAAUAUUAUUGACGCAUUAACUACAGGUUAUUGUCAUCCCCAAAACGACUUUUUAUG
 AUUUUCCAAGGUUJCAAUUAUCCACACUGUUAACAGUGAGAAUGGACCUAAGCAAUAUGUA
 UCCGCUACAUCAAAAGAAGUCGUCAUGUGGGCAGCGAAAAAGGCACUGCCUUUAACAUUUAA
 GUGGGAGGAUAAUUUAGAAACCAAAGAACGCUAUGCAAUUCUAUAUAAUAAAACAGCACAAC
 AAUAUGGUUAUUGAUUUUUCGGAUGUUGAUCAUCAAUUAACUGUAAUUGCGAACUAAAUGCU
 GAUAGAAGUACGGCUC AAGAAGAAGUGAGAGAAUACUUA AAAAGACUAUAUCACUGAAACUUA
 CCCUCAAAUGGACAGAGAUGAAAAAUU AACUGCAUUAUUGAAGAGAAUGCAGUUGGGUCUC
 AUGAUGACUAUUAUGAAUCGACAAA AUAGCAGUGGAAAAAACAGGGUCUAAAAAUUUUUA
 UUAUCCUUGAAUCAUUGUCCGAUAUUAAGAUGUAAAAGAUUAUUAUUGAUUUGUUGAACCA
 AAAAAUCGAAUGAAUUUACCAUAAUAAA AUAAAGGC AAUUUCUAUAUUAGAUUGCCUUUU

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> GENEWEAVE BIOSCIENCES, INC.
- 5 <120> PARTÍCULAS DE TRANSDUCCIÓN NO REPLICATIVAS Y SISTEMAS INDICADORES BASADOS EN PARTÍCULAS DE TRANSDUCCIÓN
- <130> 28421-25938/PCT
- 10 <140> PCT/US2014/026536
<141> 13/03/2014
- <150> 61/939.126
<151> 12/02/2014
- 15 <150> 61/897.040
<151> 29/10/2013
- 20 <150> 61/779.177
<151> 13/03/2013
- <160> 22
- <170> PatentIn versión 3.5
- 25 <210> 1
<211> 177
<212> ADN
<213> Fago P1 de Enterobacteria
- 30 <400> 1
ccactaaaaa gcatgatcat tgatcactct aatgatcaac atgcaggtga tcacattgcg 60
gctgaaatag cggaaaaaca aagagttaat gccgttgca gtgccgcagt cgagaatgcg 120
aagcgccaaa ataagcgcat aatgatcgt tcagatgatc atgacgtgat caccgcg 177
- 35 <210> 2
<211> 177
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 40 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético
- <400> 2
ccactaaaaa gcatgataat agaccactct aacgaccaac atgcagggga gcacattgcg 60
gctgaaatag cggaaaagca gagggatgaat gccgttgca gtgccgcagt cgagaatgcg 120
aagcgccaaa ataagcgcat aaacgaccgt tcagacgacc atgacgttat taccgcg 177
- 45 <210> 3
<211> 1727
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 50 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético
- <400> 3

ES 2 780 827 T3

cactataggg cgaattggcg gaaggccgtc aaggccgcat ttgggcccgg cgcgccggat 60
 ccgctagctc tagactggca ggtttctgag cagatcgcc aacccgatct ggatcgggtc 120
 agaaaaattt gctctaataa atttcgtttt ctaagtgcaa agaatcacca tttcgagctg 180
 gtgattgaag gttgatgcaa atttggagaa aaaatgcaac aaacattcaa tgcggatatg 240
 aatatatcaa accttcatca aaatgctgat ccttcaacca ctctgcccgt tattttgtggt 300
 gttgaaatta cgaccgaccg cgctggccgt tacaacctta atgctctaca cagagcgagc 360
 ggactcggtg ccataaagc gccagctcaa tggctaagaa cgctgctcagc taaacagctc 420
 atcgaagagc ttgaaaaaga aactatgcag aattgcatag tttcgttcac aagcaatgga 480
 agcaggattt ctttcacgac tcgtataacc ggcaaaggtc agcagtggct gatgaagcga 540
 ttgcttgatg ctggtgtgct ggtacctgtc gcggcaacgc gctaacagac gtagtaagaa 600
 ccaccagcat tgtaatgctg gctaaagtca ctttctgag ctgtataacg atgagcgatt 660
 ttactttttc tggctatgaa ttggcctgct ttgtaacaca ctccggtcta tcccgtagcg 720
 ccgggcatac cctgtcgcaa tgtgcaaadc tcgcggaac aaccagtga tacttcattc 780
 acaagcctca ccgcctgatc gcggcagaaa ctggttatag ccaatcaacc gtcgttcgtg 840
 cattccgtga agctgtaaac aaaggaattc tgtctgtaga gattgttatc ggcgatcacc 900
 gtgaacgtcg cgctaacctg taccggttta caccatcctt tttggccttc gcacaacaag 960
 ccaaaaatgc gctgatagaa agcaaatata agatctcttc agcggcaacc aaggttaaag 1020
 ctgttctcgc taagacattg gctttattta atttttatc cacaccccca tgtcaaaatg 1080
 atacccctc cccctgtcag gatgacgtgg caataaagaa taagaagtca caagttaaaa 1140
 aaacaaaaag atcagtttcc ggcggtgccc gaacaaccag cctcaaaaaa ttgacttcat 1200
 ggatcgctaa ggcaaaagca aaggctgaca atctgcggtt atccaaaaaa cgcactcaaa 1260
 aacatgagtt caagcagaaa gtagaggcgg ctgcgcggaa atatgcttac ctgaagaaca 1320
 agcgttcgcc tgatattggc gggatatcaa acttcgataa cctaccgatc tgcattgacgg 1380
 taaacgaagc tcttaatgcg gttttagcca aaaataaaga taacgaacaa tggggtatac 1440
 cggcaggatt cagagggtaa tgaattgctc taattataac catgcatact ttcaacacct 1500
 ctagtttgcc atgaggcaaa ctcatagggtg tcctggtaag aggacactgt tgccaaaact 1560
 ggacgccccca ttattgcaat taataaaca ctaacggaca attctaccta acaataagtg 1620
 gcttaaaaaa acccgccccg gcgggttttt ttatctagag ctagcggatc cggcgcgccg 1680
 ggcccttctg ggccctcatgg gccttccgct cactgcccgc tttccag 1727

<210> 4
 <211> 131
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>

ES 2 780 827 T3

<223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

<400> 4
 cgtcaggtgg cacttttcgg gaaatgtgcg cggaaccctcct atttgtttat tttctaaata 60
 cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat aaatgcttca ataattattga 120
 aaaggaagag t 131

5
 <210> 5
 <211> 4681
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

15
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (301) . . (301)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

20
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (4056) . . (4056)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 5
 tttgcggaag gagttagtaa gttaacagaa gacgagccaa acctaaatgg tttagcagga 60
 aacttagata aaaaaatgaa tccagaatta tattcagaac aggaacagca acaagagcaa 120
 caaaagaatc aaaaacgaga tagaggtatg cacttataga acatgcattt atgccgagaa 180
 aacttattgg ttggaatggg ctatgtgta gctaacttgt tagcgagttg gttggacttg 240
 aattgggatt aatccaaga aagtaccggc tcaacaacc ataaagccct gtaggttccg 300
 nccaataagg aaattggaat aaagcaataa aaggagttga agaaatgaaa ttcagagaag 360
 cctttgagaa ttttataaca agtaagtatg tacttggtgt tttagtagtc ttaactgttt 420
 accagataat acaaatgctt aaataaaaa agacttgatc tgattagacc aaatcttttg 480
 atagtgttat attaataaca aaataaaaag gagtcgctca cgccctacca aagtttgtga 540
 acgacatcat tcaaagaaaa aaacactgag ttgtttttat aatcttgtat atttagatat 600
 taaacgatat ttaaatatac atcaagatat atatttgggt gagcgattac ttaaacgaaa 660
 ttgagattaa ggagtcgatt ttttatgtat aaaaacaatc atgcaaatca ttcaaatcat 720
 ttggaaaatc acgatttaga caatttttct aaaaccggct actctaatag ccggttggac 780
 25 gcacatactg tgtgcatatc tgatcAAAA ttaagttttg atgcaatgac gatcgttggga 840

ES 2 780 827 T3

aatctcaacc gagacaacgc tcaggccctt tctaaattta tgagtgtaga gcccacaaata 900
agactttggg atattcttca aacaaagttt aaagctaaag cacttcaaga aaaagtttat 960
attgaatatg acaaagtga agcagatagt tgggatagac gtaatatgcy tattgaattt 1020
aatccaaaca aacttacacg agatgaaatg atttggttaa aacaaaatat aataagctac 1080
atggaagatg acggttttac aagattagat ttagcctttg attttgaaga tgatttgagt 1140
gactactatg caatgtctga taaagcagtt aagaaaacta ttttttatgg tcgtaatggt 1200
aagccagaaa caaaatattt tggcgtgaga gatagtaata gatttattag aatttataat 1260
aaaaagcaag aacgtaaaga taatgcagat gctgaagtta tgtctgaaca tttatggcgt 1320
gtagaaatcg aacttaaaag agatatggtg gattactgga atgattgctt tagtgattta 1380
catatcttgc aaccagattg gaaaactatc caacgcactg cggatagagc aatagttttt 1440
atgttattga gtgatgaaga agaatgggga aagcttcaca gaaattctag aacaaaatat 1500
aagaatttga taaaagaaat ttcgccagtc gatttaacgg acttaatgaa atcgacttta 1560
aaagcgaacg aaaaacaatt gcaaaaacaa atcgattttt ggcaacatga atttaaattt 1620
tggaatatgt gtacatatta atattactga acaaaaatga tatatttaa ctattctaata 1680
ttaggaggat ttttttatga agtgtctatt taaaaatttg ggaatttat atgaggtgaa 1740
agaataattt acccctataa acttttagcca cctcaagtaa agaggtaaaa ttgtttagtt 1800
tatataaaaa atttaaggt ttgttttata gcgttttatt ttggctttgt attccttcat 1860
tttttagtgt attaaatgaa atggttttaa atgtttcttt acctgatatt gcaaatcatt 1920
ttaatactac tcctggaatt acaaactggg taaacactgc atatatgta actttttcga 1980
taggaacagc agtatatgga aaattatctg attatataaa tataaaaaa ttgttaatta 2040
ttggtattag tttgagctgt cttggttcat tgattgcttt tattgggcc acctaggcaa 2100
atatgctctt acgtgctatt atttaagtga ctatttaaaa ggagttaata aatatgcggc 2160
aaggtattct taaataaact gtcaatttga tagcgggaac aaataattag atgtcctttt 2220
ttaggagggc ttagtttttt gtaccagtt taagaatacc tttatcatgt gattctaaag 2280
tatccagaga atatctgtat gctttgtata cctatggta tgcatataaa tcccagtgat 2340
aaaagtattt atcactggga tttttatgcc cttttgggtt tttgaatgga ggaaaatcac 2400
atgaaaatta ttaatattgg agtttttagct catgttgatg caggaaaaac taccttaaca 2460
gaaagcttat tatataacag tggagcgatt acagaattag gaagcgtgga caaaggtaca 2520
acgaggacgg ataatacgct tttagaacgt cagagaggaa ttacaattca gacaggaata 2580
acctcttttc agtgggaaaa tacgaaggtg aacatcatag acacgccagg acatatggat 2640
ttcttagcag aagtatatcg ttcattatca gtttttagatg gggcaattct actgatttct 2700

ES 2 780 827 T3

gcaaaagatg gcgtacaagc acaaactcgt atattatttc atgcacttag gaaaatgggg 2760
attcccacaa tcttttttat caataagatt gacccaaatg gaattgattt atcaacggtt 2820
tatcaggata ttaaagagaa actttctgcc gaaattgtaa tcaaacagaa ggtagaactg 2880
tatacctaata tgtgtgtgac gaactttacc gaatctgaac aatgggatac ggtaatagag 2940
ggaaacgata acctttttaga gaaatatatg tccggtaaat cattagaagc attggaactc 3000
gaacaagagg aaagcataag atttcagaat tgttctctgt tccctcttta tcatggaagt 3060
gcaaaaagta atatagggat tgataacctt atagaagtta ttactaataa attttattca 3120
tcaacacatc gaggtccgtc tgaactttgc ggaaatgttt tcaaaattga atatacaaaa 3180
aaaagacaac gtcttgcata tatacgcctt tatagtggag tactacattt acgagattcg 3240
gttagagtat cagaaaaaga aaaaataaaa gttacagaaa tgtatacttc aataaatggt 3300
gaattatgta agattgatag agcttattct ggagaaattg ttattttgca aatgagttt 3360
ttgaagttaa atagtgttct tggagataca aaactattgc cacagagaaa aaagattgaa 3420
aatccgcacc ctctactaca aacaactggt gaaccgagta aacctgaaca gagagaaatg 3480
ttgcttgatg cccttttggg aatctcagat agtgatccgc ttctacgata ttacgtggat 3540
tctacgacac atgaaattat actttctttc ttagggaaag taaaaatgga agtgattagt 3600
gcactggttc aagaaaagta tcatgtggag atagaactaa aagagcctac agtcatttat 3660
atggagagac cgttaaaaaa tgcagaatat accattcaca tcgaaagtgc gccaaatcct 3720
ttctgggctt ccattggttt atctgtatca ccgcttccgt tgggaagtgg aatgcagtat 3780
gagagctcgg tttctcttgg aactttaat caatcatttc aaaatgcagt tatggaaggg 3840
gtacgctatg gttgcgaaca aggattatat ggttggaatg tgacggattg taaaatctgt 3900
ttaaagtacg gtttatacta tagccctggt agtactccag cagattttcg gatgcttact 3960
cctattgtac tggagcaagc ctttagaaaa gctggaacag aattgttaga gccatatott 4020
agttttaag tttatgcacc acaggaatat ctttcncggg catataacga tgctcccaaa 4080
tattgtgcaa atatcgtaaa tactcaactg aaaaataatg aggtcattat tattggagaa 4140
attcctgctc gatgtattca agattatcgc aatgatttaa ctttttttac aatgggctt 4200
agtgtttggt tagcagagct aaaaggatat caggttacca ctggcgaacc tgtttgccag 4260
accogtctc taaatagtcg gatagataaa gtaagatata tgttcaataa aataacttag 4320
tgcgttttat gttgttatat aaatatggtt tcttattaaa taagatgaaa tattctttaa 4380
tatagatttg aattaaagtg gaaaggagga gattgttatt ataaactaca agtggatatt 4440
gtgtcctatt tgtggaata aaacaagact acgaatacga gtggatacta tacttaaaaa 4500
tttcccttta tacagcccca aatgtaagaa cgaaacttta attaatgttc aaaaaatgaa 4560
tataataaca atcaaagagc cagacgcca gacgcagagc cgataatttg agaaatgaaa 4620

ES 2 780 827 T3

ctctcatctt atcggctctt tttgtttatc tgaattttac tgactagcct tcaatatttc 4680

c 4681

<210> 6

<211> 1194

<212> ADN

<213> Fago P1 de Enterobacteria

<400> 6

gtgacctggg acgatcacia gaagaatfff gctcgcctgg cgcgagatgg tggttacacc 60

atcgcacagt atgccgccga gtttaattctt aaccctaata ccgcacgtcg ttatctccgt 120

gccttcaaag aagacaccag gactacggac agccgcaagc caaataagcc agtcaggaag 180

ccactaaaaa gcatgatcat tgatcactct aatgatcaac atgcaggtga tcacattgcg 240

gctgaaatag cggaaaaaca aagagttaat gccgtttgca gtgccgcagt cgagaatgcg 300

aagcgccaaa ataagcgcat aatgatcgt tcagatgatc atgacgtgat caccgcgcc 360

caccggacct tacgtgatcg cctggaacgc gacaccctgg atgatgatgg tgaacgcttt 420

gaattogaag ttggcgatta cctgatagat aacgttgaag cgcggaaggc cgcgcgcgct 480

atggtgogtc ggtccggggc cgatgttctg gaaaccactc ttctggaaaa gtctctttct 540

catctoctta tgctggagaa cgccagggat acgtgtattc gcctggtgca ggaaatgcgc 600

gatcagcaaa aagacgatga tgaaggtact ccgcctgaat accgtatcgc gagcatgcta 660

aacagctggt ccgcgcagat aagcagcctg atcaacacca ttacagcat ccggaataac 720

tatcgaaaag aaagccggga ggcggaaaag cacgctttat ctatggggca agctggcatt 780

gttaagctgg catacgaacg aaagcgtgaa aataactggt cagtgctgga agcggctgaa 840

ttcatcgagg cgcattggagg aaaagtgccg cccctgatgc tggagcaaat caaagccgat 900

ctgogtgctc ctaagaccaa taccgatgat gaggaaaacc aaacagcatc tggcgtcca 960

tcacttgaag atctggataa aatcgcgcga gaacgggccg ccagccgccg cgctgatgcc 1020

gcattgtgga ttgagcatcg tagagaagaa attgccgata tcgtcgatac aggtggttat 1080

ggtgatgtcg atgcggaagg catatcaaac gaagcatggc ttgaacagga tctggacgaa 1140

gacgaggagg aagacgaaga agttaccgc aaactgtacg gggatgatga ttaa 1194

<210> 7

<211> 1194

<212> ADN

<213> Fago P1 de Enterobacteria

<400> 7

gtgacctggg acgatcacia gaagaatfff gctcgcctgg cgcgagatgg tggttacacc 60

atcgcacagt atgccgccga gtttaattctt aaccctaata ccgcacgtcg ttatctccgt 120

ES 2 780 827 T3

gccttcaaag aagacaccag gactacggac agccgcaagc caaataagcc agtcaggaag 180
 ccactaaaaa gcatgatcat tgatcactct aatgatcaac atgcaggtga tcacattgcg 240
 gctgaaatag cggaaaaaca aagagttaat gccgttgtca gtgccgcagt cgagaatgcg 300
 aagcgccaaa ataagcgcat aatgatcgt tcagatgatc atgacgtgat caccgcgccc 360
 cacoggacct tacgtgatcg cctggaacgc gacaccctgg atgatgatgg tgaacgcttt 420
 gaattogaag ttggcgatta cctgatagat aacgttgaag cgcggaaggc cgcgcgcgct 480
 atggtgcgtc ggtccggggc cgatggtctg gaaaccactc ttctggaaaa gtctctttct 540
 catctcotta tgctggagaa cgccagggat acgtgtattc gcctggtgca ggaaatgcg 600
 gatcagcaaa aagacgatga tgaaggtact ccgcctgaat accgtatcgc gagcatgcta 660
 aacagctggt ccgcgcatgat aagcagcctg atcaacacca tttacagcat ccggaataac 720
 tatcgaaaaag aaagccggga ggcggaaaag cacgctttat ctatggggca agctggcatt 780
 gttaagctgg catacgaacg aaagcgtgaa aataactggt cagtgctgga agcggctgaa 840
 ttcacatgagg cgcacggagg aaaagtgccg cccctgatgc tggagcaaat caaagccgat 900
 ctgctgctc ctaagaccaa taccgatgat gaggaaaacc aacagcatc tggcgtcca 960
 tcaacttgaag atctggataa aatcgcgca gaacggggccg ccagccgccc cgctgatgcc 1020
 gcattgtgga ttgagcatcg tagagaagaa attgccgata tcgtcgatac aggtggttat 1080
 ggtgatgtcg atgcggaagg catatcaaac gaagcatggc ttgaacagga tctggacgaa 1140
 gacgaggagg aagacgaaga agttaccgcg aaactgtacg gggatgatga ttaa 1194

<210> 8
 <211> 525
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

<400> 8
 atgaacgaaa aacaaaagag attcgcagat gaatatataa tgaatggatg taatggtaaa 60
 aaagcagcaa ttccagcagg ttatagtaag aaaacagcag agtctttagc aagtcgattg 120
 ttaagaaatg ttaatgtttc ggaatatatt aaagaacgat tagaacagat acaagaagag 180
 cgtttaatga gcattacaga agcttttagcg ttatctgctt ctattgctag aggagaacct 240
 caagaggctt acagtaagaa atatgacat ttaaacgatg aagtggaaaa agaggttact 300
 tacacaatca caccaacttt tgaagagcgt cagagatcta ttgaccacat actaaaagtt 360
 catggtgctg atatcgacaa aaaagaaatt actcagaaga atattgagat taatattaga 420
 tctattgacc acatactaaa agttcatggt gcgtatatcg acaaaaaaga aattactcag 480
 aagaatattg agattaatat tggatgagtac gatgacgaaa gttaa 525

<210> 9

ES 2 780 827 T3

<211> 663
 <212> ADN
 <213> Fago 80alfa de Staphylococcus

5 <400> 9
 aattggcagt aaagtggcag tttttgatac ctaaaatgag atattatgat agtgtaggat 60
 attgactatc ttactgcggt tcccttatcg caattaggaa taaaggatct atgtggggtg 120
 gctgattata gccaatcctt ttttaatfff aaaaagcgtg tagcgcgaga gttgggtggta 180
 aatgaaatga acgaaaaaca aaagagattc gcagatgaat atataatgaa tggatgtaat 240
 ggtaaaaaag cagcaatttc agcaggttat agtaagaaaa cagcagagtc tttagcaagt 300
 cgattgttaa gaaatgttaa tgtttcggaa tatattaaag aacgattaga acagatacaa 360
 gaagagcggt taatgagcat tacagaagct ttagcgttat ctgcttctat tgctagagga 420
 gaacctcaag aggcttacag taagaaatat gaccatttaa acgatgaagt ggaaaaagag 480
 gttacttaca caatcacacc aacttttgaa gagcgtcaga gatctattga ccacatacta 540
 aaagttcatg gtgcgtatat cgacaaaaaa gaaattactc agaagaatat tgagattaat 600
 attggtgagt acgatgacga aagttaaatt aaactttaac aaaccatcta atgttttcaa 660
 cag 663

<210> 10
 <211> 1116
 <212> ADN
 <213> Staphylococcus aureus

10 <400> 10
 tcataaatat ttaactatff ctttctgtgt actagggtag aatgaccgt atcggttata 60
 tacttcatta ctatcagcat ggcctaaacg ctgtgctatt accatgatac ttgcgccatg 120
 attgactagc atagacgcat ggctatgtct taactcatga attacaattc tagggaatgt 180
 ctgaccgtct ggtagttggt catctaatac ttttaatgca gcggtaaacc aacgatctat 240
 agttgattca ctataagctt tgaagaatgt accgaataat acataatcat ctttatatac 300
 attgttttct ttgtaccatt ttaaataatc tttgatatca ttcacatcat gaacaggtaa 360
 gtatatatca cgtattgctg cttttgtfff aggggctgtc acttcaccgt gatagtctgt 420
 tttgttaata tgtatgaaat catcatcata gttaatatca cgccatgtga gggctctaaf 480
 ttcgccctta cgtgcaccag agtaaaacag tagcttaaag aataactfff gttgttgtgt 540
 agctaaagcc tcatagaatt gattgaattg ttctaattgt caatagttca aacgcttatt 600
 tgattctatt tcaaagttac ctactagaga ggctacattt tgctttagat catgaaactt 660
 catagcatgg ttaagtaacg atactaagaa cacgtgcatt ttcttttaggt actctccaga 720

15

ES 2 780 827 T3

gtgtccctct tttaacttgc tattctgaaa cttcataata tcttgtgtag tcatattaaa 780
 cacgtccata gacttaaaat agggtagcaa atgggtgttt gtatgtgtct ttaatgcttt 840
 cacactagat gacttacgac gtgcagaata ccaactctata tactcatcta cgagcttacc 900
 aaagggcagt ttgtttatct gtccctacacc ctctaactcg tccataattt cttacattt 960
 cttcaatgcc tctttacgct gtttaaagcc actctttttt atttctttac gttgattaaa 1020
 tttatcatag tattttatac gaaaatagta tgtaccacgt ttagcgtctt tatatatggt 1080
 gtgggatagg tttaagttgt gttctatggg aatcac 1116

<210> 11
 <211> 10844
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8807) . . (8807)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 11
 ctcgggcctg ctcttgggct tgatecggcct tcttgcgcat ctcacgcgct cctgcggcgg 60
 cctgtagggc aggctcatac ccctgccgaa ccgcttttgt cagccggctc gccacggctt 120
 ccggcgtctc aacgcgcttt gagattcca gcttttcggc caatccctgc ggtgcatagg 180
 cgcgtggctc gaccgcttgc gggctgatgg tgacgtggcc cactggtggc cgctccaggg 240
 cctcgtagaa cgcctgaatg cgcgtgtgac gtgccttgc gccctcagat ccccgttgca 300
 gccctagatc ggccacagcg gccgcaaacg tggctcggtc gcgggtcatc tgcgctttgt 360
 tgccgatgaa ctcttggcc gacagcctgc cgtcctgcgt cagcggcacc acgaacgcgg 420
 tcatgtgcgg gctggtttcg tcacggtgga tgctggccgt cacgatgcga tccgcccctg 480
 acttgtccgc cagccacttg tgcgccttct cgaagaacgc cgcctgctgt tcttggctgg 540
 ccgacttcca ccattccggg ctggccgtca tgacgtactc gaccgccaac acagcgtcct 600
 tgcgcgctt ctctggcagc aactcgcgca gtcggcccat cgcttcatcg gtgctgctgg 660
 ccgcccagtg ctcgttctct ggcgtcctgc tggcgtcagc gttgggcgtc tcgcgctcgc 720
 ggtagggctg cttgagactg gccgccacgt tgcccatttt cgcagcttc ttgcatcgca 780
 tgatogcgtg tgccgccatg cctgccctc ctttttgggt tccaaccggc tcgacggggg 840
 cagcgcgaagg cgggtgcctcc ggcggggcac tcaatgcttg agtatactca ctagactttg 900
 cttcgcaaag tcgtgaccgc ctacggcggc tgcggcggcc tacgggcttg ctctccgggc 960

ES 2 780 827 T3

ttgcacctgc gcggtcgctg cgtcccttg ccagcccgtg gatatgtgga cgatggccgc 1020
 gagcggccac cggctggctc gcttcgctcg gcccgaggac aacctgctg gacaagctga 1080
 tggacaggct gcgcctgccc acgagcttga ccacagggat tgcccaccgg ctaccactat 1140
 agggcgaatt ggcggaaggc cgtcaaggcc gcatttgggc ccggcgcgcc ggatccgcta 1200
 gctctagacc tctagaccag ccaggacaga aatgcctcga cttcgctgct gcccagggtt 1260
 gccgggtgac gcacaccgtg gaaacggatg aaggcacgaa cccagtggac ataagcctgt 1320
 tcggttcgta agctgtaatg caagtagcgt gcccgttccg ggccctttga catgtgactt 1380
 tcgttaccct cgcgtcaaaa agagttttta cgaaaggaag cataagtgac ctgggacgat 1440
 cacaagaaga attttgctcg cctggcgcga gatggtggtt acaccatcgc acagtatgcc 1500
 gccgagttta atcttaacct taataccgca cgtcgttatc tccgtgcctt caaagaagac 1560
 accaggacta cggacagccg caagccaaat aagccagtca ggaagccact aaaaagcatg 1620
 atcattgatc actctaataga tcaacatgca ggtgatcaca ttgcggctga aatagcggaa 1680
 aaacaaagag ttaatgccgt tgtcagtgcc gcagtcgaga atgcgaagcg ccaaaataag 1740
 cgcataaatg atcgttcaga tgatcatgac gtgatcaccg gcgcccaccg gaccttacgt 1800
 gatcgcoctgg aacgcgacac cctggatgat gatggtgaac gctttgaatt cgaagtggc 1860
 gattacctga tagataacgt tgaagcgcgg aaggccgcgc gcgctatggt gcgtcggtcc 1920
 ggggcccgatg ttctggaac cactcttctg gaaaagtctc tttctcatct ccttatgctg 1980
 gagaacgcca gggatacgtg tattcgctg gtgcaggaaa tgcgcgatca gcaaaaagac 2040
 gatgatgaag gtactccgcc tgaataccgt atcgcgagca tgctaaacag ctggtccgcg 2100
 cagataagca gcctgatcaa caccatttac agcatccgga ataactatcg aaaagaaagc 2160
 cgggagggcg aaaagcacgc tttatctatg gggcaagctg gcattgttaa gctggcatac 2220
 gaacgaaagc gtgaaaataa ctggtcagtg ctggaagcgg ctgaattcat cgaggcgcac 2280
 ggaggaaaag tgccgcccct gatgctggag caaatcaaag ccgatctgcg tgctcctaag 2340
 accaataccg atgatgagga aaaccaaaca gcatctggcg ctccatcact tgaagatctg 2400
 gataaaatcg cgcgagaacg ggccgccagc cgcgcgctg atgccgcatt gtggattgag 2460
 catcgtagag aagaaattgc cgatatcgtc gatacagggt gttatggtga tgtcgatgcg 2520
 gaaggcatat caaacgaagc atggcttgaa caggatctgg acgaagacga ggaggaagac 2580
 gaagaagtta cccgcaaact gtacggggat gatgattaat taaaaaaccc cccccggcg 2640
 ggttttttta tctagagcta gcggatccgg cgcgcggggc ccttctgggc ctcatgggcc 2700
 ttccgctcac tgcccgtttt ccagcactat agggcgaatt ggcggaaggc cgtcaaggcc 2760
 gcatttgggc ccggcgcgcc ggatccgcta gctctagact ggcaggtttc tgagcagatc 2820

ES 2 780 827 T3

gtccaaccog atctggatcg ggtcagaaaa atttgctcta ataaatttcg ttttctaagt 2880
 gcaaagaatc accatttcga gctgggtgatt gaaggttgat gcaaatttgg agaaaaaatg 2940
 caacaaacat tcaatgcgga tatgaatata tcaaaccctc atcaaaatgt cgatccttca 3000
 accactctgc ccgttatttg tgggtgtgaa attacgaccg accgcgctgg ccgttacaac 3060
 cttaatgctc tacacagagc gagcggactc ggtgcccata aagcgcagc tcaatggcta 3120
 agaacgctgt cagctaaaca gctcatcgaa gagcttgaaa aagaaactat gcagaattgc 3180
 atagtttcgt tcacaagcaa tggaagcagg atttctttca cgactcgtat aaccggcaaa 3240
 ggtcagcagt ggctgatgaa gcgattgctt gatgctgggtg tgctgggtacc tgcgcggca 3300
 acgcgctaac agacgtagta agaaccacca gcattgtaat gctggctaaa gtcactttcc 3360
 tgagctgtat aacgatgagc gattttactt tttctggcta tgaattggcc tgctttgtaa 3420
 cacactccgg tctatcccggt agcgcggggc atatcctgtc gcaatgtgca aatctcggg 3480
 caacaaccag tgaatacttc attcacaagc ctcaccgcct gatcgcggca gaaactggtt 3540
 atagccaatc aaccgtcgtt cgtgcattcc gtgaagctgt aaacaaagga attctgtctg 3600
 tagagattgt tatcggcgat caccgtgaac gtcgcgctaa cctgtaccgg tttacacat 3660
 cctttttggc cttcgcacaa caagccaaaa atgcgctgat agaaagcaaa ttaaagatct 3720
 cttcagcggc aaccaaggtt aaagctgttc tcgctaagac attggcttta ttttaatttt 3780
 tatccacacc cccatgtcaa aatgataccc cctccccctg tcaggatgac gtggcaataa 3840
 agaataagaa gtcacaagtt aaaaaaaca aaagatcagt ttccggcggg gccggaacaa 3900
 ccagcctcaa aaaattgact tcatggatcg ctaaggcaaa agcaaaggct gacaatctgc 3960
 ggttatccaa aaaacgcact caaaaacatg agttcaagca gaaagtagag gcggctgcgc 4020
 ggaaatatgc ttacctgaag aacaagcgtt cgcctgatat tggcgggata tcaaacttcg 4080
 ataacctacc gcattgcatg acggtaaacg aagctcttaa tgcggtttta gccaaaaata 4140
 aagataacga acaatggggg ataccggcag gattcagagg gtaatgaatt gctctaatta 4200
 taacctgca tactttcaac acctctagtt tgccatgagg caaactcata ggtgtcctgg 4260
 taagaggaca ctgttgccaa aactggacgc cccattattg caattaataa acaactaacg 4320
 gacaattcta cctaacaata agtggcttaa aaaaaccgc cccggcgggt tttttatct 4380
 agagctagcg gatccggcgc gccgggcctt tctgggcctc atgggccttc cgctactgc 4440
 ccgctttcca gccagccttc gaccacatac ccaccggctc caactgcgcg gcctgcggcc 4500
 ttgccccatc aattttttta attttctctg gggaaaagcc tccggcctgc ggctgcgcg 4560
 cttcgttgc cggttggaca ccaagtggaa ggcgggtcaa ggctcgcgca gcgaccgcgc 4620
 agcggcttgg ccttgacgcg cctggaacga cccaagccta tgcgagtggg ggcagtcgaa 4680
 ggcgaagccc gcccgctgc cccccgagac ctgcaggggg gggggggcgc tgaggtctgc 4740

ES 2 780 827 T3

ctcgtgaaga aggtggtgct gactcatacc aggcctgaat cgccccatca tccagccaga 4800
aagtgagggga gccacgggtg atgagagctt tgttgtaggt ggaccagttg gtgattttga 4860
acttttgctt tgccacggaa cggctctgct tgtcgggaag atgctgatc tgatccttca 4920
actcagcaaa agttcgattt attcaacaaa gccgccgtcc cgtcaagtca gcgtaatgct 4980
ctgccagtgt tacaaccaat taaccaattc tgattagaaa aactcatcga gcatcaaatg 5040
aaactgcaat ttattcatat caggattatc aataccatat ttttgaaaaa gccgtttctg 5100
taatgaagga gaaaactcac cgaggcagtt ccataggatg gcaagatcct ggtatcggtc 5160
tgcgattcog actcgtccaa catcaataca acctattaat ttcccctcgt caaaaaataag 5220
gttatcaagt gagaaatcac catgagtgac gactgaatcc ggtgagaatg gcaaaagctt 5280
atgcatttct ttccagactt gttcaacagg ccagccatta cgctcgtcat caaaatcact 5340
cgcacatcaacc aaaccgttat tcattcgtga ttgctcctga gcgagacgaa atacgcgatc 5400
gctgttaaaa ggacaattac aaacaggaat cgaatgcaac cggcgcagga aactgcccag 5460
cgcacatcaaca atattttcac ctgaatcagg atattcttct aatacctgga atgctgtttt 5520
cccgggggatc gcagtgggtga gtaaccatgc atcatcagga gtacggataa aatgcttgat 5580
ggctcgggaaga ggcataaatt ccgtcagcca gtttagtctg accatctcat ctgtaacatc 5640
attggcaacg ctacctttgc catgtttcag aaacaactct ggccgatcgg gcttcccata 5700
caatcgatag attgtcgcac ctgattgcc gacattatcg cgagcccatt tatacccata 5760
taaatcagca tccatggttg aatttaatcg cggcctcgag caagacgttt cccgttgaat 5820
atggctcata acacccttg tattactgtt tatgtaagca gacagtttta ttgttcatga 5880
tgatatatth ttatcttgtg caatgtaaca tcagagattt tgagacacaa cgtggctttc 5940
cccccccccc ctgcaggtcc cgagcctcac ggcggcgagt gcgggggttc caagggggca 6000
gcgccacott gggcaaggcc gaaggccgcg cagtcgatca acaagccccg gaggggccac 6060
tttttgccgg agggggagcc gcgccgaagg cgtgggggaa ccccgagggt gtgcccttct 6120
ttgggcacca aagaactaga tatagggcga aatgcgaaag acttaaaaat caacaactta 6180
aaaaaggggg gtacgcaaca gctcattgcg gcaccccccg caatagctca ttgcgtaggt 6240
taaagaaaat ctgtaattga ctgccacttt tacgcaacgc ataattgttgc tcgcgctgcc 6300
gaaaagttgc agctgattgc gcatggtgcc gcaaccgtgc ggcacccta cccgatggag 6360
ataagcatgg ccacgcagtc cagagaaatc ggcattcaag ccaagaacaa gcccggtcac 6420
tgggtgcaaa cggaaacgca agcgcgatgag gcgtggggccg ggcttattgc gaggaaaccc 6480
acggcggcaa tgctgctgca tcacctcgtg gcgcagatgg gccaccagaa cgccgtggtg 6540
gtcagccaga agacactttc caagctcatc ggacgttctt tgcggacggt ccaatacgcga 6600

ES 2 780 827 T3

gtcaaggact tgggtggccga gcgctggatc tccgtcgtga agctcaacgg ccccggcacc 6660
 gtgtcggcct acgtgggtcaa tgaccgcgtg gcggtggggcc agccccgcga ccagttgcgc 6720
 ctgtcgggtgt tcagtgcgcg cgtgggtggtt gatcacgacg accaggacga atcgcgtgtt 6780
 gggcatggcg acctgcgccc catcccgacc ctgtatccgg gcgagcagca actaccgacc 6840
 ggccccggcg aggagccgcc cagccagccc ggcattccgg gcatggaacc agacctgcca 6900
 gccttgaccg aaacggagga atgggaacgg cgcgggcagc agcgcctgcc gatgcccgat 6960
 gagccgtgtt ttctggacga tggcgagccg ttggagccgc cgacacgggt cacgctgccg 7020
 cgccggtagc acttgggttg cgcagcaacc cgtaagtgcg ctgttcaga ctatcggctg 7080
 tagccgcctc gccgcctat accttgtctg cctccccgcg ttgcgtcgcg gtgcatggag 7140
 ccgggccacc tcgacctgaa tgggaagccg cggcacctcg ctaacggatt caccgttttt 7200
 atcaggctct gggaggcaga ataaatgatc atatcgtcaa ttattacctc cacggggaga 7260
 gcctgagcaa actggcctca ggcatttgag aagcacacgg tcacactgct tccggtagtc 7320
 aataaacggg taaaccagca atagacataa gcggctatth aacgaccctg ccctgaaccg 7380
 acgaccgggt cgaatttgct ttcgaatttc tgccattcat ccgcttatta tacttattca 7440
 ggcgtagcac cagggcttta agggcaccaa taactgcctt aaaaaatta cgccccgccc 7500
 tgccactcat cgcactcgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aaccctatt 7560
 tgtttattht tctaaataca ttcaaatacg tatccgctca tgagacaata accctgataa 7620
 atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt atgaagtttg gaaatatttg ttttctgtat 7680
 caaccaccag gtgaaactca taagctaagt aatggatcgc tttgttcggc ttggtatcgc 7740
 ctcagaagag tagggtttga tacatattgg acctagaac atcattttac agagtttgg 7800
 cttacgggaa atthattttgt tgctgcccgt aacctgttag gaagaactaa aacattaat 7860
 gttggcacta tgggggttgt tattccgaca gcacaccag ttcgacagtt agaagacgtt 7920
 ttattattag atcaaatgct gaaaggctgt ttaattttg gaaccgttcg agggctatac 7980
 cataaagatt ttcgagtatt tgggtgtgat atggaagagt ctcgagcaat tactcaaat 8040
 ttctaccaga tgataatgga aagcttacag acaggaacca ttagctctga tagtgattac 8100
 attcaatttc ctaaggttga tgtatatccc aaagtgtact caaaaaatgt accaacctgt 8160
 atgactgctg agtccgcaag tacgacagaa tggctagcaa tacaagggt accaatggtt 8220
 cttagttgga ttattggtac taatgaaaaa aaagcacaga tggaaactca taatgaaatt 8280
 gcgacagaat atggatcatga tataatctaa atagatcatt gtatgactta tatttgttct 8340
 gttgatgatg atgcacaaaa ggcgcaagat gtttgcggg agtttctgaa aaattggat 8400
 gactcatatg taaatgogac caatatcttt aatgatagca atcaaacctg tggttatgat 8460
 tatcataaag gtcaatggcg tgattttgtt ttacaaggac atacaaacac caatcgacgt 8520

ES 2 780 827 T3

gttgattata gcaatggtat taaccctgta ggcactcctg agcagtgat tgaaatcatt 8580
 caacgtgata ttgatgcaac gggattaca aacattacat gcggatttga agctaagga 8640
 actgaagatg aaataattgc ttccatgcga cgctttatga cacaagtgc tcctttctta 8700
 aaagaacctt aataaattac ttatttgata ctagagataa taaggaacaa gttatgaaat 8760
 ttggattatt ttttctaacc tttcagaaag atggaataac atctgangaa acgttggata 8820
 atatggtaaa gactgtcacg ttaattgatt caactaaata tcattttaat actgcctttg 8880
 ttaatgaaca tcacttttca aaaaatggta ttggtggagc acctattacc gcagctgggt 8940
 ttttattagg gttaacaaat aaattacata ttggttcatt aaatcaagta attaccaccc 9000
 atcacctgt acgtgtagca gaagaagcca gtttattaga tcaaatgtca gagggacgct 9060
 tcattcttgg ttttagtgac tgcgaaagtg atttcgaaat ggaatttttt agacgtcata 9120
 tctcatcaag gcaacaacaa tttgaagcat gctatgaaat aattaatgac gcattaacta 9180
 caggttattg tcatcccaa aacgactttt atgattttcc aaaggtttca attaatccac 9240
 actgttacag tgagaatgga cctaagcaat atgtatccgc tacatcaaaa gaagtcgtca 9300
 tgtgggcagc gaaaaaggca ctgcctttaa catttaagtg ggaggataat ttagaaacca 9360
 aagaacgcta tgcaattcta tataataaaa cagcacaaca atatggtatt gatatttogg 9420
 atgttgatca tcaattaact gtaattgcga acttaaatgc tgatagaagt acggctcaag 9480
 aagaagtgag agaatactta aaagactata tcaactgaaac ttaccctcaa atggacagag 9540
 atgaaaaaat taactgcatt attgaagaga atgcagttgg gtctcatgat gactattatg 9600
 aatcgacaaa attagcagtg gaaaaaacag ggtctaaaaa tattttatta tcctttgaat 9660
 caatgtccga tattaagat gtaaaagata ttattgatat gttgaaccaa aaaatcgaaa 9720
 tgaatttacc ataaagtagt actgttgtaa ttcattaagc attctgccga catggaagcc 9780
 atcacagacg gcatgatgaa cctgaatcgc cagcggcatc agcaccttgt cgccttgctg 9840
 ataatatattg cccatggtga aaacgggggc gaagaagttg tccatattgg ccacgtttaa 9900
 atcaaaactg gtgaaactca cccagggatt ggctgagacg aaaaacatat tctcaataaa 9960
 ccctttaggg aaataggcca ggtttccacc gtaacacgcc acatcttgcg aatatatgtg 10020
 tagaaactgc cggaaatcgt cgtggtattc actccagagc gatgaaaacg tttcagtttg 10080
 ctcatggaaa acggtgtaac aagggtgaac actatcccat atcaccagct caccgtcttt 10140
 cattgccata cggaaattccg gatgagcatt catcagggcg gcaagaatgt gaataaaggc 10200
 cggataaaac ttgtgcttat ttttctttac ggtctttaa aaggccgtaa tatccagctg 10260
 aacggtctgg ttataggtac attgagcaac tgactgaaat gcctcaaaat gttctttacg 10320
 atgccattgg gatatatcaa cgggtgtata tccagtgatt ttttctcca ttttagcttc 10380

ES 2 780 827 T3

cttagctcct gaaaatctcg ataactcaaa aaatacgccc ggtagtgatc ttatttcatt 10440
atggtgaaag ttggaacctc ttacgtgccg atcaacgtct cttttcggcc aaaagttggc 10500
ccagggcttc ccggtatcaa cagggacacc aggatttatt tattctgcga agtgatcttc 10560
cgtcacaggt atttattcga agacgaaagg gcctcgtgat acgcctatth ttataggtta 10620
atgtcatgat aataatggtt tcttagacgt caggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg 10680
cccgcgttcc tgctggcgct gggcctgttt ctggcgctgg acttcccgct gttccgtcag 10740
cagcttttcg cccacggcct tgatgatcgc ggcggccttg gcctgcatat cccgattcaa 10800
cggccccagg gcgtccagaa cgggcttcag gcgctcccga aggt 10844

<210> 12
<211> 128
5 <212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 12
gtctagttaa tgtgtaacgt aacattagct agattttttt attcaaaaaa atatttacaa 60
atattaggaa atttaagtgt aaaagagttg ataaatgatt atattgggac tataatataa 120
ttaaaggtc 128

10 <210> 13
<211> 2769
<212> ADN
15 <213> Fago 80alfa de Staphylococcus

<400> 13
attagacaac aaacaagtca ttgaaaattc cgacttatta ttcaaaaaga aatttgatag 60
cgcagatata caagctaggt taaaagtagg cgataaggta gaagttaaaa caatcgggta 120
tagaatacac tttttaaatt tatatccggt cttatacgaa gtaaagaagg tagataaaca 180
atgattaaac aaataactaag actattatc ttactagcaa tgtatgagtt aggtaagtat 240
gtaactgagc aagtatatat tatgatgacg gctaattgat atgtagaggt gccgagtgac 300
ttcgcgaagt tgagcgatca gtcagatttg atgagggcgg aggtgacgga gtagatgatg 360
tggttagtca tagcaattat attactagtc atcttattgt ttggtgtgat gttgcaagct 420
gaacagttaa aaggcgatgt gaaagttaa gagcgggaga tagagatatt aagaagtaga 480
ttgagacatt ttgaagatta aaaatatttg tatggagggt attcatgact aaaaagaaat 540
atggattaaa attatcaaca gttcgaagt tagaagatga gttgtgtgat taccctaatt 600
atcataagca actcgaagat ttaagaagtg aaataatgac accatggatt ccaacagata 660
caaatatagg cggggagttt gtaccgtcta atacatcgaa aacagaaatg gcagtaacta 720
attatctttg tagtatacga agaggtaaaa tccttgagtt taagagcgct attgaacgta 780
taatcaacac atcaagtagg aaagaacgcg aattcattca agagtattat ttttaataaaa 840

ES 2 780 827 T3

aggaattagt gaaagtttgt gatgacatac acatttctga tagaactgct catagaatca 900
 aaaggaaaat catatctaga ttggcggaag agttagggga agagtgaaat tggcagtaaa 960
 gtggcagttt ttgataccta aatgagata ttatgatagt gtaggatatt gactatctta 1020
 ctgcgtttcc cttatcgcaa ttaggaataa aggatctatg tgggttggct gattatagcc 1080
 aatccttttt taattttaaa aagcgtatag cgcgagagtt ggtggtaaata gaaatgaacg 1140
 aaaaacaaaa gagattcgca gatgaatata taatgaatgg atgtaatggg aaaaaagcag 1200
 caatttcagc aggttatagt aagaaaacag cagagtcttt agcaagtcga ttgttaagaa 1260
 atgttaatgt ttcggaatat attaaagaac gattagaaca gatacaagaa gagcgtttta 1320
 tgagcattac agaagcttta gcgttatctg cttctattgc tagaggagaa cctcaagagg 1380
 cttacagtaa gaaatatgac catttaaacg atgaagtgga aaaagagggt acttacacaa 1440
 tcacaccaac ttttgaagag cgtcagagat ctattgacca catactaaa gttcatgggtg 1500
 cgtatatcga caaaaaagaa attactcaga agaatttga gattaatatt ggtgagtacg 1560
 atgacgaaag ttaaattaaa ctttaacaaa ccatctaag ttttcaacag aaacatattc 1620
 gaaatactaa ccaattacga taacttact gaagtacatt acggtggagg ttcgagtgg 1680
 aagtctcaog gcgttataca aaaagttgta cttaaagcat tgcaagactg gaaatatcct 1740
 aggcgtatac tatggottag aaaagtcaa tcaacaatta aagatagttt attcgaagat 1800
 gtcaaagatt gtttgataaa cttcggatt tgggacatgt gcctttggaa taagactgat 1860
 aacaaagttg aattgcaaaa cggcgcagtt tttttgtta aaggattaga taaccagag 1920
 aaaataaagt cgataaaagg catatcagac atagtcatgg aagaagcgtc tgaattcaca 1980
 ctaaattgatt acacgcaatt aacgttgcgt ttgagggagc gtaaacacgt gaataagcaa 2040
 atatttttga tgtttaaccc agtatctaaa ctgaattggg tttataagta tttctttgaa 2100
 catggtgaac caatggaaaa tgtcatgatt agacaatcta gttatcgaga taataagttt 2160
 cttgatgaaa tgacacgaca aaacttagag ttgtagcaa atcgtaatcc agcatattac 2220
 aaaatttatg cgttaggtga attttctaca ctagacaaat tggttttccc taagtatgaa 2280
 aaacgtttaa taaataaaga tgagttaaga catttacctt cttattttgg attggacttt 2340
 ggctacgtta atgatcctag tgcttttata cattctaaaa tagatgtaa gaaaaagaag 2400
 ttatacatca ttgaagagta tgtaaacaa ggtatgctga atgatgaaat agctaatgct 2460
 ataaagcaac ttggttatgc taaagaagaa attacagcag atagtgcaga acaaaaaagt 2520
 atagctgaat taaggaatct agggcttaaa aggattttac caaccaaaa agggaagggc 2580
 tcggttgtag aagggttaca attcttaatg caatttgaaa tcattgttga tgaacgttgt 2640
 ttcaagacta ttgaagagtt tgacaactac acatggcaaa aggacaaaga tacaggtgaa 2700

ES 2 780 827 T3

	tataccaatg aaccagtaga tacatacaat cattgtatcg attcgttgcg ttattcagtg	2760
	gaacgattc	2769
	<210> 14	
	<211> 10319	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético	
10	<400> 14	
	ggcgccatgg ttaagggccc ttgcggaag gagttagtaa gttaacagaa gacgaaccaa	60
	aactaaatgg tttagcagga aacttagata aaaaaatgaa tccagaatta tattcagaac	120
	aggaacagca acaagaacaa caaaagaatc aaaaacgaga tagaggtagt cacttataga	180
	acatgcattt atgcccagaa aacttattgg ttggaatggg ctatgtgta gctaacttgt	240
	tagcgagttg gttggacttg aattgggatt aatccaaga aagtaccaac tcaacaacac	300
	ataaagccct gtaggttccg accaataagg aaattggaat aaagcaataa aaggagttga	360
	agaaatgaaa ttcagagaag cctttgagaa tttataaca agtaagtatg tacttgggtg	420
	tttagtagtc ttaactgttt accagataat acaaatgctt aaataaaaaa agacttgatc	480
	tgattagacc aaatcttttg atagtgttat attaataaca aaataaaaag gagtcgctca	540
	cgccctacca aagtttgtga acgacatcat tcaaagaaaa aaacactgag ttgtttttat	600
	aatcttgtat atttagatat taaacgatat ttaaatatac atcaagatat atatttgggt	660
	gagcgattac ttaaacgaaa ttgagattaa ggagtcgatt ttttatgtat aaaaacaatc	720
	atgcaaatca ttcaaatcat ttggaaaatc acgatttaga caatttttct aaaaccggct	780
	actctaatag ccggttggac gcacatactg tgtgcatatc tgatccaaaa ttaagttttg	840
	atgcaatgac gatcgttggg aatctcaacc gagacaacgc tcaggccctt tctaaattta	900
	tgagtgtaga gcccacaata agactttggg atattcttca aacaaagttt aaagctaaag	960
	cacttcaaga aaaagtttat attgaatatg acaaagttaa agcagatagt tgggatagac	1020
	gtaatatgcg tattgaattt aatccaaca aacttacacg agatgaaatg atttggttaa	1080
	aacaaaatat aataagctac atggaagatg acggttttac aagattagat ttagcctttg	1140
	attttgaaga tgatttgagt gactactatg caatgtctga taaagcagtt aagaaaacta	1200
	ttttttatgg tcgtaatggg aagccagaaa caaatattt tggcgtgaga gatagtaata	1260
	gatttattag aatttataat aaaaagcaag aacgtaaaga taatgcagat gctgaagtta	1320
	tgtotgaaca tttatggcgt gtagaaatcg aacttaaaag agatattggtg gattactgga	1380
	atgattgctt tagtgattta catatcttgc aaccagattg gaaaactatc caacgcactg	1440

ES 2 780 827 T3

cggatagagc aatagttttt atgttattga gtgatgaaga agaatgggga aagcttcaca 1500
 gaaattctag aacaaaatat aagaatttga taaaagaaat ttcgccagtc gatttaacgg 1560
 acttaatgaa atcgacttta aaagcgaacg aaaaacaatt gcaaaaacaa atcgattttt 1620
 ggcaacatga atttaaattt tggaaatagt gtacatatta atattactga acaaaaatga 1680
 tatatttaaa ctattctaatt ttaggaggat ttttttatga agtgtctatt taaaaatttg 1740
 gggaatttat atgaggtgaa agaataattt acccctataa actttagcca cctcaagtaa 1800
 agaggtaaaa ttgttttagtt tatataaaaa atttaaaggt ttgttttata gcgttttatt 1860
 ttggctttgt attctttcat ttttttagtgt attaaatgaa atggttttaa atgtttcttt 1920
 acctgatatt gcaaatcatt ttaatactac tcctggaatt acaaactggg taaacactgc 1980
 atatatgtta actttttcga taggaacagc agtatatgga aaattatctg attatataaa 2040
 tataaaaaaa ttgttaatta ttggtattag tttgagctgt cttggttcat tgattgcttt 2100
 tattgggccc acctaggcaa atatgctctt acgtgctatt atttaagtga ctatttaaaa 2160
 ggagttaata aatatgcggc aaggtattct taaataaact gtcaatttga tagcgggaac 2220
 aaataattag atgtcctttt ttaggagggc ttagtttttt gtaccagtt taagaatacc 2280
 tttatcatgt gattctaaag tatccagaga atatctgtat gctttgtata cctatggtta 2340
 tgcataaaaa tcccagtgat aaaagtattt atcactggga tttttatgcc cttttgggtt 2400
 tttgaatgga ggaaaatcac atgaaaatta ttaatattgg agttttagct catgttgatg 2460
 caggaaaaac taccttaaca gaaagcttat tatataacag tggagcgatt acagaattag 2520
 gaagcgtgga caaaggtaaca acgaggacgg ataatacgtt ttagaacgt cagagaggaa 2580
 ttacaattca gacaggaata acctcttttc agtgggaaaa tacgaagggtg aacatcatag 2640
 acacgccagg acatatggat ttcttagcag aagtatatcg ttcattatca gttttagatg 2700
 gggcaattct actgatttct gcaaaagatg gcgtacaagc acaaactcgt atattatttc 2760
 atgcacttag gaaaatgggg attcccacaa tcttttttat caataagatt gaccaaaatg 2820
 gaattgattt atcaacgggt tatcaggata ttaaagagaa actttctgcc gaaattgtaa 2880
 tcaaacagaa ggtagaactg tatecctaata tgtgtgtgac gaactttacc gaatctgaac 2940
 aatgggatac ggtaatagag ggaaacgata accttttaga gaaatatatg tccggtaaat 3000
 cattagaagc attggaactc gaacaagagg aaagcataag atttcagaat tgttctctgt 3060
 tccctcttta tcatggaagt gcaaaaagta atatagggat tgataacctt atagaagtta 3120
 ttactaataa attttattca tcaacacatc gaggtccgtc tgaactttgc ggaaatgttt 3180
 tcaaaattga atatacaaaa aaaagacaac gtcttgcata tatacgcctt tatagtggag 3240
 tactacattt acgagattcg gttagagtat cagaaaaaga aaaaataaaa gttacagaaa 3300
 tgtatacttc aataaatggg gaattatgta agattgatag agcttattct ggagaaattg 3360

ES 2 780 827 T3

ttatsttttgc	aaatgagttt	ttgaagttaa	atagtgttct	tggagataca	aaactattgc	3420
cacagagaaa	aaagattgaa	aatccgcacc	ctctactaca	aacaactggt	gaaccgagta	3480
aacctgaaca	gagagaaatg	ttgcttgatg	cccttttggg	aatctcagat	agtgatccgc	3540
ttctacgata	ttacgtggat	tctacgacac	atgaaattat	actttctttc	ttagggaaag	3600
tacaaatgga	agtgattagt	gcactgttgc	aagaaaagta	tcatgtggag	atagaactaa	3660
aagagcctac	agtcatttat	atggagagac	cgttaaaaaa	tgcagaatat	accattcaca	3720
togaagtgcc	gocaaatcct	ttctgggctt	ccattgggtt	atctgtatcg	ccgcttccgt	3780
tgggaagtgg	aatgcagtat	gagagctcgg	tttctcttgg	atacttaaata	caatcatttc	3840
aaaatgcagt	tatggaaggg	gtacgctatg	gttgcgaaca	aggattatat	ggttggaatg	3900
tgacggattg	taaaatctgt	tttaagtacg	gtttatacta	tagccctggt	agtactccag	3960
cagatstttcg	gatgcttact	cctattgtac	tggagcaagc	ctttagaaaa	gctggaacag	4020
aattgttaga	gccatatctt	agttttaaag	tttatgcacc	acaggaatat	ctttcacggg	4080
catataacga	tgctcccaaa	tattgtgcaa	atatcgtaaa	tactcaactg	aaaaataatg	4140
aggtcattat	tattggagaa	attcctgctc	gatgtattca	agattatcgc	aatgatttaa	4200
ctsttttttac	aaatgggctt	agtgtttggt	tagcagagct	aaaaggatat	caggttacca	4260
ctggcgaacc	tgtttgccag	accgctcgtc	taaatagtcg	gatagataaa	gtaagatata	4320
tgttcaataa	aataacttag	tgctgtttat	gttgttatat	aaatatgggt	tcttattaaa	4380
taagatgaaa	tattctttaa	tatagatttg	aattaaagtg	gaaaggagga	gattgttatt	4440
ataaactaca	agtggatatt	gtgtcctagt	tgtggaaata	aaacaagact	acgaatacga	4500
gtggatacta	tacttaaaaa	tttcccttta	tacagcccca	aatgtaagaa	cgaaacttta	4560
attaatgttc	aaaaaatgaa	tataataaca	atcaaagagc	cagacgccaa	gacgcagagc	4620
cgataatsttg	agaaatgaaa	ctctcatctt	atcggctctt	tttgtttatc	tgaatstttac	4680
tgactagcct	tcaatatttc	cgcggccagc	ttactatgcc	attattaagc	ttgtaatatc	4740
ggagggttta	ttaattggca	gtaaagtggc	agttstttgat	accttaaatg	agatattatg	4800
atagtgtagg	atattgacta	tcgtactcgc	tttccctacc	gcaaattagg	aataaaggat	4860
ctatgtgggt	tggctgatta	tagccaatcc	ttsttttaatt	ttaaaaagcg	tatagcgcga	4920
gagttgggtgg	taaatgaaat	gaacgaaaaa	caaaagagat	tcgcagatga	atatataatg	4980
aatggatgta	atggtaaaaa	agcagcaatt	acagtagggt	atagtaagaa	aacagcagag	5040
tcttttagcaa	gtcgattggt	aagaaatggt	aatgtsttcgg	aatatattaa	agaacgatta	5100
gaacaggtac	aagaagagcg	tttaatgagt	attacagaag	ctttagcgtt	atctgcttct	5160
attgctagag	gagaacctca	agaggcttac	agtaagaaat	atgaccattt	aaacgatgaa	5220

ES 2 780 827 T3

gtggaaaaag aggttactta cacaatcaca ccaacttttg aagagcgtca gagatctatt 5280
 gaccacatac taaaagtaca tgggtgcgtat atcgataaaa aagaaattac tcagaagaat 5340
 attgagatta atattggtga gtacgatgac gaaagttaaa ttgaacttta acaaaccgtc 5400
 taatgttttc aatagccgcg ggggcccac acaccaactt ttgaagagcg tcagagatct 5460
 attgaccaca tactaaaagt acatggtgcg tatatcgata aaaaagaaat tactcagaag 5520
 aatattgaga ttaatattgg tgagtacgat gacgaaagtt aaattaaact ttaacaaacc 5580
 gtctaattgtt ttcaatagcc gcgggggccc aacgagcggc cgcatagtta agccagcccc 5640
 gacacccgcc aacacccgct gacgcgccct gacgggcttg tctgctcccg gcacccgctt 5700
 acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca gaggttttca ccgatcacac 5760
 cgaaacgcgc gagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt tttatagggt aatgtcatga 5820
 taataatggt ttcttagacg tcaggtggca ctttccgggg aatgtgccc ggaaccccta 5880
 tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat 5940
 aatgcttca ataattattga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgcgc 6000
 ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc tcaccagaa acgctggtga 6060
 aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca 6120
 acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg atgagcactt 6180
 ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccgggcaa gagcaactcg 6240
 gtcgcccgat acaactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccggtc acagaaaagc 6300
 atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata 6360
 acaactgoggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt 6420
 tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag 6480
 ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtagc aatggcaaca acgttgcgca 6540
 aactattaac tggcgaacta ctactctag ctcccggca acaattaata gactggatgg 6600
 aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggctggc tggtttattg 6660
 ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctgcgggtat cattgcagca ctggggccag 6720
 atggttaagc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca actatggatg 6780
 aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg taactgtcag 6840
 accaagttta ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga 6900
 tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgacccaaat cccttaacgt gagttttcgt 6960
 tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat ctttttttc 7020
 tgccgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg gtttttttgc 7080
 cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac 7140

ES 2 780 827 T3

caaatactgt tcttctagt tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac 7200
 cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt 7260
 cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga taaggcgag cggtcgggct 7320
 gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaacctgaga 7380
 tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc acgcttcccg aaggagagaaa ggcggacagg 7440
 tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac 7500
 gcctggatc tttatagtcc tgtcgggtt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg 7560
 tgatgctcgt caggggggag gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg 7620
 ttctggcct tttgctggcc ttttctcac atgttcttcc ctgcgttacc ccctgattct 7680
 gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga gctggcgggt ctagttaatg tgtaacgtaa 7740
 cattagctag atttttttat tcaaaaaaat atttacaat attaggaaat ttaagtgtaa 7800
 aagagttgat aatgattat attgggacta taatataatt aaggctcatt gaattcgtta 7860
 actaattaat caccaaaaag gaatagagta tgaagtttg aaatatttgt ttttcgtatc 7920
 aaccaccagg tgaaactcat aagcaagtaa tggatcgctt tgttcggctt ggtatcgct 7980
 cagaagaggt agggtttgat acatattgga ccttagaaca tcattttaca gagtttggtc 8040
 ttacgggaaa tttatttgtt gctgcggcta acctgtagg aagaactaaa acattaaatg 8100
 ttggcactat gggggttgtt attccgacag cacaccagc tcgacagta gaagacgttt 8160
 tattattaga tcaaatgtcg aaaggtcgtt ttaattttgg aaccgttcga gggctatacc 8220
 ataaagattt tcgagtattt ggtgttgata tggaagagtc tcgagcaatt actcaaaatt 8280
 tctaccagat gataatggaa agcttacaga caggaacct tagctctgat agtgattaca 8340
 ttcaatttcc taaggttgat gtatatccca aagtgtactc aaaaaatgta ccaacctgta 8400
 tgactgctga gtccgcaagt acgacagaat ggctagcaat acaagggcta ccaatggttc 8460
 ttagttggat tattggtact aatgaaaaa aagcacagat ggaactctat aatgaaattg 8520
 cgacagaata tggatcatgat atatctaaa tagatcattg tatgacttat attgttctg 8580
 ttgatgatga tgcacaaaag gcgcaagatg tttgtcggga gtttctgaaa aattggtatg 8640
 actcatatgt aatgcgacc aatatcttta atgatagcaa tcaaactcgt ggttatgatt 8700
 atcataaagg tcaatggcgt gattttgttt tacaaggaca tacaacacc aatcgacgtg 8760
 ttgattatag caatggtatt aaccccgtag gcaactctga gcagtgtatt gaaatcattc 8820
 aacgtgatat tgatgcaacg ggtattacaa acattacatg cggatttgaa gctaatggaa 8880
 ctgaagatga aataattgct tccatgcgac gctttatgac acaagtcgct ctttcttaa 8940
 aagaacctaa ataaattact tatttgatac tagagataat aaggaacaag ttatgaaatt 9000

ES 2 780 827 T3

tggattatth tttctaaact ttcagaaaga tggataaca tctgaagaaa cgttggataa 9060
tatggtaaag actgtcacgt taattgattc aactaaatat cattttaata ctgcctttgt 9120
taatgaacat cacttttcaa aaaatggtat tgttggagca cctattaccg cagctggttt 9180
tttattaggg ttaacaaata aattacatat tggttcatta aatcaagtaa ttaccacca 9240
tcacctgta cgtgtagcag aagaagccag tttattagat caaatgtcag agggacgctt 9300
cattcttggg tttagtgact gcgaaagtga tttcgaaatg gaatttttta gacgtcatat 9360
ctcatcaagg caacaacaat ttgaagcatg ctatgaaata attaatgacg cattaactac 9420
aggttattgc catcccaaa acgactttta tgattttcca aaggtttcaa ttaatccaca 9480
ctgttacagt gagaatggac ctaagcaata tgtatccgct acatcaaaag aagtcgtcat 9540
gtgggcagcg aaaaaggcac tgcctttaac gtttaagtgg gaggataatt tagaaaccaa 9600
agaacgctat gcaattctat ataataaaac agcacaacaa tatggtattg atatttcgga 9660
tgttgatcat caattaactg taattgcaa cttaaatgct gatagaagta cggctcaaga 9720
agaagtgaga gaatacttaa aagactatat cactgaaact taccctcaa tggacagaga 9780
tgaaaaaatt aactgcatta ttgaagagaa tgcagttggg tctcatgatg actattatga 9840
atcgacaaaa ttagcagtg aaaaacagg gtctaaaaat attttattat cctttgaatc 9900
aatgtccgat attaaagatg taaaagatat tattgatatg ttgaaccaa aatcgaaat 9960
gaatttacca taataaaatt aaaggcaatt tctatattag attgcctttt tggcgcgcct 10020
attctaagtc ataataaata ctgataacat cttatatttt gtattatatt ttgtattatc 10080
gttgacatgt ataattttga tatcaaaaac tgattttccc tctattattt tgcagattta 10140
ttttottaat tctctttaac aaactagaaa tattgtatat acaaaaaatt ataaataata 10200
gatgaatagt ttaattatag gtgttcatca atcgaaaaag caacgtatct tatttaaagt 10260
gcgttgcttt tttctcattt ataaggttaa ataattctca tatatcaagc aaagtgaca 10319

<210> 15
<211> 2088
5 <212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 15
tatactacaa atgtagtctt atataaggag gatattgatg aaaaagataa aaattgttcc 60
acttatttta atagttgtag ttgtcgggtt tggatataat ttttatgctt caaaagataa 120
agaaattaat aatactattg atgcaattga agataaaaaat ttcaaacaag tttataaaga 180
tagcagttat atttctaaaa gcgataatgg tgaagtagaa atgactgaac gtccgataaa 240
aatatataat agtttaggcg ttaaagatat aaacattcag gatcgtaaaa taaaaaaagt 300
atctaaaaat aaaaaacgag tagatgctca atataaaatt aaaacaaact acggtaacat 360

10

ES 2 780 827 T3

tgatcgcaac gttcaattta attttgtaa agaagatggt atgtggaagt tagattggga 420
 tcatagcgtc attattccag gaatgcagaa agaccaaagc atacatattg aaaatttaaa 480
 atcagaacgt ggtaaaattt tagaccgaaa caatgtggaa ttggccaata caggaacagc 540
 atatgagata ggcacgttc caaagaatgt atctaaaaaa gattataaag caatcgctaa 600
 agaactaagt atttctgaag actatatcaa acaacaaatg gatcaaaatt ggtacaaga 660
 tgataccttc gttccactta aaaccgtaa aaaaatggat gaatatttaa gtgatttcgc 720
 aaaaaaattt catcttacia ctaatgaaac agaaagtcgt aactatcctc tagaaaaagc 780
 gacttcacat ctattagggt atgttggtcc cattaactct gaagaattaa acaaaaaaga 840
 atataaaggc tataaagatg atgcagttat tggtaaaaag ggactcgaaa aactttacga 900
 taaaagctc caacatgaag atggctatcg tgtcacaatc gttgacgata atagcaatac 960
 aatcgcacat acattaatag agaaaaagaa aaaagatggc aaagatattc aactaactat 1020
 tgatgctaaa gttcaaaaga gtatttataa caacatgaaa aatgattatg gctcaggtac 1080
 tgctatccac cctcaaacag gtgaattatt agcacttgta agcacacctt catatgacgt 1140
 ctatccattt atgtatggca tgagtaacga agaataat aaattaaccg aagataaaaa 1200
 agaacctctg ctcaacaagt tccagattac aacttcacca ggttcaactc aaaaaatatt 1260
 aacagcaatg attgggttaa ataacaaaac attagacgat aaaacaagtt ataaaatcga 1320
 tggtaaaggt tggcaaaaag ataatcttg gggtggttac aacgttacia gatatgaagt 1380
 ggtaaatggt aatatcgact taaaacaagc aatagaatca tcagataaca ttttctttgc 1440
 tagagtagca ctcgaattag gcagtaagaa atttgaaaaa ggcatgaaaa aactaggtgt 1500
 tggatgaagat ataccaagt attatccatt ttataatgct caaatttcaa acaaaaattt 1560
 agataatgaa atattattag ctgattcagg ttacggacia ggtgaaatac tgattaaccc 1620
 agtacagatc ctttcaatct atagcgcatt agaaaataat ggcaatatta acgcacctca 1680
 cttattaaaa gacacgaaaa acaaagtttg gaagaaaaat attatttcca aagaaaatat 1740
 caatctatta actgatggta tgcaacaagt cgtaaataaa acacataaag aagatattta 1800
 tagatcttat gcaaaactta ttggcaaatc cggactgca gaactcaaaa tgaacaagc 1860
 agaaactggc agacaaattg ggtggtttat atcatatgat aaagataatc caaacatgat 1920
 gatggctatt aatgttaaag atgtacaaga taaaggaatg gctagctaca atgccaaaat 1980
 ctcaggtaaa gtgtatgatg agctatatga gaacggtaat aaaaaatagc atatagatga 2040
 ataacaaaac agtgaagcaa tccgtaacga tggttgcttc actgtttt 2088

<210> 16
 <211> 2075
 <212> ARN
 <213> Staphylococcus aureus

5

<400> 16

ES 2 780 827 T3

uagucuuuaa	uaaggaggau	auugaugaaa	aagauaaaaa	uuguuccacu	uauuuuaaua	60
guuguaguug	ucggguuugg	uauauuuuuu	uaugcuuca	aagauaaaga	aauuuaaua	120
acuauugaug	caauugaaga	uaaaaauuuc	aaacaaguuu	auaaagauag	caguuaauuu	180
ucuaaaagcg	auaaugguga	aguagaaaug	acugaacguc	cgauaaaaau	auauaaauagu	240
uuaggcguaa	aagauuuaaa	cauucaggau	cguaaaauaa	aaaaaguauc	uaaaaauaaa	300
aaacgaguag	augcucaaua	uaaaauuaaa	acaacuacg	guaacauuga	ucgcaacguu	360
cauuuaauu	uuguuaaaga	agaugguau	uggaaguug	auugggauca	uagcgucuu	420
auuccaggaa	ugcagaaaga	ccaaagcaua	cauauugaaa	auuuuuuuuc	agaacguggu	480
aaaauuuag	accgaaaca	uguggaaug	gccauacag	gaacagcaua	ugagauaggc	540
aucguuccaa	agauguauc	uaaaaaagau	uauaaagcaa	ucgcuaaaga	acuaaguauu	600
ucugaagacu	auaucaaaaca	acaaauggau	caaaauggg	uacaagauga	uaccuucguu	660
ccacuuaaaa	ccguuaaaaa	aauggaugaa	uauuuagug	auuucgcaa	aaaauuucau	720
cuuacaacua	augaaacaga	aagucguaac	uauccucuag	aaaaagcgac	uucacauca	780
uuagguuau	uuggucccau	uaacucugaa	gaauuuuuac	aaaaagaaua	uaaaggcuau	840
aaaugaug	caguuaauug	uaaaaaggga	cucgaaaaac	uuuacgauaa	aaagcuccaa	900
caugaaug	gcuaucgugu	cacaucguu	gacgauaaua	gcaauacaau	cgcacauaca	960
uuauuagaga	aaaagaaaaa	agauggcaa	gauauucaac	uaacuauuga	ugcuaaaguu	1020
caaaagagua	uuuuaaaca	caugaaaaau	gauuauuggcu	cagguacugc	uauccacccu	1080
caaacaggug	auuuuuuagc	acuuguaagc	acaccuucuu	augacgucua	uccauuuuag	1140
uauuggauga	guaacgaaga	auauauuaaa	uuuaccgaag	auaaaaaaga	accucugcuc	1200
aacaaguucc	agauuacaac	uucaccaggu	ucaacucaaa	aaauuuuac	agcaaugauu	1260
ggguuaaaau	acaaaacauu	agacgauaaa	acaaguuaa	aaucgaugg	uaaaggguugg	1320
caaaaagaua	aaucuuuuuu	ugguuacaac	guuacaagau	augaaguggu	aaaugguaau	1380
aucgacuuaa	aacaagcaau	agaaucauca	gauaacuuuu	ucuuugcuag	aguagcacuc	1440
gaauuaggca	guaagaaauu	ugaaaaaggc	augaaaaaac	uagguguugg	ugaagauua	1500
ccaagugauu	auccauuuuu	uaaugcucaa	auuucacaac	aaaauuuaga	uaaugaaaua	1560
uuuuuagcug	auucagguua	cgacaaaggu	gaaauacuga	uuuaccaggu	acagauccuu	1620
ucaaucuaaa	gcgcauuaga	aaauuuuuuu	aaauuuuacg	caccucacuu	auuuuuuagc	1680
acgaaaaaca	aaguuuuggaa	gaaaaauuuu	auuuccaaag	aaaauuucaa	ucuuuuuacu	1740
gaugguauugc	aacaagucgu	aaauuuuuuu	cauuuuuaga	auuuuuuag	auuuuuuagc	1800
aacuuuuuug	gcauuuuuuu	uacugcagaa	cuuuuuuaga	aacaaggaga	aacuggcaga	1860

ES 2 780 827 T3

caaaauugggu gguuuauauc auaugauaaa gauaauccea acaugaugau ggcuauuaau 1920
 guuaaagaug uacaagauaa aggaauggcu agcuacaaug ccaaaaucuc agguaaagug 1980
 uaugaugagc uauaugagaa cgguaauaaa aaauacgaua uaugaugaaua acaaaacagu 2040
 gaagcaaucc guaacgaugg uugcuucacu guuuu 2075

5 <210> 17
 <211> 2166
 <212> ADN
 <213> Vibrio fischeri

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1194) . . (1194)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 17
 ggcttaata aacagaatca ccaaaaagga atagagtatg aagtttgaa atatttgttt 60
 ttogtatcaa ccaccaggtg aaactcataa gctaagtaat ggatcgcttt gttcggcttg 120
 gtatcgctc agaagagtag ggttgatac atattggacc ttagaacatc attttacaga 180
 gtttggtctt acgggaaatt tatttgttgc tgcggctaac ctgtaggaa gaactaaaac 240
 attaaatggt ggcactatgg gggttggtat tccgacagca caccagttc gacagttaga 300
 agacgtttta ttattagatc aaatgtcgaa aggtcgtttt aattttggaa ccgttcgagg 360
 gctataccat aaagattttc gagtatttgg tgttgatatg gaagagtctc gagcaattac 420
 tcaaaatttc taccagatga taatggaaag cttacagaca ggaaccatta gctctgatag 480
 tgattacatt caatttccta aggttgatgt atatcccaa gtgtactcaa aaaatgtacc 540
 aacctgatg actgctgagt ccgcaagtac gacagaatgg ctagcaatac aagggctacc 600
 aatggttctt agttggatta ttggtactaa tgaaaaaaaa gcacagatgg aactctataa 660
 tgaaattgcg acagaatatg gtcattgatat atctaaaata gatcattgta tgacttatat 720
 ttgttctggt gatgatgatg cacaaaaggc gcaagatggt tgtcgggagt ttctgaaaaa 780
 ttggtatgac tcatatgtaa atgcgaccaa tatctttaat gatagcaatc aaactcgtgg 840
 ttatgattat cataaaggtc aatggcgtga ttttgtttta caaggacata caaacaccaa 900
 tcgacgtggt gattatagca atggtattaa ccctgtaggc actcctgagc agtgtattga 960
 aatcattcaa cgtgatattg atgcaacggg tattacaaac attacatgcg gatttgaagc 1020
 taatggaact gaagatgaaa taattgcttc catgcgacgc tttatgacac aagtcgctcc 1080
 tttcttaaaa gaacctaaat aaattactta tttgatacta gagataataa ggaacaagtt 1140
 atgaaatttg gattatTTTT tctaaacttt cagaaagatg gaataacatc tgangaaacg 1200
 ttggataata tggtaaagac tgtcacgtta attgattcaa ctaaatatca ttttaatact 1260

15

ES 2 780 827 T3

gcctttgtta atgaacatca cttttcaaaa aatggtattg ttggagcacc tattaccgca 1320
gctgggttttt tattagggtt aacaaataaa ttacatattg gttcattaaa tcaagtaatt 1380
accacccatc accctgtacg tgtagcagaa gaagccagtt tattagatca aatgtcagag 1440
ggacgcttca ttcttggttt tagtgactgc gaaagtgatt tcgaaatgga attttttaga 1500
cgtcatatct catcaaggca acaacaattt gaagcatgct atgaaataat taatgacgca 1560
ttaactacag gttattgtca tccccaaaac gacttttatg attttccaaa ggtttcaatt 1620
aatccacact gttacagtga gaatggacct aagcaatag tatccgctac atcaaaagaa 1680
gtcgtcatgt gggcagcgaa aaaggcactg cctttaacat ttaagtggga ggataattta 1740
gaaaccaaag aacgctatgc aattctatat aataaaacag cacaacaata tggattgat 1800
atctcggatg ttgatcatca attaactgta attgcgaact taaatgctga tagaagtacg 1860
gctcaagaag aagtgagaga atacttaaaa gactatatca ctgaaactta ccctcaaatg 1920
gacagagatg aaaaaattaa ctgcattatt gaagagaatg cagttgggtc tcatgatgac 1980
tattatgaat cgacaaaatt agcagtggaa aaaacagggg ctaaaaatat tttattatcc 2040
tttgaatcaa tgtccgatat taaagatgta aaagatatta ttgatatggt gaaccaaaaa 2100
atcgaaatga atttaccata ataaaattaa aggcaatttc tatattagat tgccttttta 2160
aatttc 2166

<210> 18
<211> 2143
5 <212> ARN
<213> Vibrio fischeri

<400> 18
aaucaccaaa aaggaauaga guauguaguu uggaaauuu uguuuuucgu aucaaccacc 60
aggugaaacu cauaagcuua guaauggauc gcuuuguucg gcuugguaucc gccucagaag 120
aguaggguuu gauacauuu ggaccuuaga acaucauuuu acagaguuug gucuucacggg 180
aaauuuuuuu guugcugcgg cuaaccuguu aggaagaacu aaaacauuaa auguuggcac 240
uauggggguu guuuauccga cagcacaccc aguucgacag uuagaagacg uuuuauuuuu 300
agaucaaaug ucgaaagguc guuuuaauuu uggaaccguu cgagggcuau accauaaaga 360
uuuucgagua uuugguguug auauggaaga gucucgagca auuacucaa auuucuaacca 420
gaugauaaug gaaagcuuac agacaggaac cauuagcucu gauagugauu acauucauuu 480
uccuaagguu gauguauauc ccaaagugua cucaaaaaau guaccaaccu guaugacugc 540
ugaguccgca aguacgacag aaugguagc aaucacaggg cuaccaaugg uucuuaguug 600
gauuuuuggu acuaaugaaa aaaaagcaca gauggaacuc uauaaugaaa uugcgacaga 660
auauggucau gauauaucua aaauagauca uuguauagacu uauuuuuguu cuguugauga 720

10

ES 2 780 827 T3

ugaugcacia aaggcgcaag auguuugucg ggaguuucug aaaaauuggu augacucaua 780
 uguaaaugcg accaauaucu uuaaugauag caaucaaacu cgugguuaug auuaucauaa 840
 aggucaaugg cgugauuuug uuuuacaagg acauacaaac accaaucgac guguugauua 900
 uagcaauggu auuaaccug uaggcacucc ugagcagugu auugaaauc uucaacguga 960
 uauugaugca acggguauua caaacauuac augcggauuu gaagcuaaug gaacugaaga 1020
 ugaaaauuuu gcuuccaugc gacgcuuuau gacacaaguc gcuccuuucu uaaaagaacc 1080
 uaaaauuuu acuuuuuga uacuagagau auaaggaac aaguuuuga auuuugauua 1140
 uuuuuucuaa acuuucagaa agauggaaua acaucugaag aaacguugga uaaauuggua 1200
 aagacuguca cguaauuga uucaacuaaa uaucuuuuu auacugccuu uguuaaugaa 1260
 caucacuuuu caaaaaaugg uauuguugga gcaccuauua cgcgagcugg uuuuuuauua 1320
 gguuaaaca auaaaauaca uauugguua uaaaaucaag uaaauaccac ccaucacccu 1380
 guacguguag cagaagaagc caguuuuua gaucaaaugu cagagggacg cuucauucuu 1440
 gguuuuagug acugcgaaag ugauuucgaa auggaauuuu uuagacguca uaucucauca 1500
 aggcaacaac auuuugaagc augcuugaa auuuuuuug acgcauuuac uacagguuau 1560
 ugucauuccc aaaacgacu uuaugauuuu ccaagguuu cauuuaucc acacuguuac 1620
 agugagaug gaccuaagca auauguaucc gcuacauca aagaagucgu caugugggca 1680
 gcgaaaaagg cacugccuu aacuuuuuag ugggaggaua auuuagaaac caaagaacgc 1740
 uaugcaauuc uauuuuuua aacagcacia caauauggua uugauuuuuc ggauguugau 1800
 caucauuuaa cuguauuugc gaacuuuuu gcugauugaa guacggcuca agaagaagug 1860
 agagaauacu uaaaagacua uaucacugaa acuuaccuc aaauggacag agaugaaaaa 1920
 auuaacugca uuauugaaga gaugcaguu gggucucaug augacuauua ugaucgaca 1980
 aaauuagcag uggaaaaaac agggucuaaa auuuuuuuu uauccuuuga aucaaugucc 2040
 gauuuuuuag auguuuuuaga uuuuuuugau auguugaacc aaaaaucga auugaauuuu 2100
 ccuuuuuuu auuuuaggca auuucuuuu uagauugccu uuu 2143

<210> 19
 <211> 2294
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

<400> 19
 aaaggcauga aaaaacuugg uaucuucc accaccuagc uuuuuugaagg auuugaguau 60
 gaaguugga auuuuugguu guucguauca accaccaggu gaaacucaua agcuuuaggc 120

ES 2 780 827 T3

augaaaaaac	uaggugaucu	ucaccaacac	cuaguuuuuu	caaggaauug	aguaugaagu	180
uuggaaaauu	uuguuuuucg	uaucaccac	caggugaaac	ucauaagcua	aguaauggau	240
cgcuuuguuc	ggcuugguau	cgccucagaa	gaguaggguu	ugauacauau	uggaccuuag	300
aacaucauuu	uacagaguuu	ggucuuacgg	gaaauuuauu	uguugcugcg	gcuaaccugu	360
uaggaagaac	uaaaacauua	aauguuggca	cuauugggggu	uguuuauuccg	acagcacacc	420
caguucgaca	guuagaagac	guuuuauuau	uagaucaaa	gucgaaaggu	cguuuuaauu	480
uuggaacCGU	ucgagggcua	uaccauaaag	auuuucgagu	auuugguguu	gauauggaag	540
agucucgagc	aauuacucua	aauuucuaac	agaugauaa	ggaaagcuua	cagacaggaa	600
ccauuagcuc	ugauagugau	uacauucaau	uuccuaaggu	ugauguauau	cccaaagugu	660
acucaaaaaa	uguaccaacc	uguauagacug	cugaguccgc	aaguacgaca	gaauggcuag	720
caauacaagg	gcuaccaaug	guucuuaguu	ggauuuauugg	uacuaaugaa	aaaaaagcac	780
agauggaacu	cuauaaugaa	auugcgacag	aaauugguca	ugauauaucu	aaaauagauc	840
auuguaugac	uuauuuuugu	ucuguugaug	augaugcaca	aaaggcgcaa	gauguuuguc	900
gggaguuuuc	gaaaaauugg	uauagacuca	auguaaaugc	gaccaauauc	uuuaaugaua	960
gcaaucaaac	ucgugguuau	gauuaucaua	aaggucaaug	gcgugauuuu	guuuuacaag	1020
gacauacaaa	caccaaucga	cguguugauu	auagcaaugg	uaauaacccu	guaggcacuc	1080
cugagcagug	uaugaaauc	auucaacgug	auauugaugc	aacggguauu	acaacauua	1140
caugcggauu	ugaagcuauu	ggaacugaag	augaaauau	ugcuuccaug	cgacgcuuuu	1200
ugacacaagu	cgucuccuuu	uuaaaagaac	cuaaaauaa	uacuuuuuug	auacuagaga	1260
uaauaaggaa	caaguuauga	aauuuggauu	auuuuuucua	aacuuucaga	aagauggaau	1320
aacaucugaa	gaaacguugg	auaauauggu	aaagacuguc	acguuaauug	auucaacuaa	1380
auaucuuuuu	aaucugccu	uuguuaauga	acaucacuuu	ucaaaaaaug	guauuguugg	1440
agcaccuauu	accgcagcug	guuuuuuauu	aggguuaaca	aauaauuac	auauugguuc	1500
auuaaaucua	guaauuacca	cccaucaccc	uguacgugua	gcagaagaag	ccaguuuauu	1560
agaucaaaug	ucagagggac	gcuucauucu	ugguuuuagu	gacugcgaaa	gugauuucga	1620
aauggaauuu	uuuagacguc	auaucucauc	aaggcaaca	cauuuugaag	caugcuaua	1680
aaauuuuuu	gacgcauuua	cuacagguua	uugucauccc	caaacgacu	uuuaugauuu	1740
uccaaagguu	ucauuuauc	cacacugua	cagugagaau	ggaccuaagc	aaauuguauc	1800
cgcuacauca	aaagaagucg	ucaugugggc	agcgaaaaag	gcacugccuu	uaacauuuua	1860
gugggaggau	aauuuagaaa	ccaaagaacg	cuauugcauu	cuauuaaua	aaacagcaca	1920
acaauauggu	auugauuuu	cggauuguu	ucaucauuu	acuguaauug	cgaacuuuuu	1980

ES 2 780 827 T3

	ugcugauaga aguacggcuc aagaagaagu gagagaauac uaaaaagacu auaucacuga	2040
	aacuuacccu caaauaggaca gagaugaaaa aaauaacugc auuauugaag agaaugcagu	2100
	ugggucucacau gaugacuauu augaaucgac aaaauuagca guggaaaaaa cagggucuaa	2160
	aaauuuuuu uuaucuuug aaucaauguc cgauuuuuu gauguaaaag auuuuuuga	2220
	uauguugaac caaaaaaucg aaaugaauuu accauuuuu aaauaaagc auuuucuua	2280
	uuagauugcc uuuu	2294
5	<210> 20 <211> 12 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
15	<220> <221> base_modificada <222> (1) . . (2) <223> a, c, u, g, desconocida u otra	
20	<220> <221> base_modificada <222> (7) . . (9) <223> a, c, u, g, desconocida u otra	
25	<220> <221> base_modificada <222> (12) . . (12) <223> a, c, u, g, desconocida u otra	
30	<220> <223> Véase la memoria descriptiva presentada para la descripción detallada de sustituciones y modos de realización preferentes	
30	<400> 20 nnwawgnnu un	12
35	<210> 21 <211> 13 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
45	<220> <221> base_modificada <222> (1) . . (1) <223> a, c, u, g, desconocida u otra	
50	<220> <221> base_modificada <222> (4) . . (7) <223> a, c, u, g, desconocida u otra	
55	<220> <221> base_modificada <222> (12) . . (13) <223> a, c, u, g, desconocida u otra	

<220>

<223> Véase la memoria descriptiva presentada para la descripción detallada de sustituciones y modos de realización preferentes

5 <400> 21
nagnnnncwu wnn 13

<210> 22

<211> 13

10 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 22
cagauaacau uuu 13

REIVINDICACIONES

5 **1.** Un sistema de empaquetamiento de célula bacteriana para empaquetar una molécula de ácido nucleico indicadora en una partícula de transducción no replicativa, comprendiendo dicho sistema de empaquetamiento de célula bacteriana una célula bacteriana huésped que comprende

10 - un genoma de bacteriófago lisogenizado que comprende un primer gen de bacteriófago que comprende una delección de una primera secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento de dicho primer gen de bacteriófago que evita el empaquetamiento de una molécula de ácido nucleico de bacteriófago en dicha partícula de transducción no replicativa; y

15 - un plásmido que comprende una molécula de ácido nucleico indicadora que comprende un gen indicador y un segundo gen de bacteriófago que comprende una segunda secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento que facilita el empaquetamiento de una réplica de dicho plásmido que comprende dicha molécula de ácido nucleico indicadora en dicha partícula de transducción no replicativa,

20 en el que dicho segundo gen de bacteriófago codifica una proteína, en el que dicha réplica de dicho plásmido que comprende una molécula de ácido nucleico indicadora forma un replicón para empaquetarse en dicha partícula de transducción no replicativa,

en el que la primera y segunda secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento es una secuencia del sitio pac.

25 **2.** Un sistema de empaquetamiento de célula bacteriana para empaquetar una molécula de ácido nucleico indicadora en una partícula de transducción no replicativa, comprendiendo dicho sistema de empaquetamiento de célula bacteriana una célula bacteriana huésped que comprende:

30 - un genoma de bacteriófago lisogenizado que carece de un primer gen de bacteriófago que comprende una primera secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento, en el que la delección de dicho primer gen de bacteriófago evita el empaquetamiento de una molécula de ácido nucleico de bacteriófago en dicha partícula de transducción no replicativa; y

35 - un plásmido que comprende una molécula de ácido nucleico indicadora que comprende un gen indicador y un segundo gen de bacteriófago, en el que dicho segundo gen de bacteriófago codifica una segunda secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento y facilita el empaquetamiento de una réplica de dicho plásmido que comprende dicha molécula de ácido nucleico indicadora en dicha partícula de transducción no replicativa, en el que dicho segundo gen de bacteriófago puede expresar una proteína que se codifica por dicho gen, en el que dicha réplica de dicho plásmido que comprende una molécula de ácido nucleico indicadora forma un replicón susceptible de empaquetarse en dicha partícula de transducción no replicativa,

40 en el que la primera y segunda secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento es una secuencia del sitio pac.

45 **3.** Un sistema de empaquetamiento de célula bacteriana para empaquetar una molécula de ácido nucleico indicadora en una partícula de transducción no replicativa, comprendiendo dicho sistema de empaquetamiento de célula bacteriana una célula bacteriana huésped que comprende:

50 - un genoma de bacteriófago lisogenizado que comprende una primera secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento de bacteriófago dentro de un primer gen de bacteriófago, en el que dicha primera secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento de bacteriófago comprende una mutación sinónima que evita la escisión de la secuencia de iniciación de empaquetamiento, pero no altera la expresión del primer producto génico de bacteriófago que engloba la primera secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento y evita el empaquetamiento de una molécula de ácido nucleico de bacteriófago en dicha partícula de transducción no replicativa; y

55 - un plásmido que comprende una molécula de ácido nucleico indicadora que comprende un gen indicador y que comprende una segunda secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento de bacteriófago, en el que dicha segunda secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento de bacteriófago carece de dicha mutación y facilita el empaquetamiento de una réplica de dicho plásmido que comprende dicha molécula de ácido nucleico indicadora en dicha partícula de transducción no replicativa, en el que dicha réplica de dicho plásmido que comprende dicha molécula de ácido nucleico indicadora forma un replicón para empaquetarse en dicha partícula de transducción no replicativa,

60 en el que la primera y segunda secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento es una secuencia del sitio pac.

65 **4.** El sistema de empaquetamiento de célula bacteriana de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho

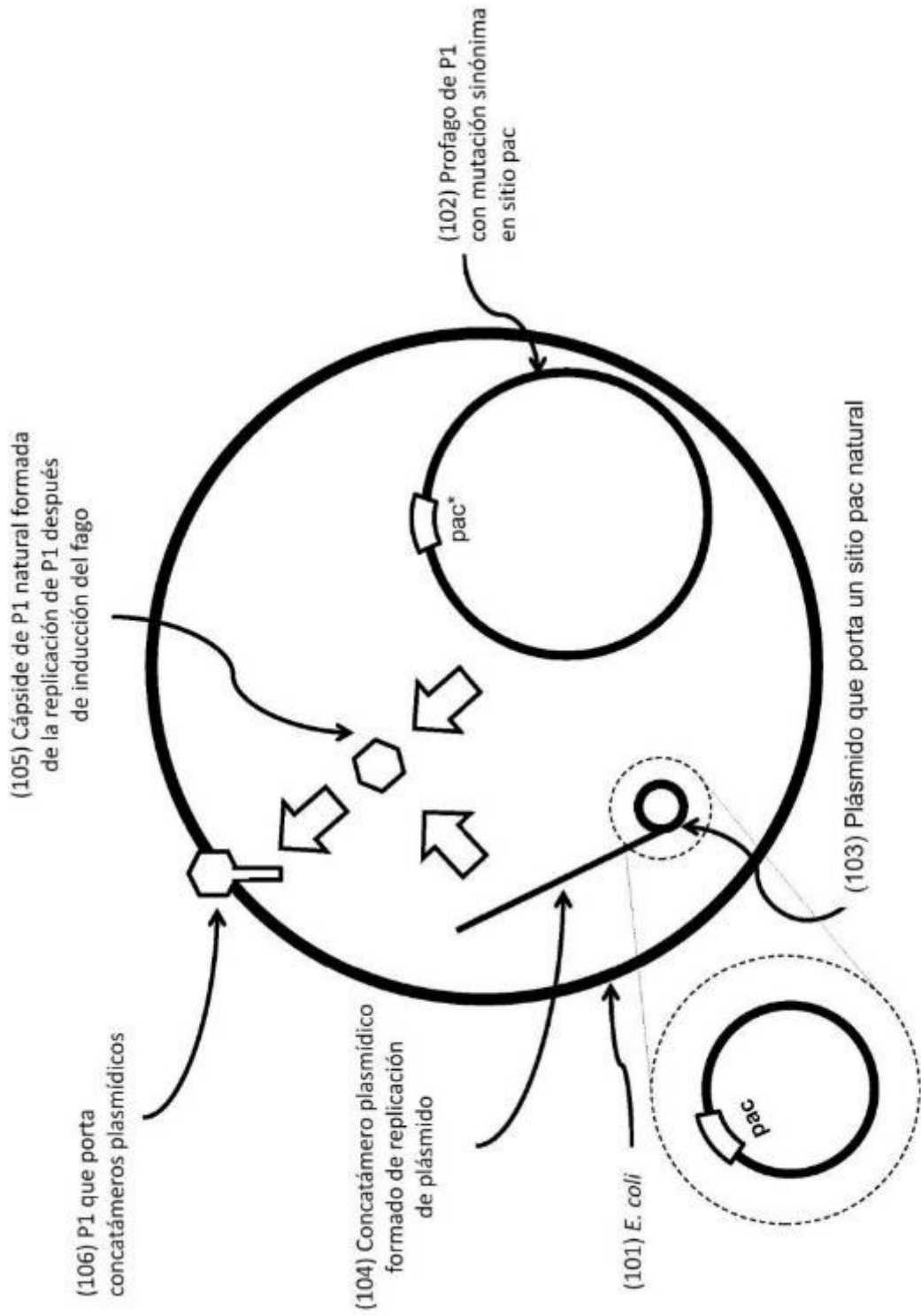
plásmido que comprende dicha molécula de ácido nucleico indicadora se enlaza funcionalmente a un promotor.

- 5 **5.** El sistema de empaquetamiento de célula bacteriana de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho plásmido que comprende dicha molécula de ácido nucleico indicadora comprende un origen de replicación.
- 6.** El sistema de empaquetamiento de célula bacteriana de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho plásmido que comprende dicho replicón comprende un concatámero susceptible de empaquetarse en dicha partícula de transducción no replicativa.
- 10 **7.** El sistema de empaquetamiento de célula bacteriana de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho segundo gen de bacteriófago comprende la secuencia de SEQ ID NO:9.
- 8.** El sistema de empaquetamiento de célula bacteriana de la reivindicación 1, en el que dicho primer gen de bacteriófago comprende la secuencia de SEQ ID NO:8.
- 15 **9.** El sistema de empaquetamiento de célula bacteriana de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho primer y dicho segundo genes de bacteriófagos comprenden cada uno un gen de la terminasa pequeña (*terS*) que comprende dicha secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento, opcionalmente en el que dicho gen *terS* es un gen *terS* del bacteriófago $\phi 11$ o $\phi 80\alpha$ de *S. aureus*.
- 20 **10.** El sistema de empaquetamiento de célula bacteriana de la reivindicación 3, en el que dicha primera y dicha segunda secuencias del sitio de iniciación de empaquetamiento de bacteriófago comprenden cada una una secuencia del sitio de iniciación de empaquetamiento de un gen de la terminasa pequeña, o en el que dicha primera y dicha segunda secuencias del sitio de iniciación de empaquetamiento de bacteriófago comprenden cada una una secuencia del sitio *pac* de un gen de la terminasa pequeña (*terS*) de un bacteriófago $\phi 11$ o $\phi 80\alpha$ de *S. aureus*.
- 25 **11.** El sistema de empaquetamiento de célula bacteriana de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho replicón se deriva de un origen de replicación del plásmido pT181 de *S. aureus*.
- 30 **12.** El sistema de empaquetamiento de célula bacteriana de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho replicón comprende la secuencia de SEQ ID NO:5.
- 13.** El sistema de empaquetamiento de célula bacteriana de la reivindicación 1 o 2, en el que dicho segundo gen de bacteriófago se enlaza funcionalmente a un promotor, opcionalmente en el que dicho promotor es un promotor inducible o un promotor constitutivo.
- 35 **14.** El sistema de empaquetamiento de célula bacteriana de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho bacteriófago comprende un bacteriófago $\phi 80\alpha$ o un bacteriófago $\phi 11$ de *S. aureus*.
- 40 **15.** El sistema de empaquetamiento de célula bacteriana de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha célula bacteriana comprende:
- una célula de *E. coli*;
- 45 una célula gramnegativa; o
- una célula grampositiva.
- 16.** El sistema de empaquetamiento de célula bacteriana de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha célula bacteriana comprende una célula de *S. aureus*.
- 50 **17.** El sistema de empaquetamiento de célula bacteriana de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho gen indicador codifica un marcador detectable y/o seleccionable,
- 55 u opcionalmente en el que dicho gen indicador se selecciona del grupo que consiste en: genes que codifican enzimas que median en reacciones de luminiscencia, tales como *luxA*, *luxB*, *luxAB*, *luc*, *ruc*, *nluc*, genes que codifican enzimas que median en reacciones colorimétricas, tales como *lacZ*, *HRP*, genes que codifican proteínas fluorescentes, tales como GFP, eGFP, YFP, RFP, CFP, BFP, mCherry, proteínas fluorescentes en infrarrojo cercano, moléculas de ácido nucleico que codifican péptidos de afinidad, tales como marca His, 3X-FLAG, y genes que codifican marcadores seleccionables, tales como *ampC*, *tet(M)*, *CAT*, *erm*.
- 60 **18.** Un procedimiento para empaquetar una molécula de ácido nucleico indicadora en una partícula de transducción no replicativa, que comprende:
- 65 - proporcionar condiciones a dicho sistema de empaquetamiento de célula bacteriana de cualquiera de las reivindicaciones precedentes que inducen una fase lítica de dicho bacteriófago para producir partículas de

transducción no replicativas empaquetadas con dicho plásmido que comprende dicha molécula de ácido nucleico indicadora; y

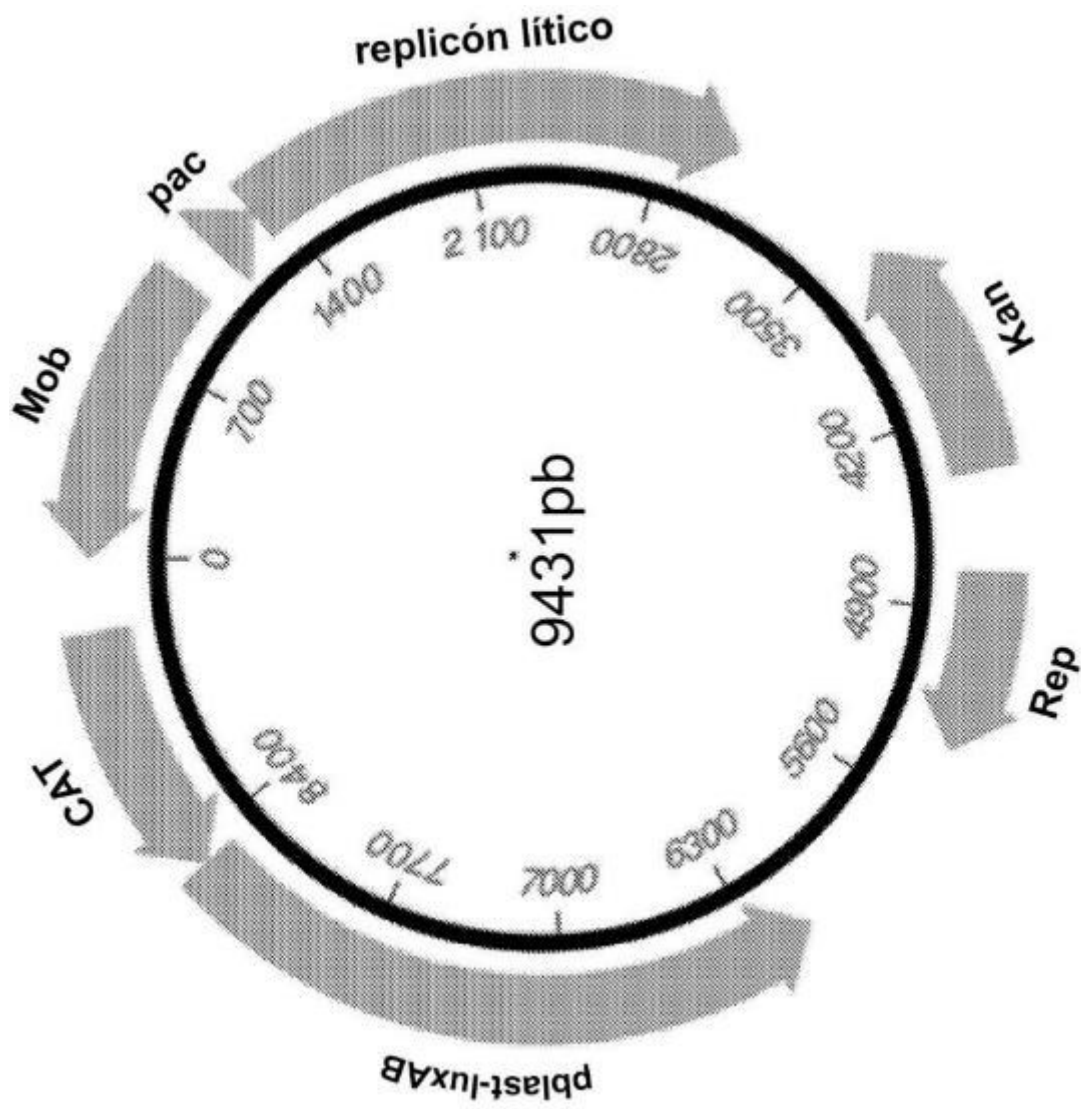
5 - aislar dicha partícula de transducción no replicativa que comprende una réplica de dicho plásmido de molécula de ácido nucleico indicadora.

10 **19.** Una composición que comprende una partícula de transducción no replicativa que comprende una réplica de un plásmido que comprende una molécula de ácido nucleico indicadora producida a partir del procedimiento de la reivindicación 18.



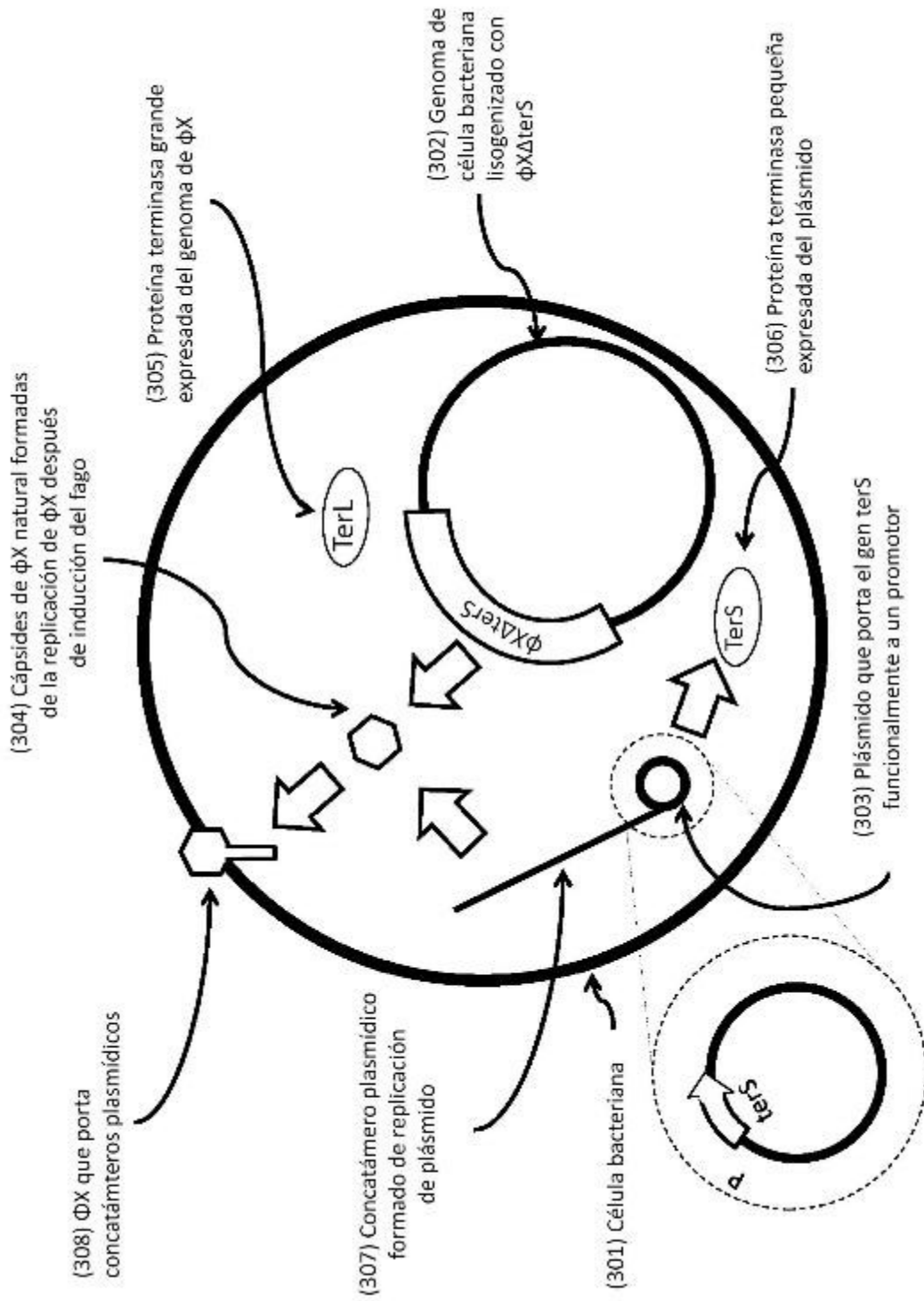
Esquema de un sistema de empaquetamiento basado en P1 (100)

FIGURA 1



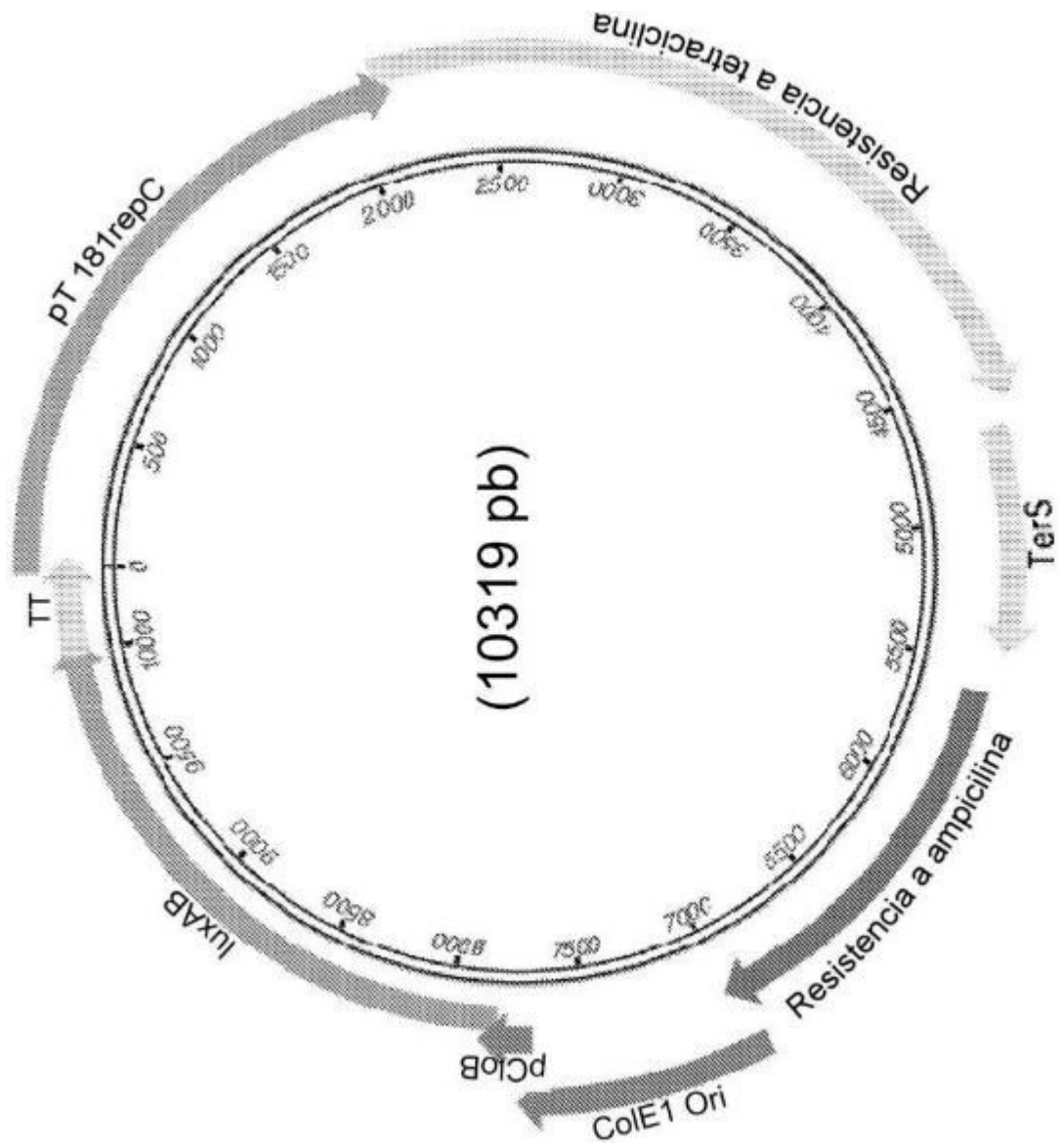
Esquema de pGWP10001

FIGURA 2



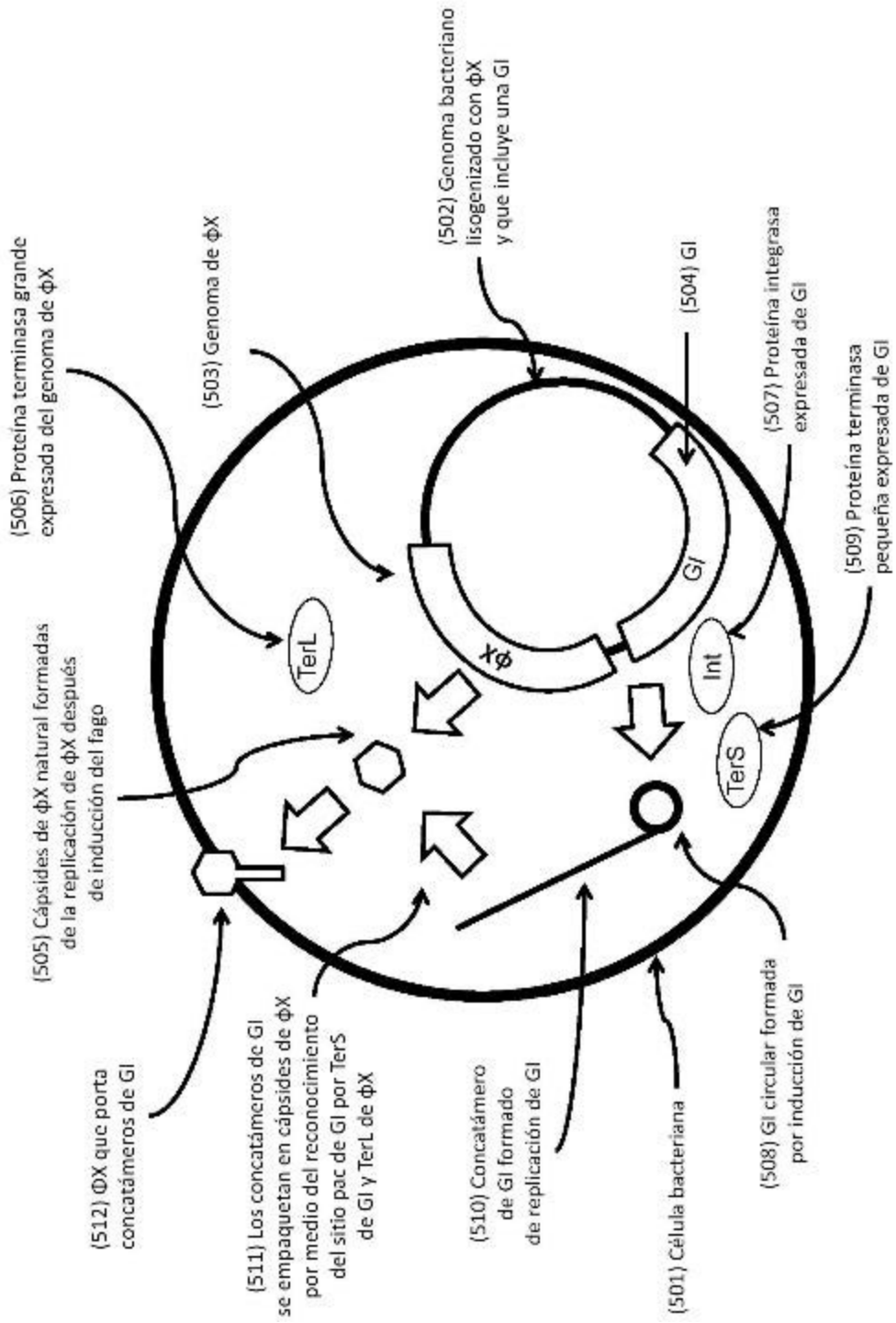
Esquema de un sistema de empaquetamiento de delección de sitio *pac/complementación* (300)

FIGURA 3



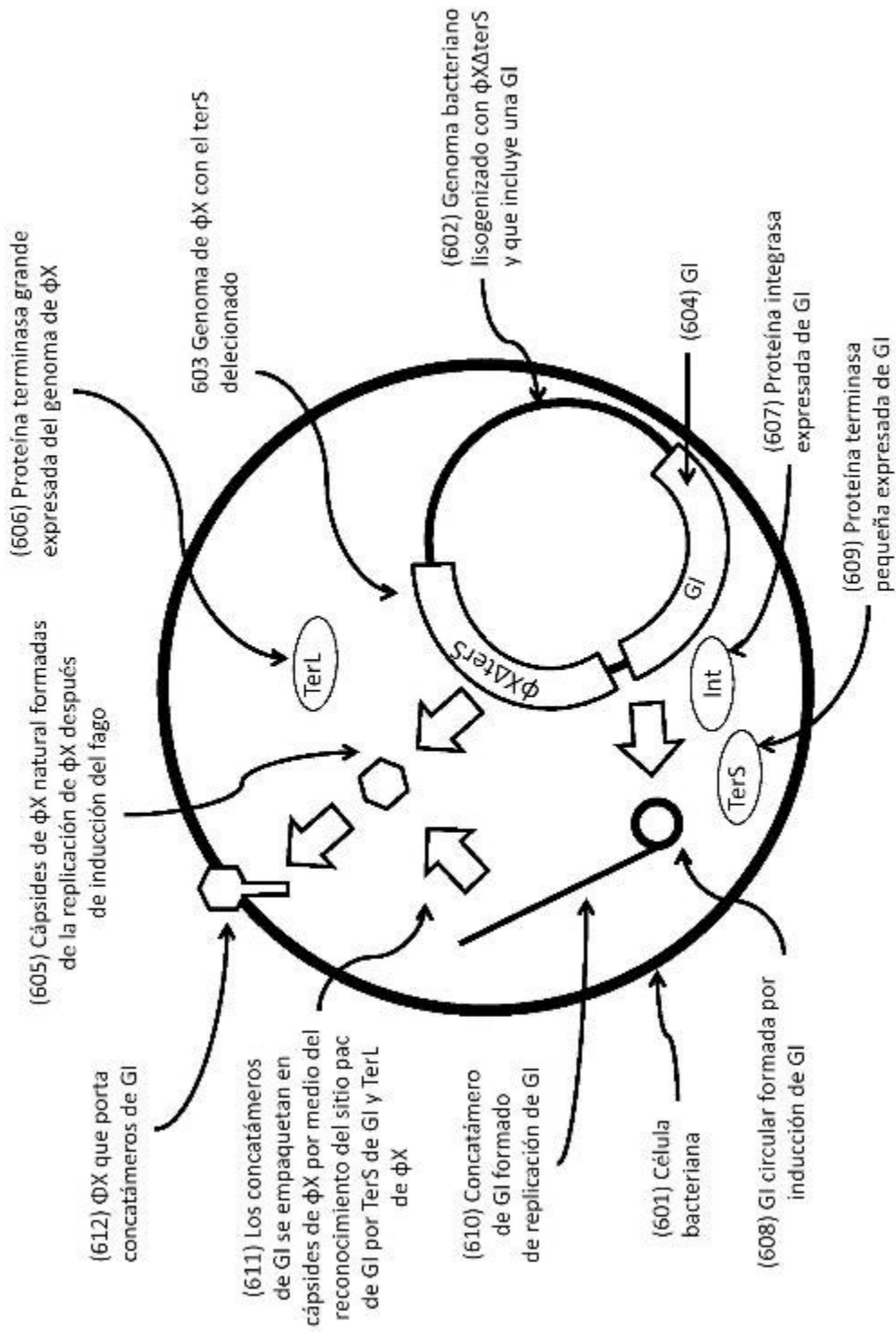
Esquema de pGW80A0001

FIGURA 4



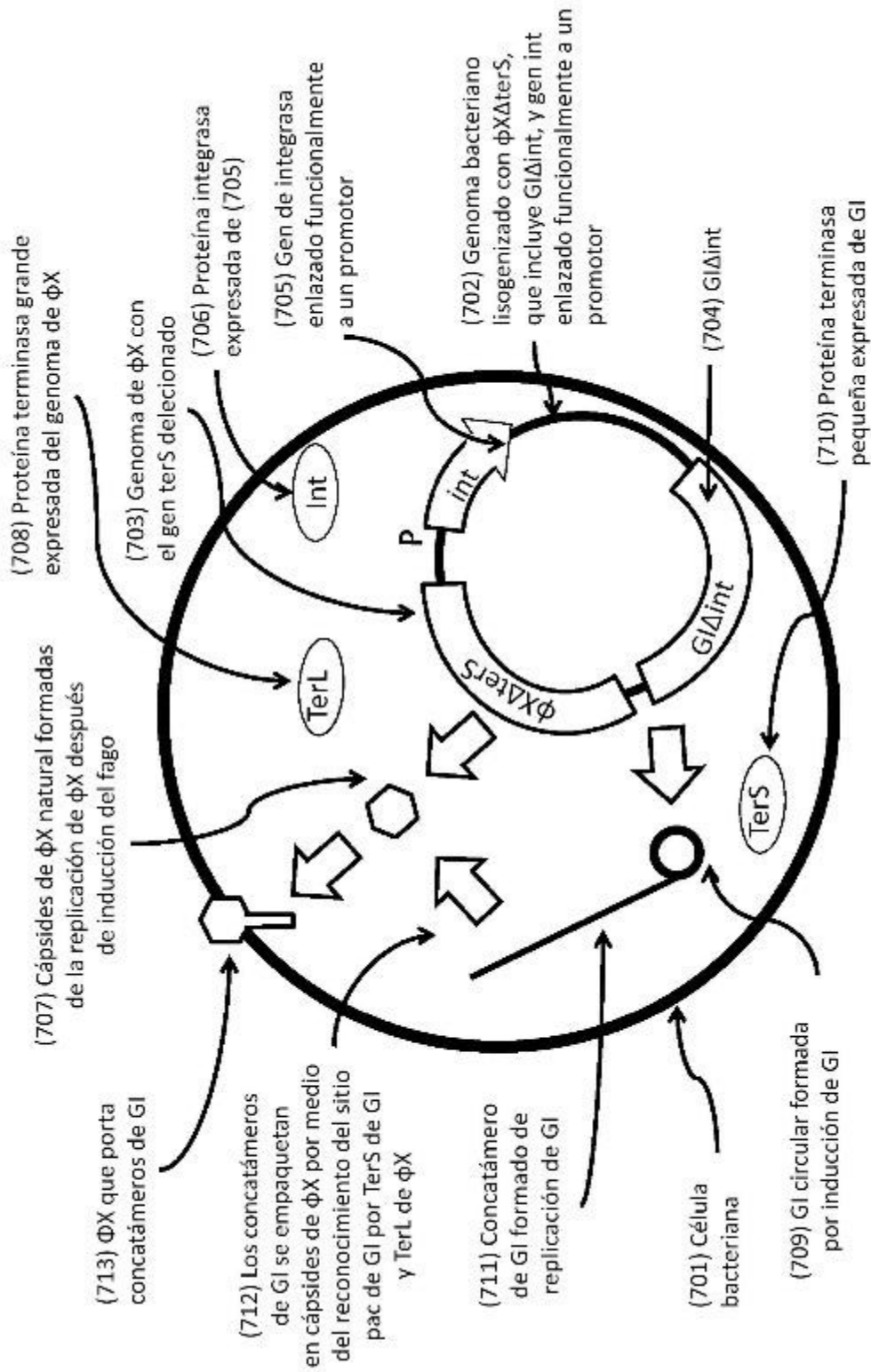
Esquema de un sistema de empaquetamiento de isla genómica natural (500)

FIGURA 5



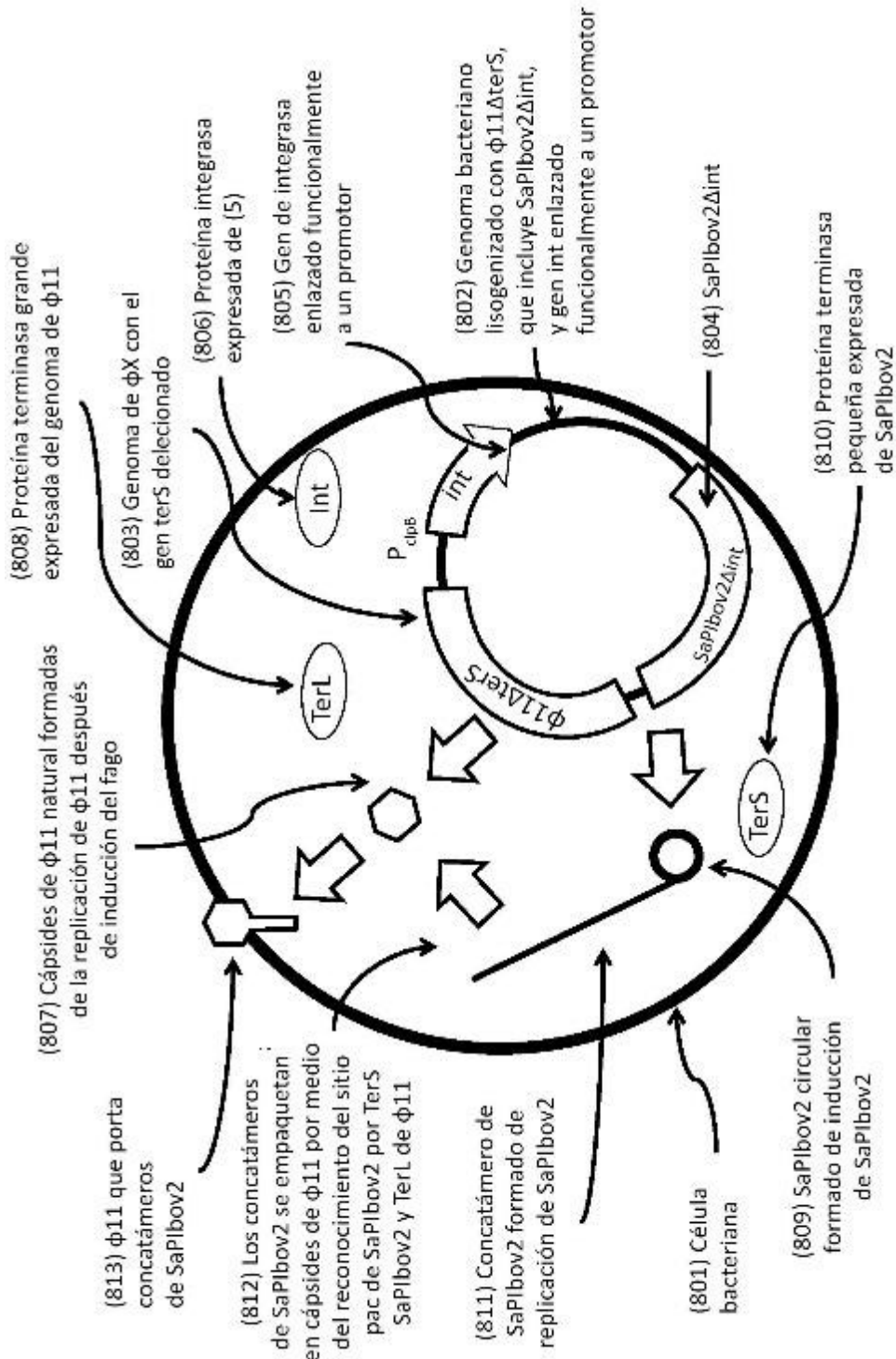
Esquema de un sistema de empaquetamiento basado en isla genómica (GI).

FIGURA 6



Esquema de un sistema de empaquetamiento de isla genómica que no se integra en el genoma del huésped (700)

FIGURA 7



Esquema de un sistema de empaquetamiento de SaPIbov2 que no se integra en el genoma del huésped (800)

FIGURA 8

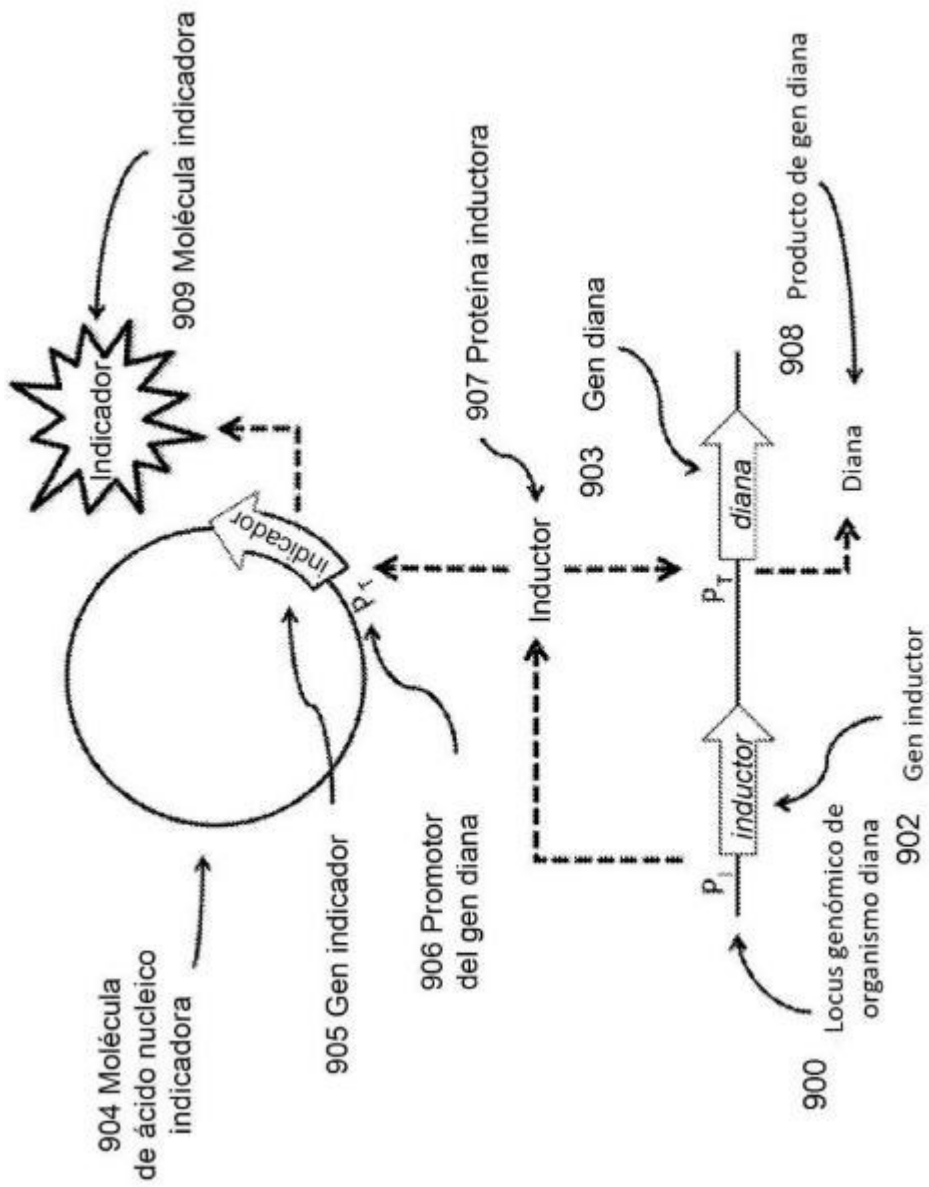


FIGURA 9

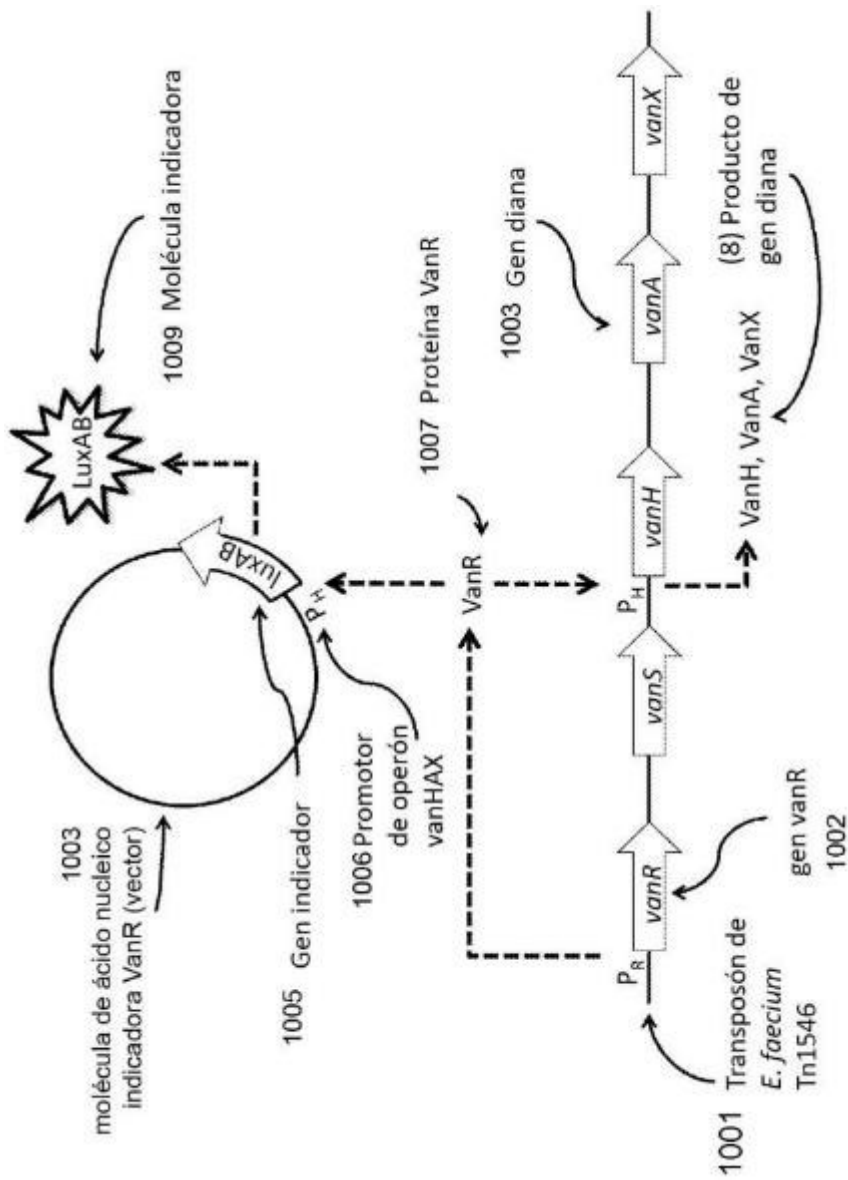


FIGURA 10

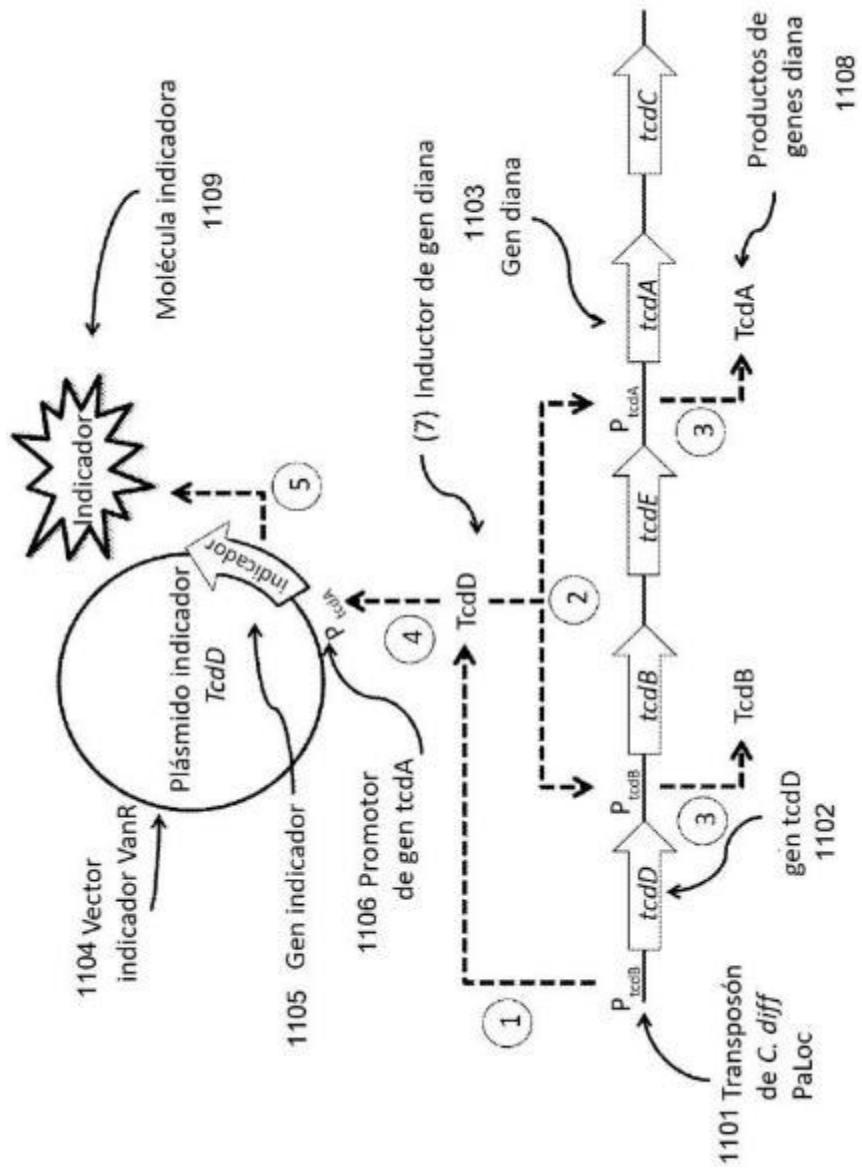


FIGURA 11

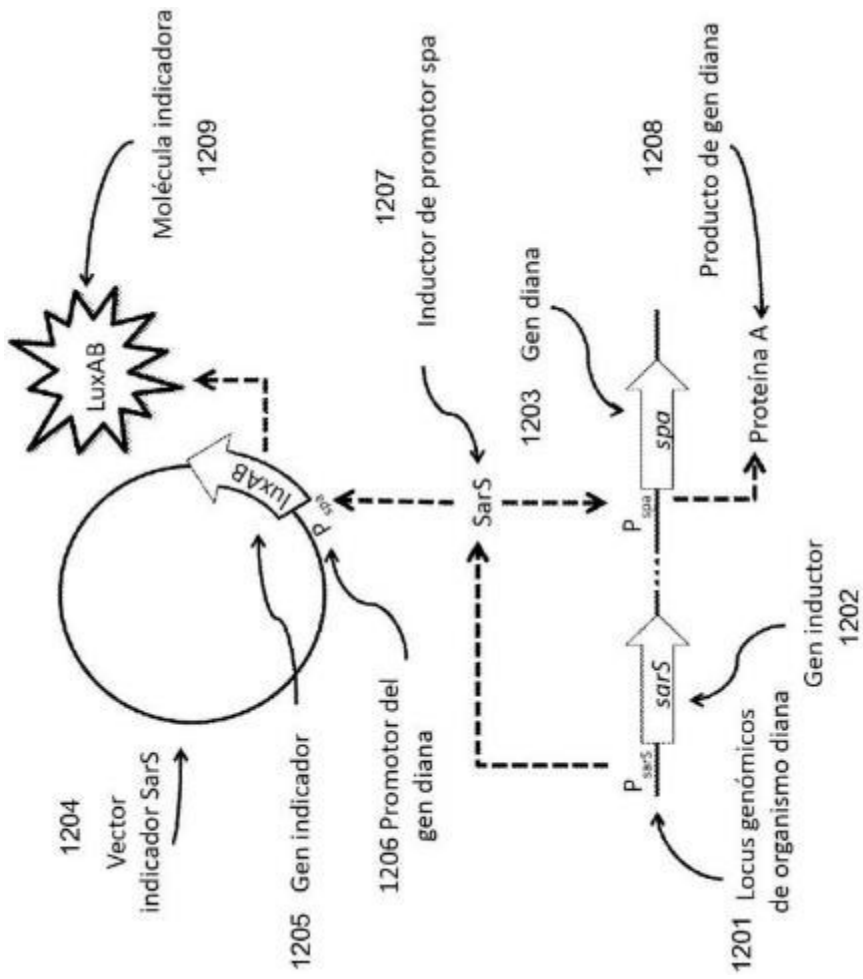


FIGURA 12

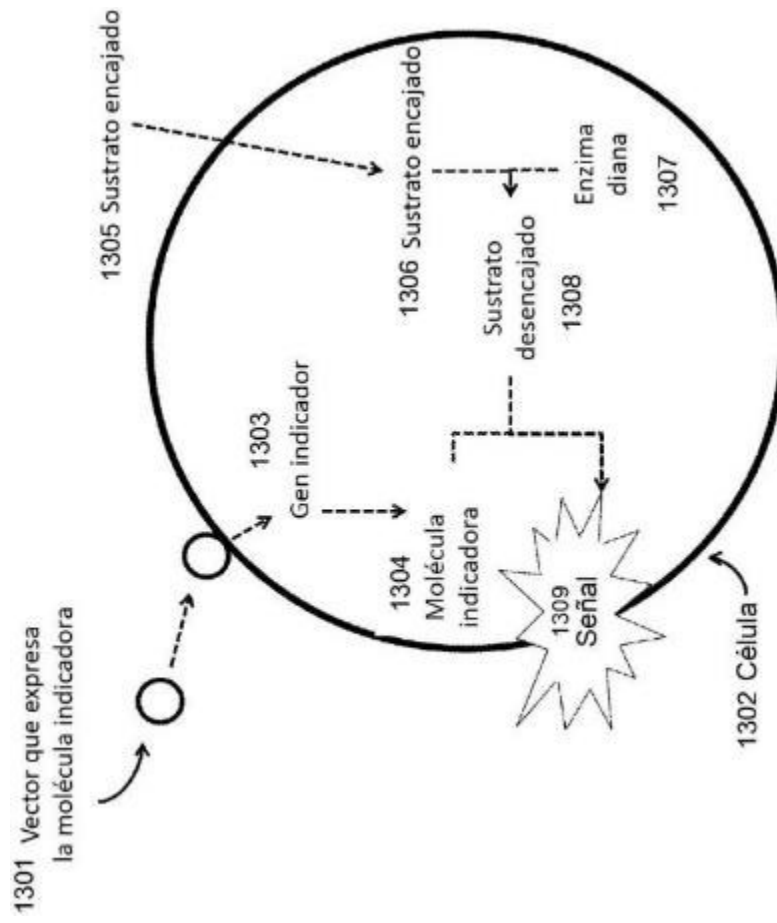


FIGURA 13

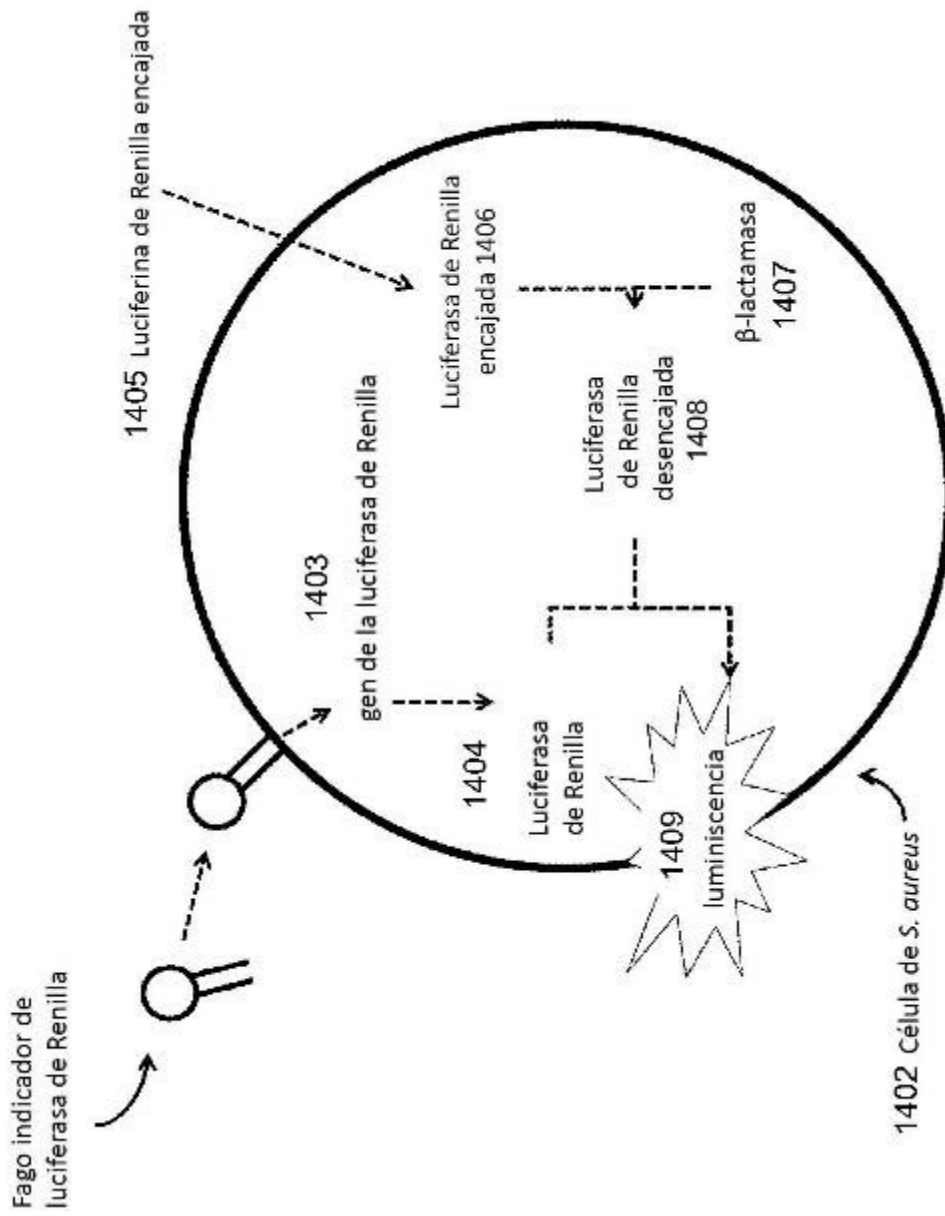


FIGURA 14

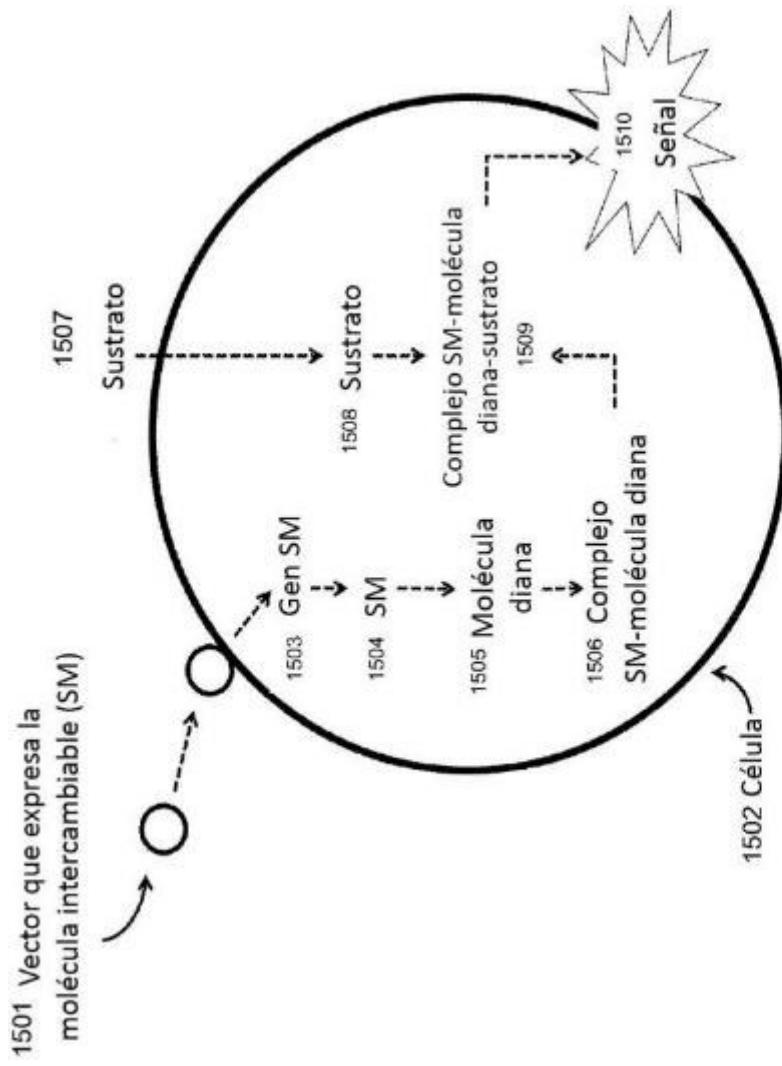


FIGURA 15

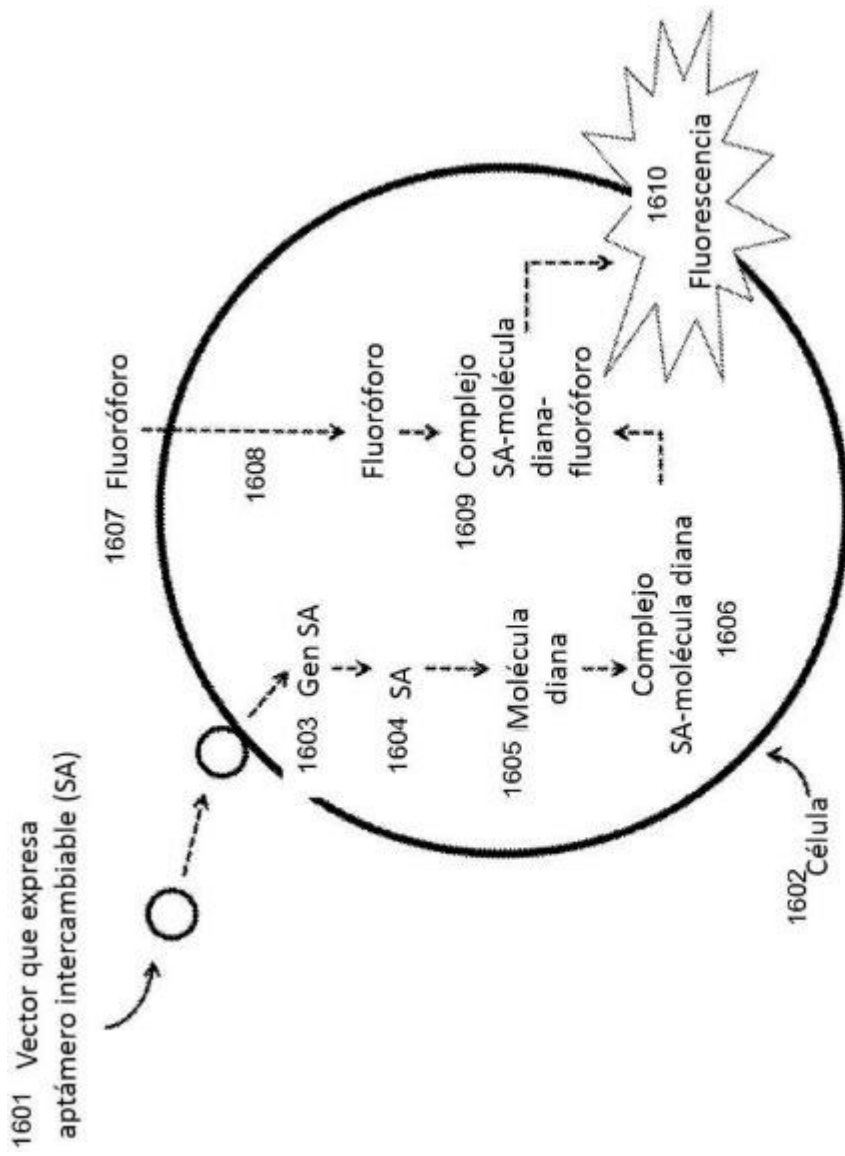


FIGURA 16

Sistema
1700

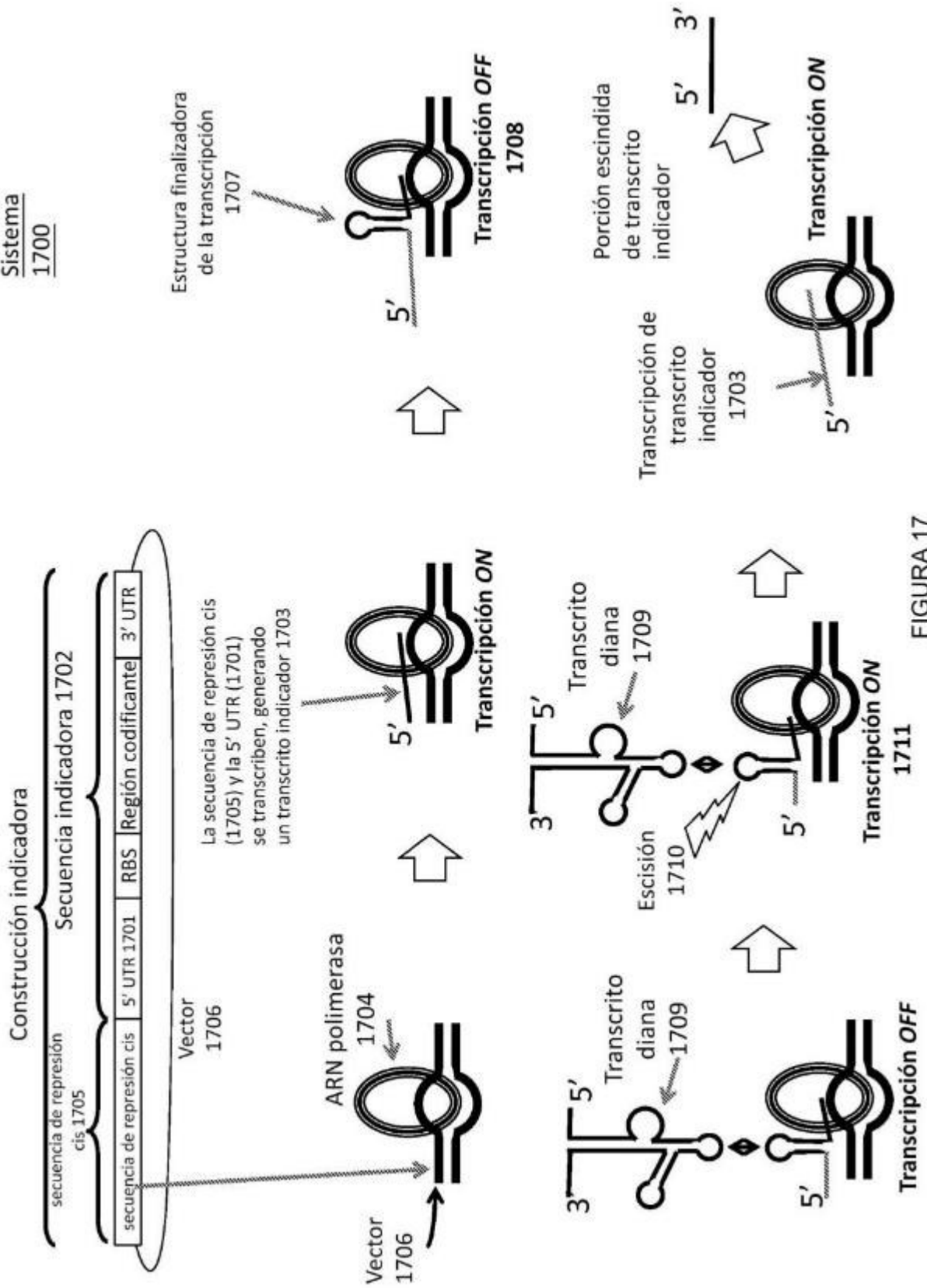


FIGURA 17

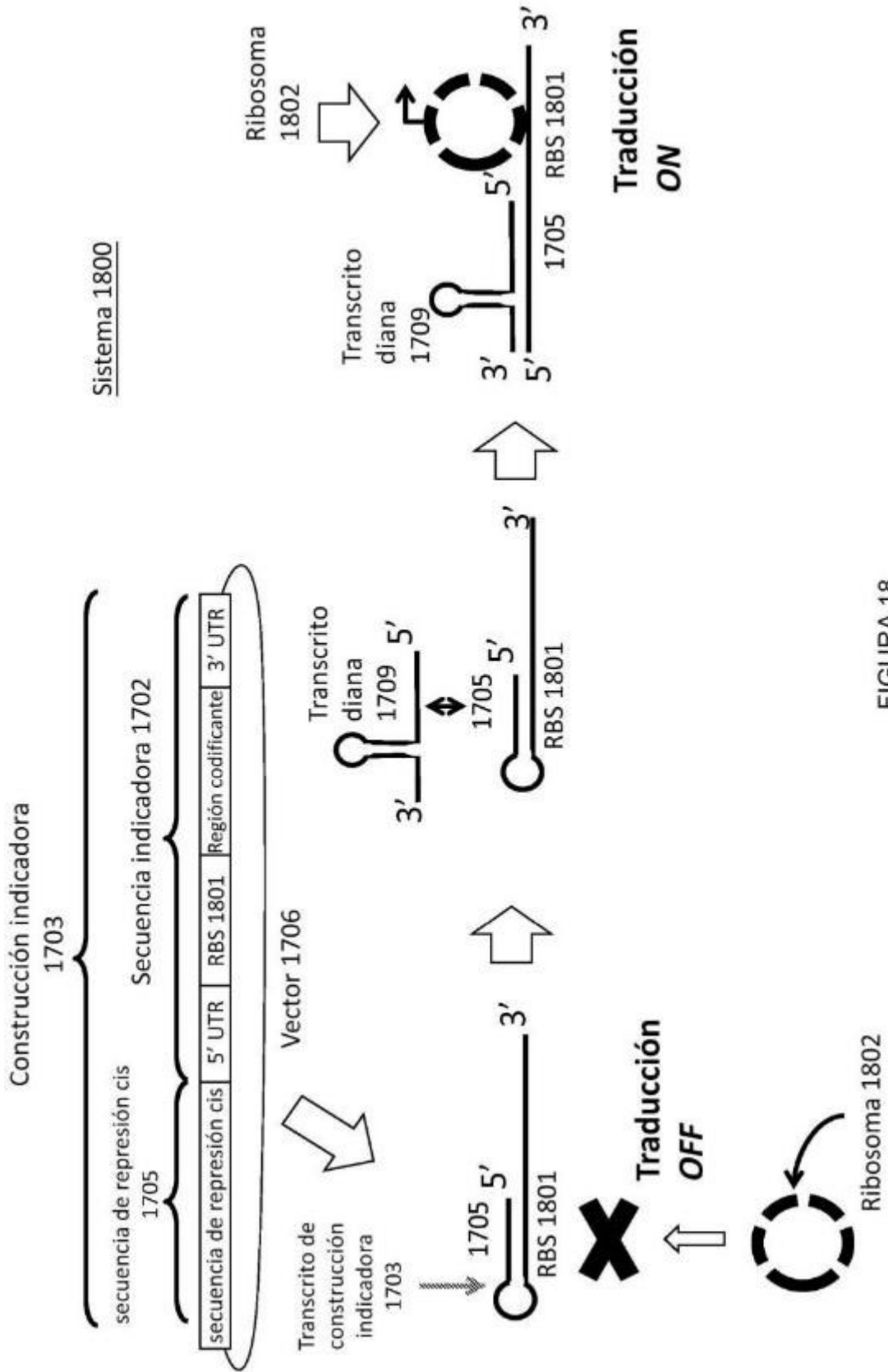


FIGURA 18

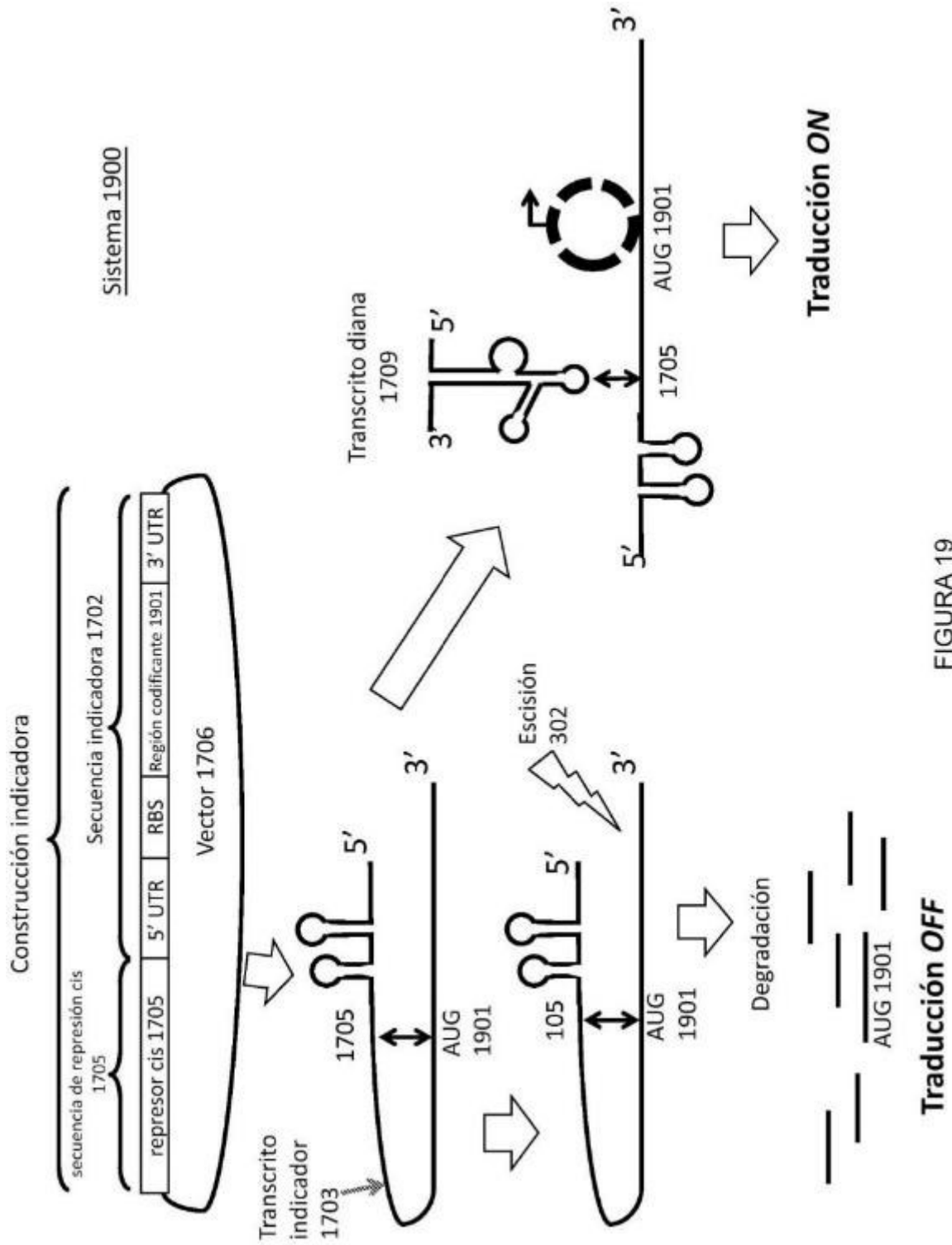


FIGURA 19

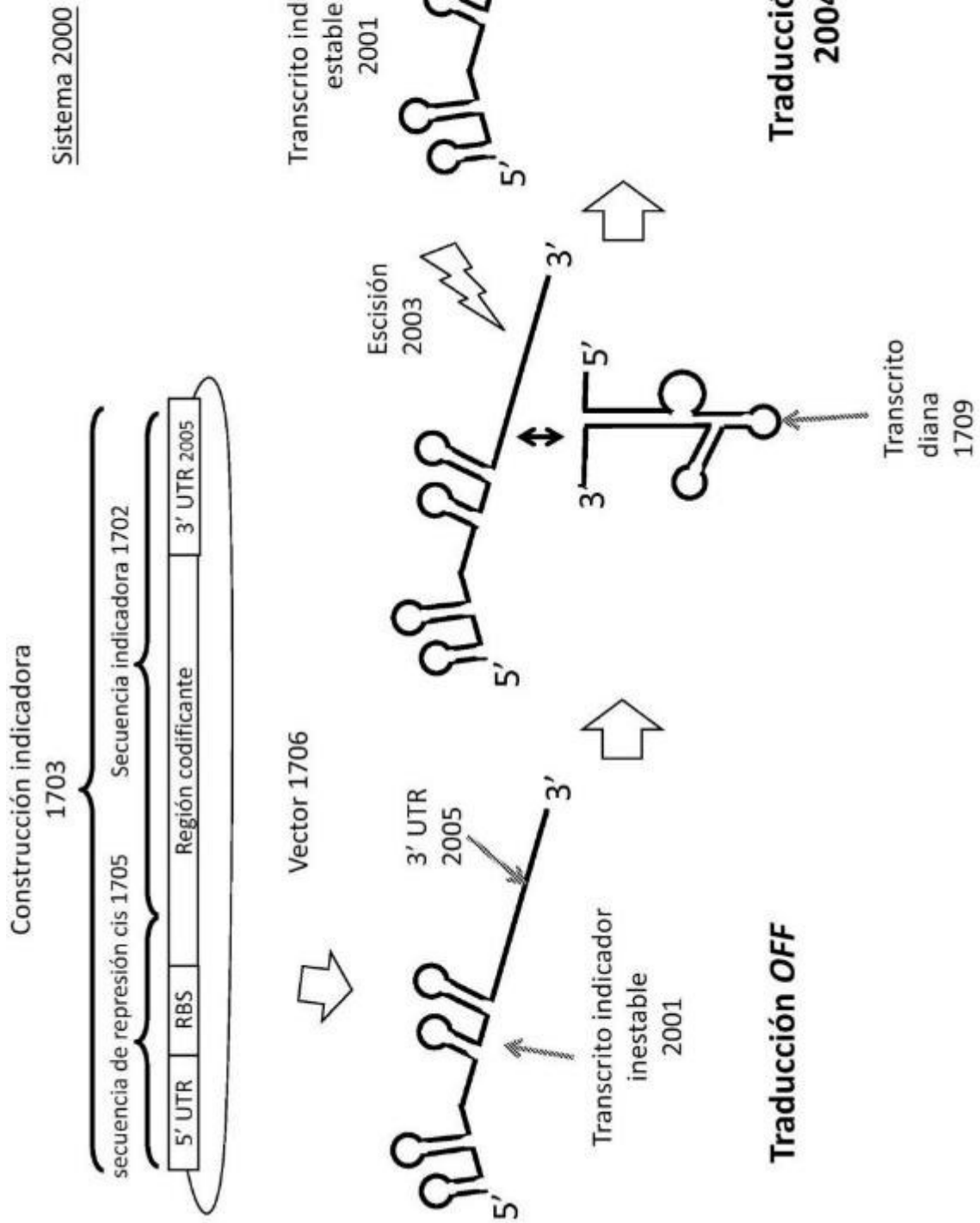
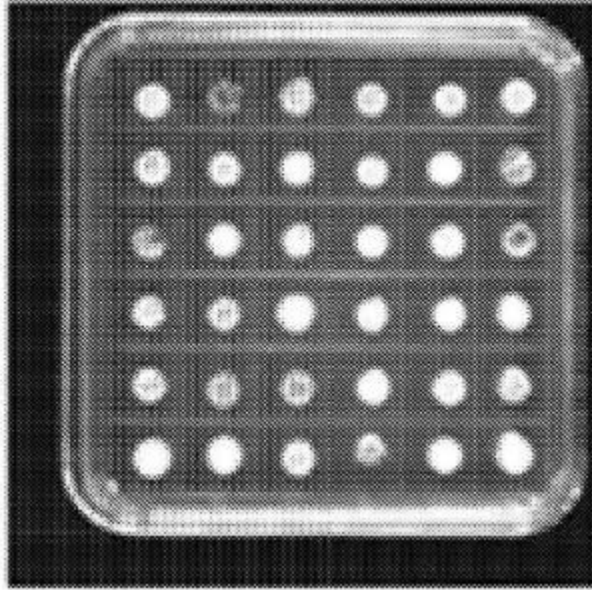


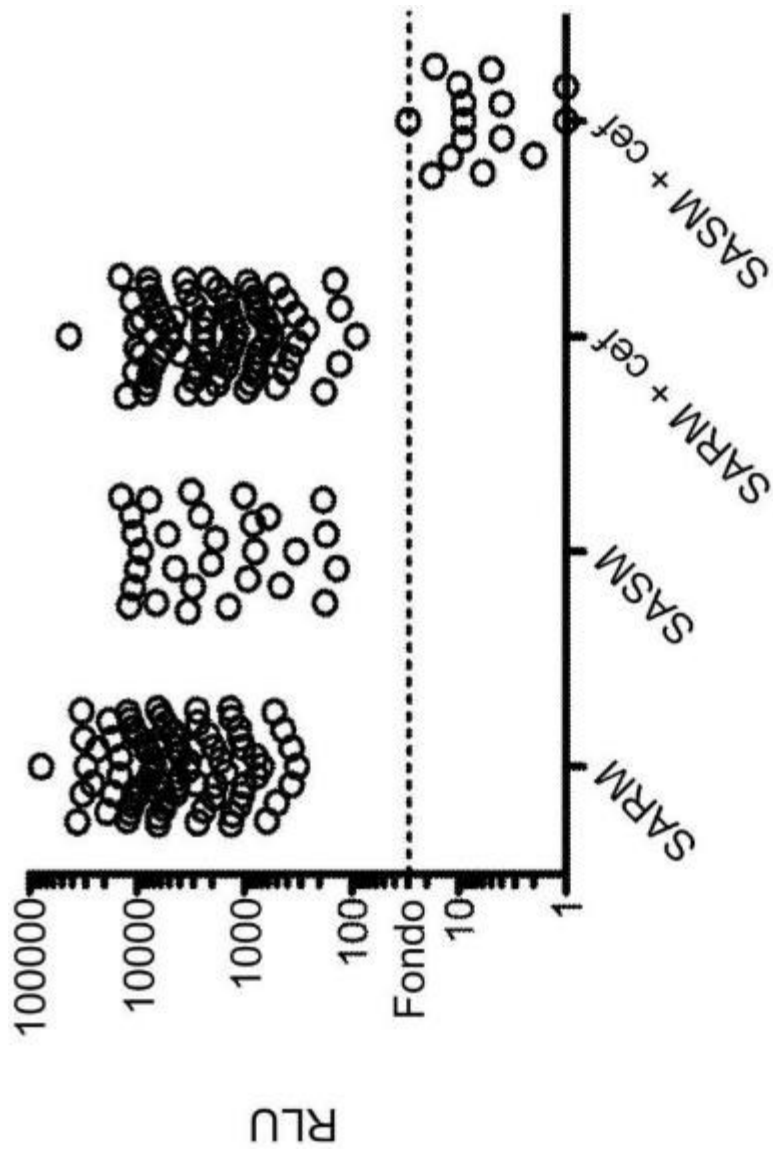
FIGURA 20

S33-72



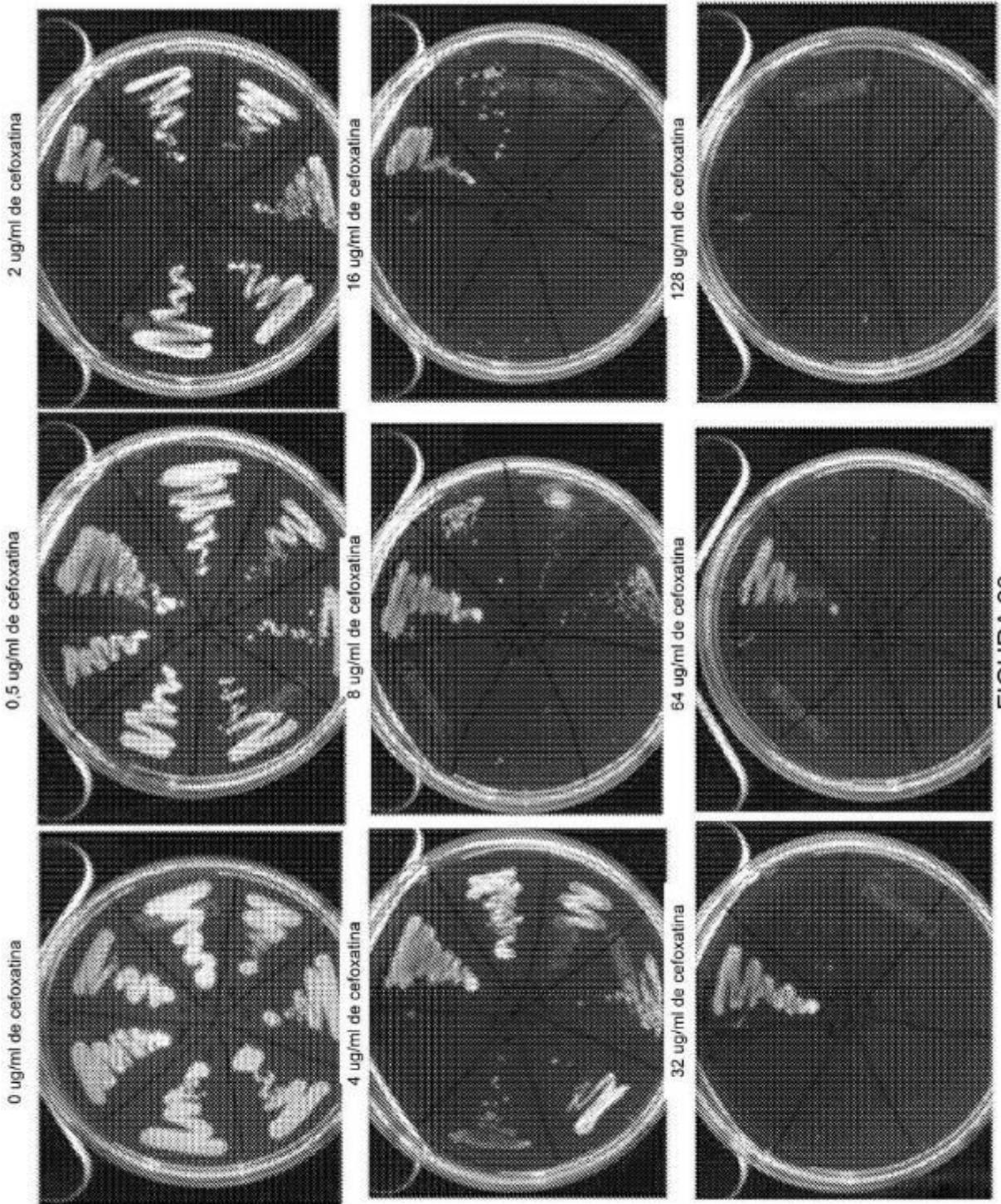
*Fotografía de aislados clínicos
de SARM transducidos*

FIGURA 21



Luminiscencia en *S. aureus* y distinción de SARM frente a SARM

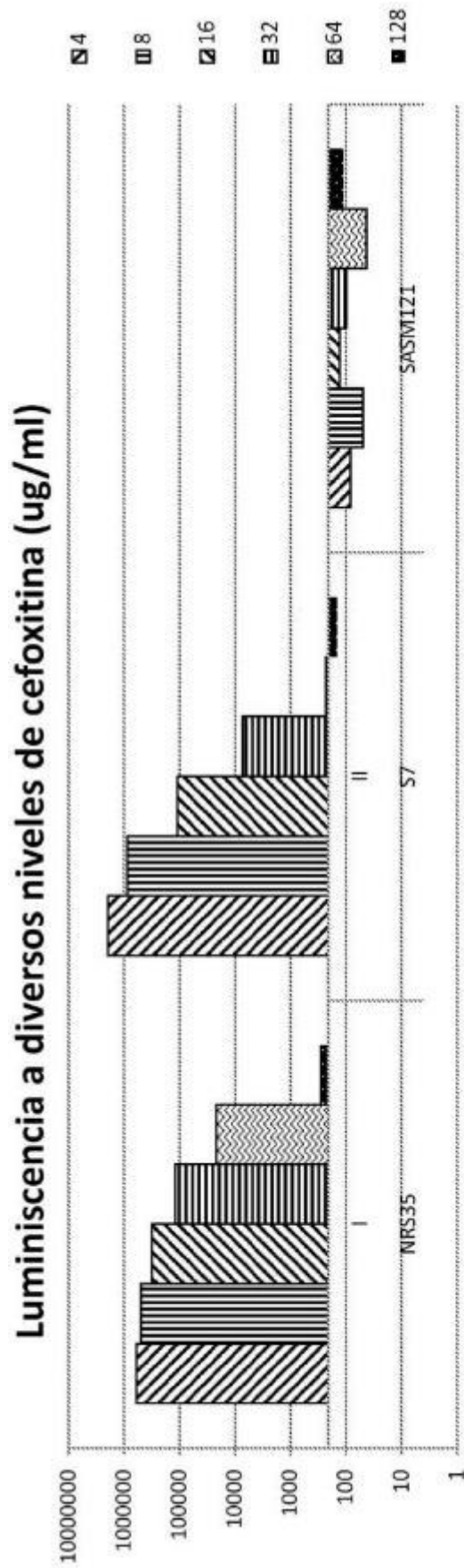
FIGURA 22



Distribución de agar: Tipo ScoMec

- I NRS35
- II S7
- III NRS54
- IV S37
- V 101
- VI mecC
- VII SASM 121

FIGURA 23



Luminiscencia obtenida de SARM y SASM a diversas concentraciones de ceftiofina

FIGURA 24

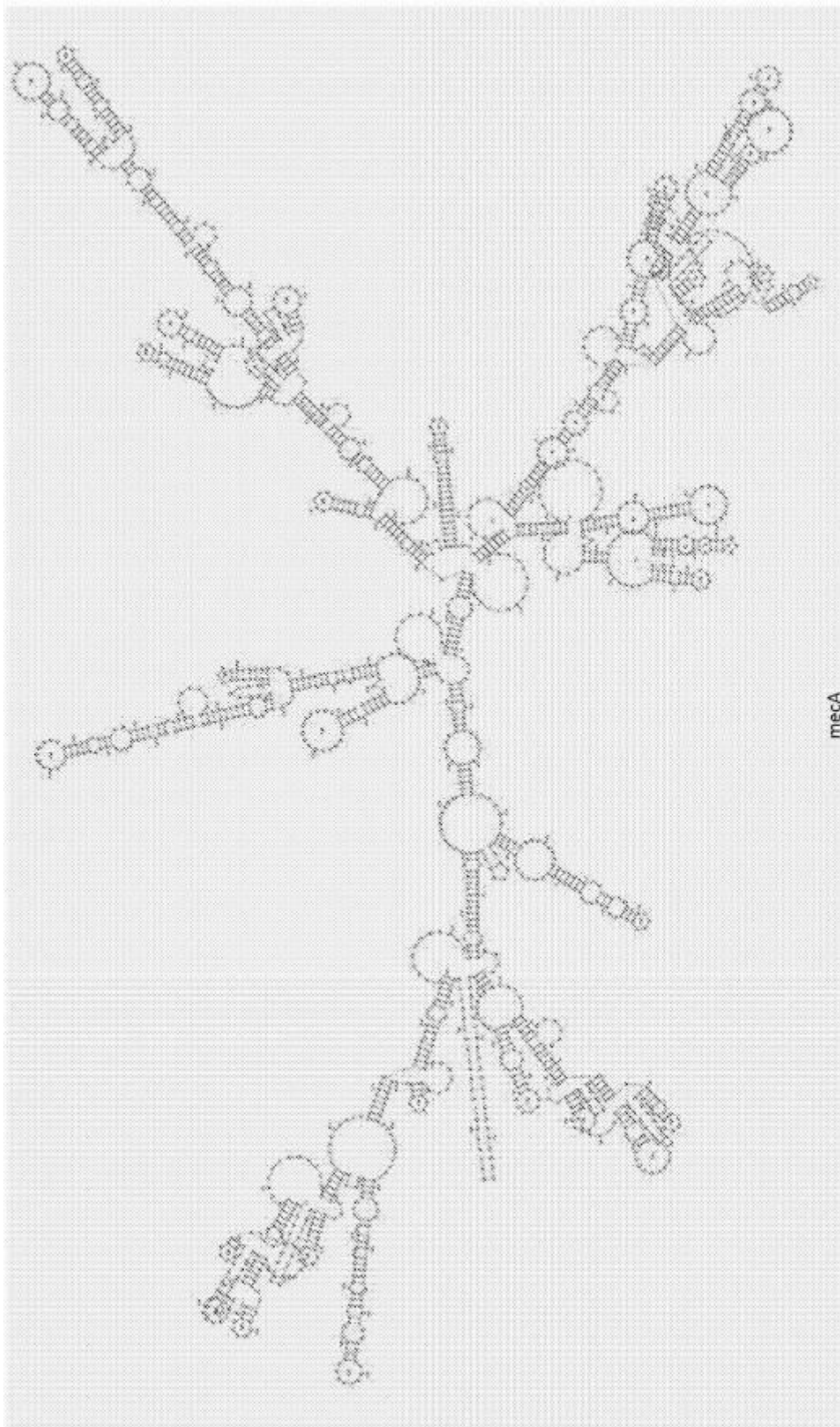
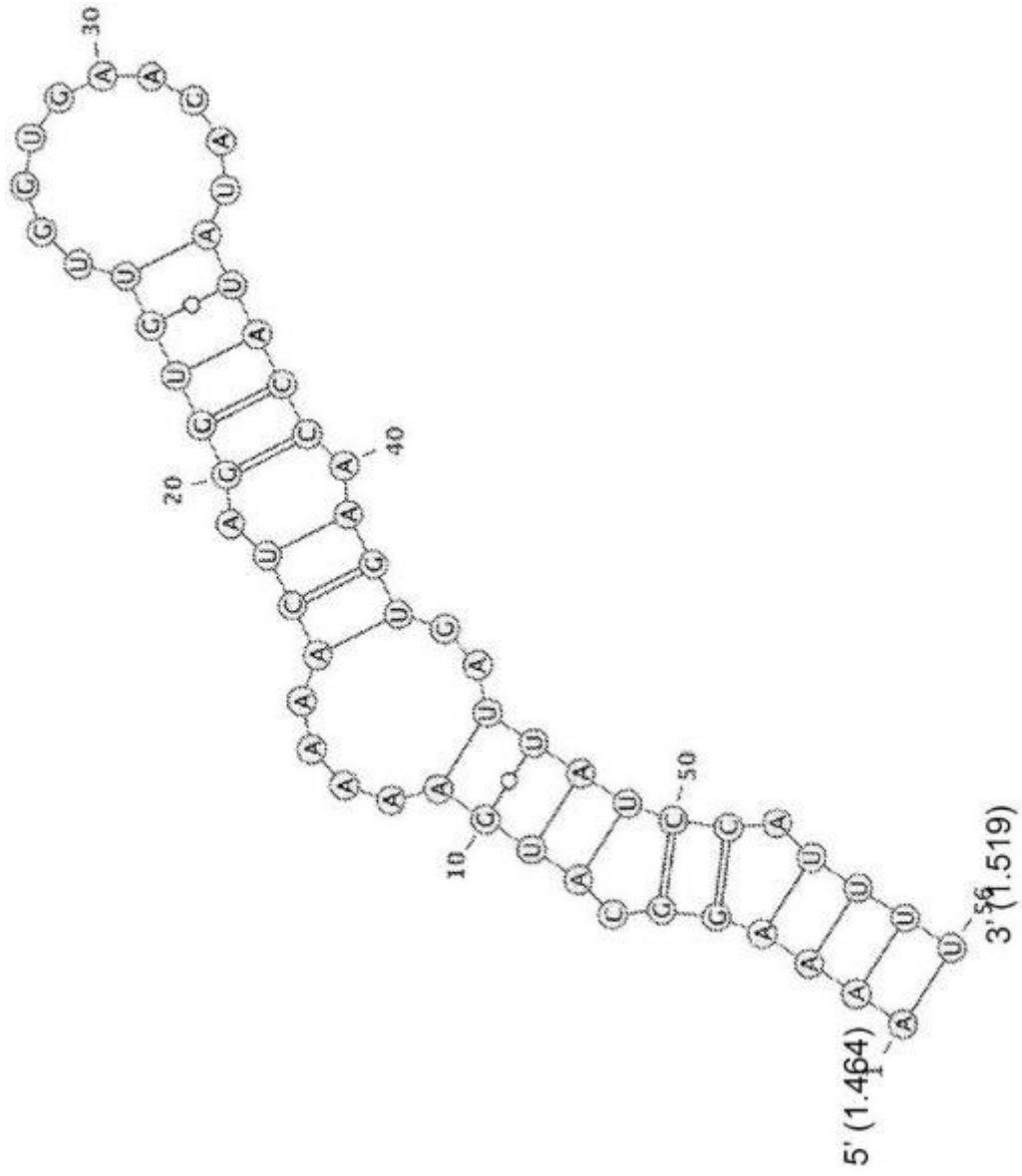


FIGURA 25



mecA T23

FIGURA 26

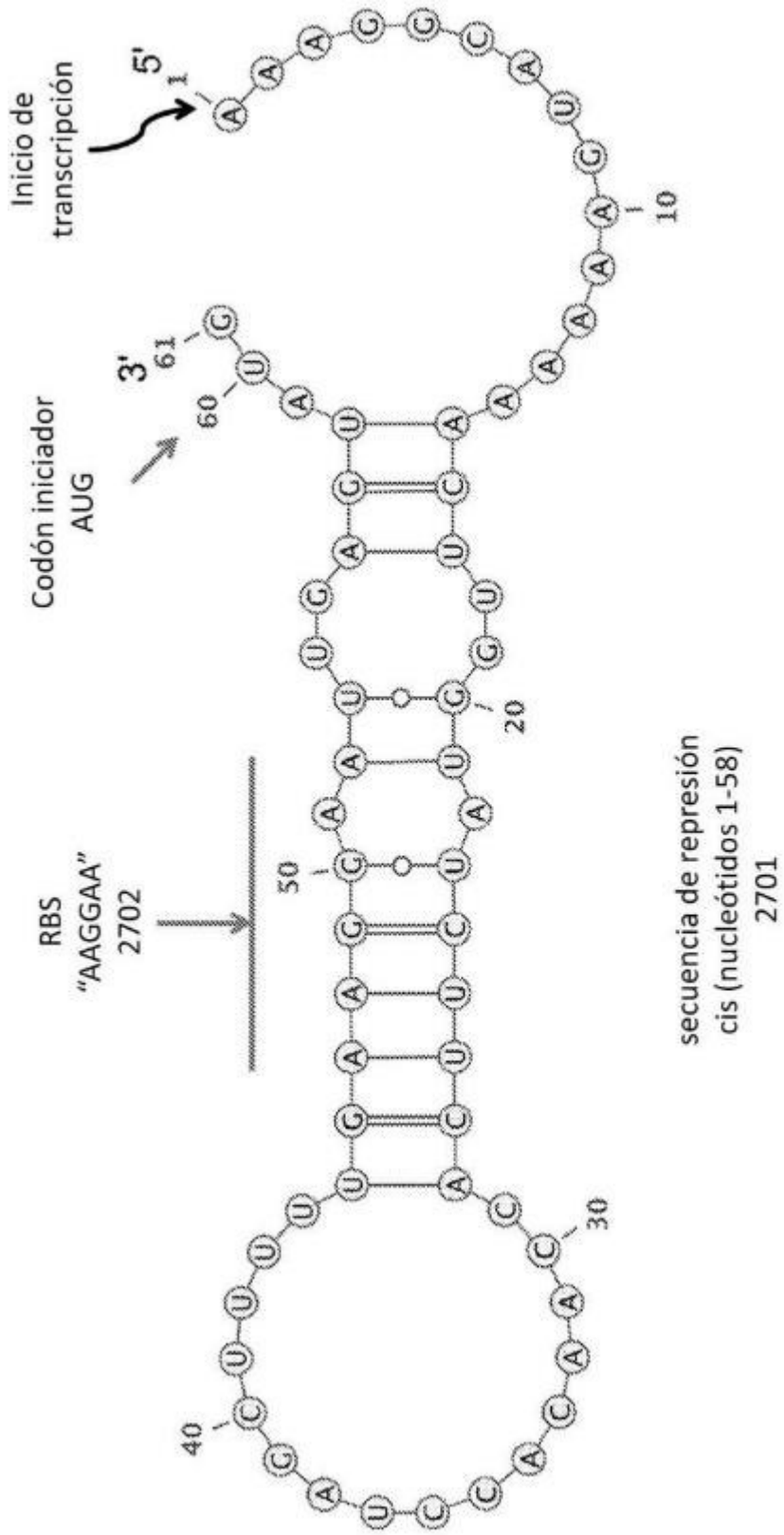


FIGURA 27

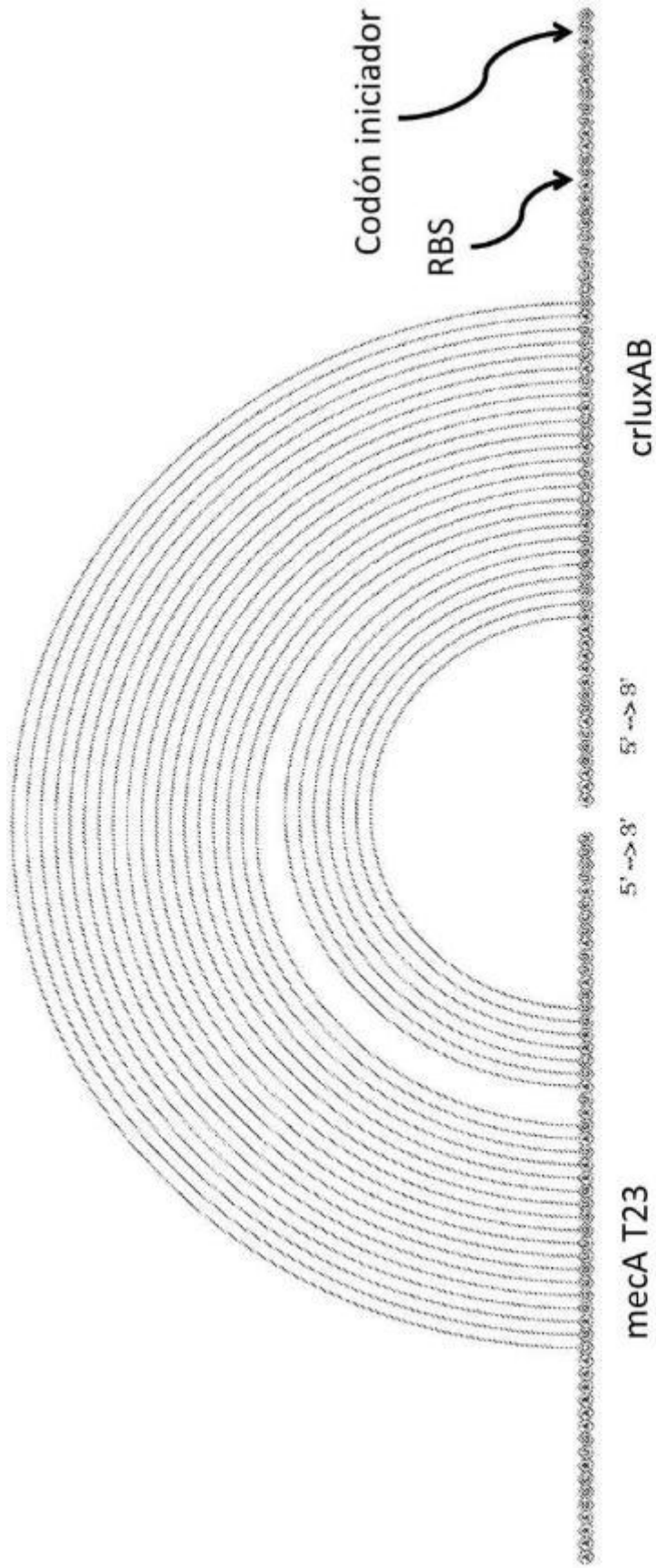


FIGURA 28

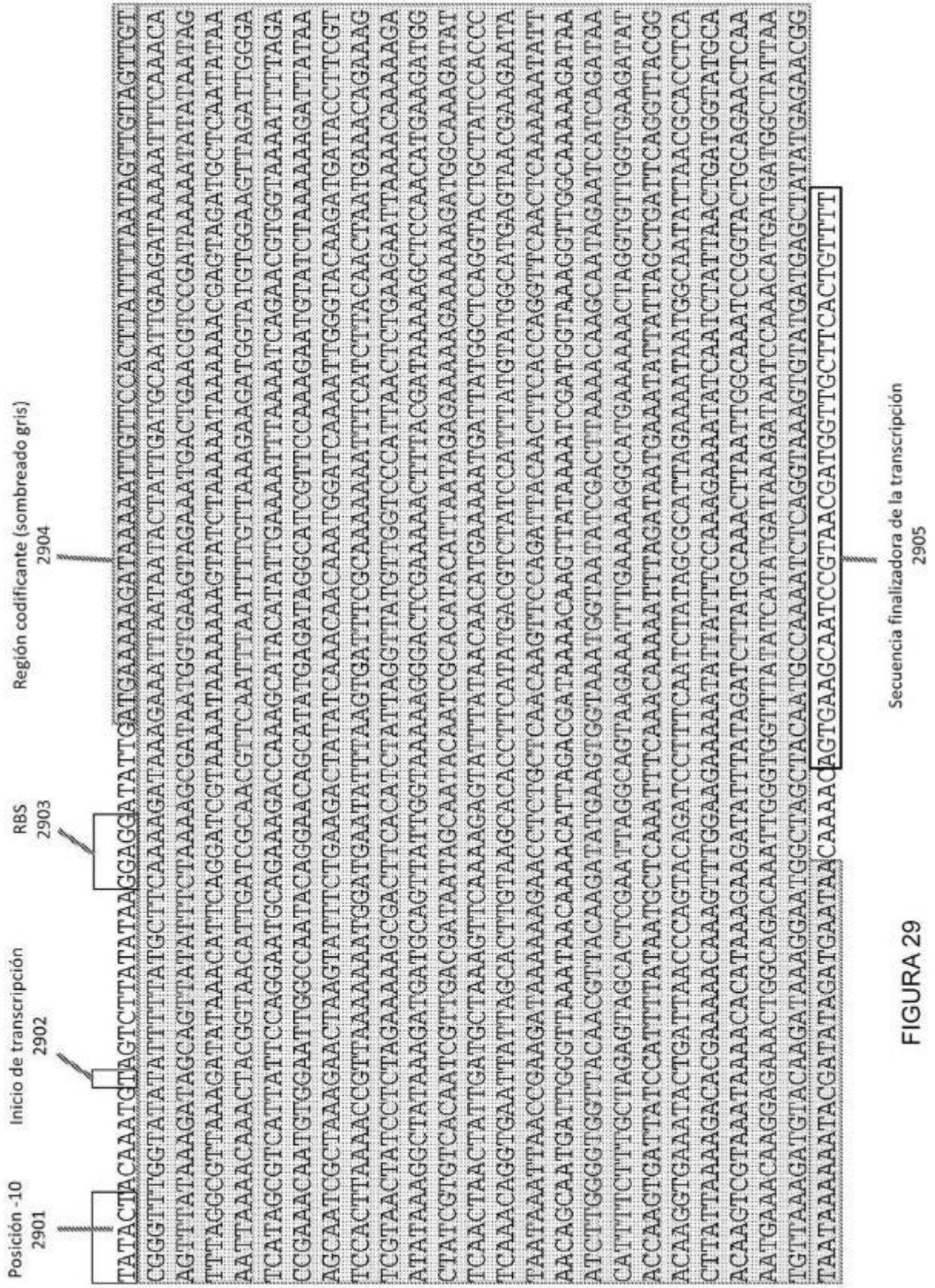


FIGURA 29

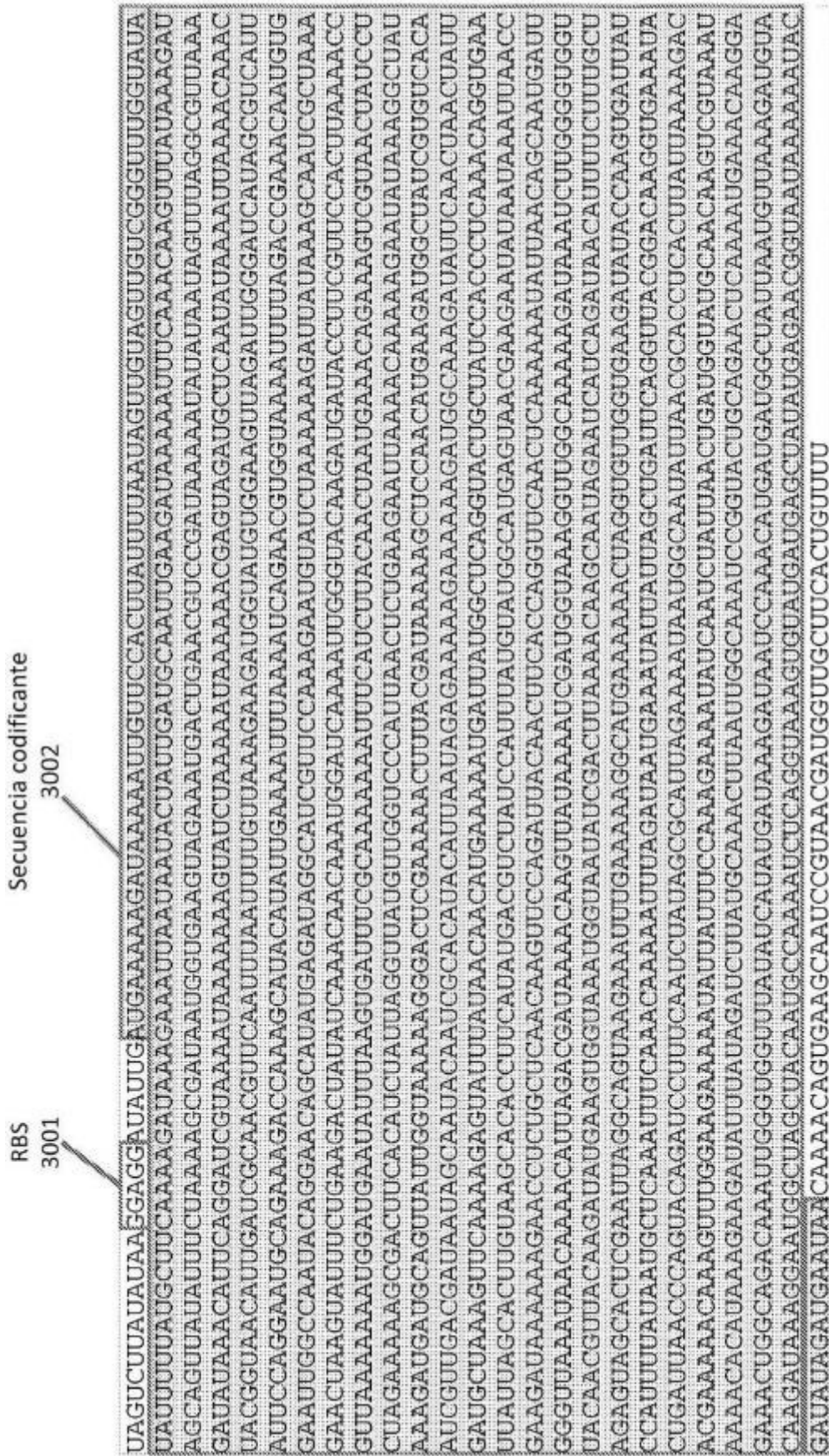


FIGURA 30

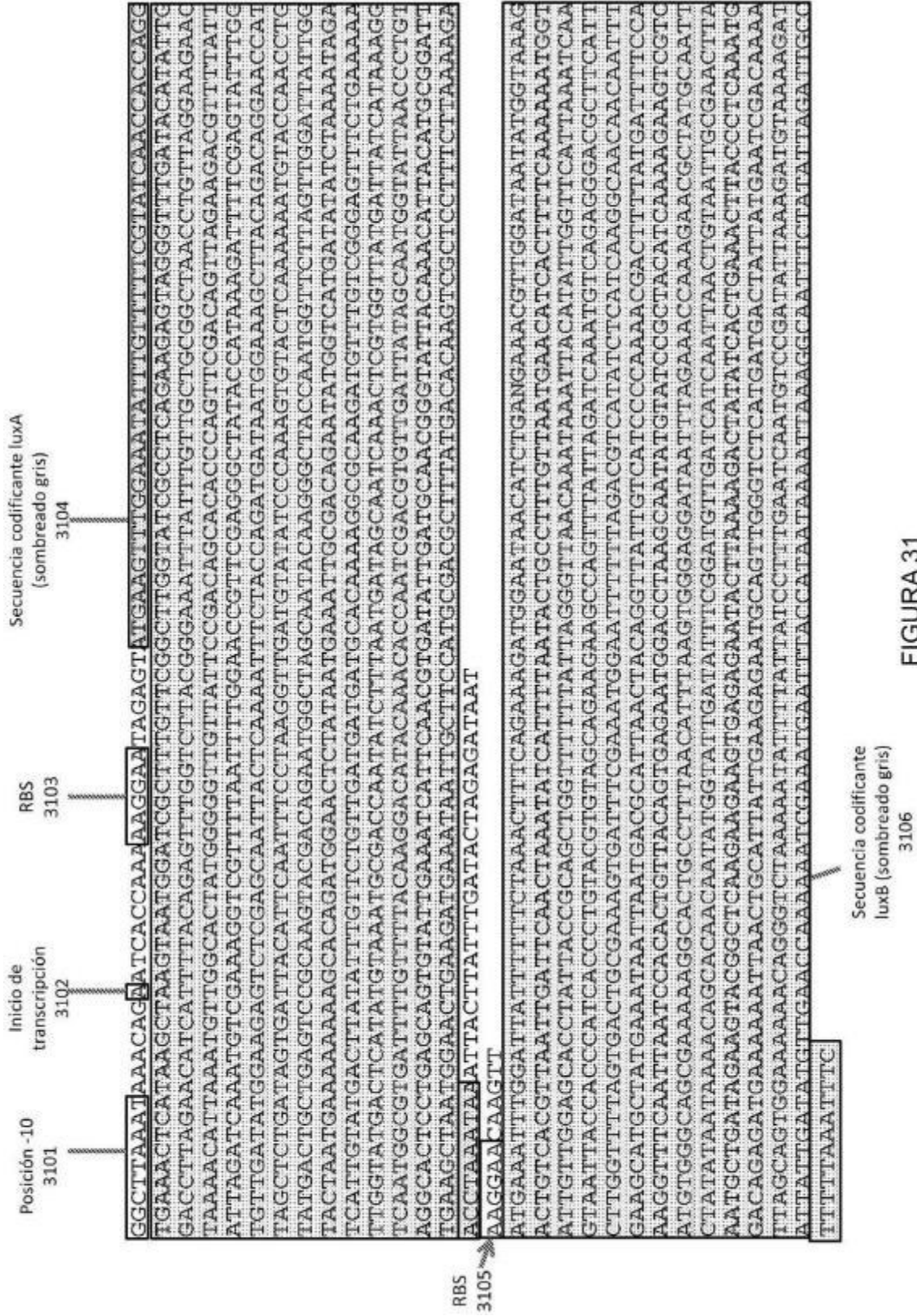


FIGURA 31

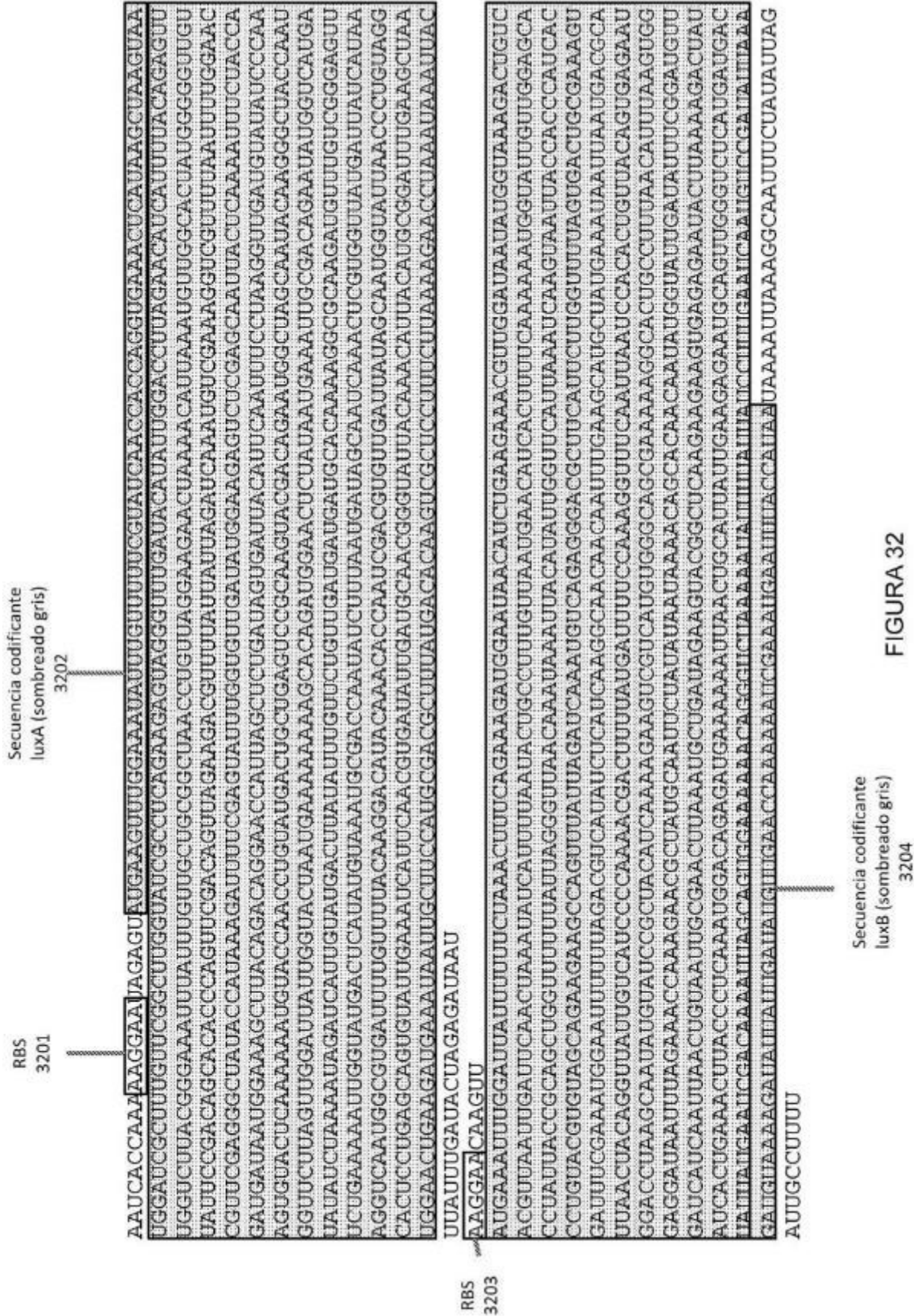


FIGURA 32

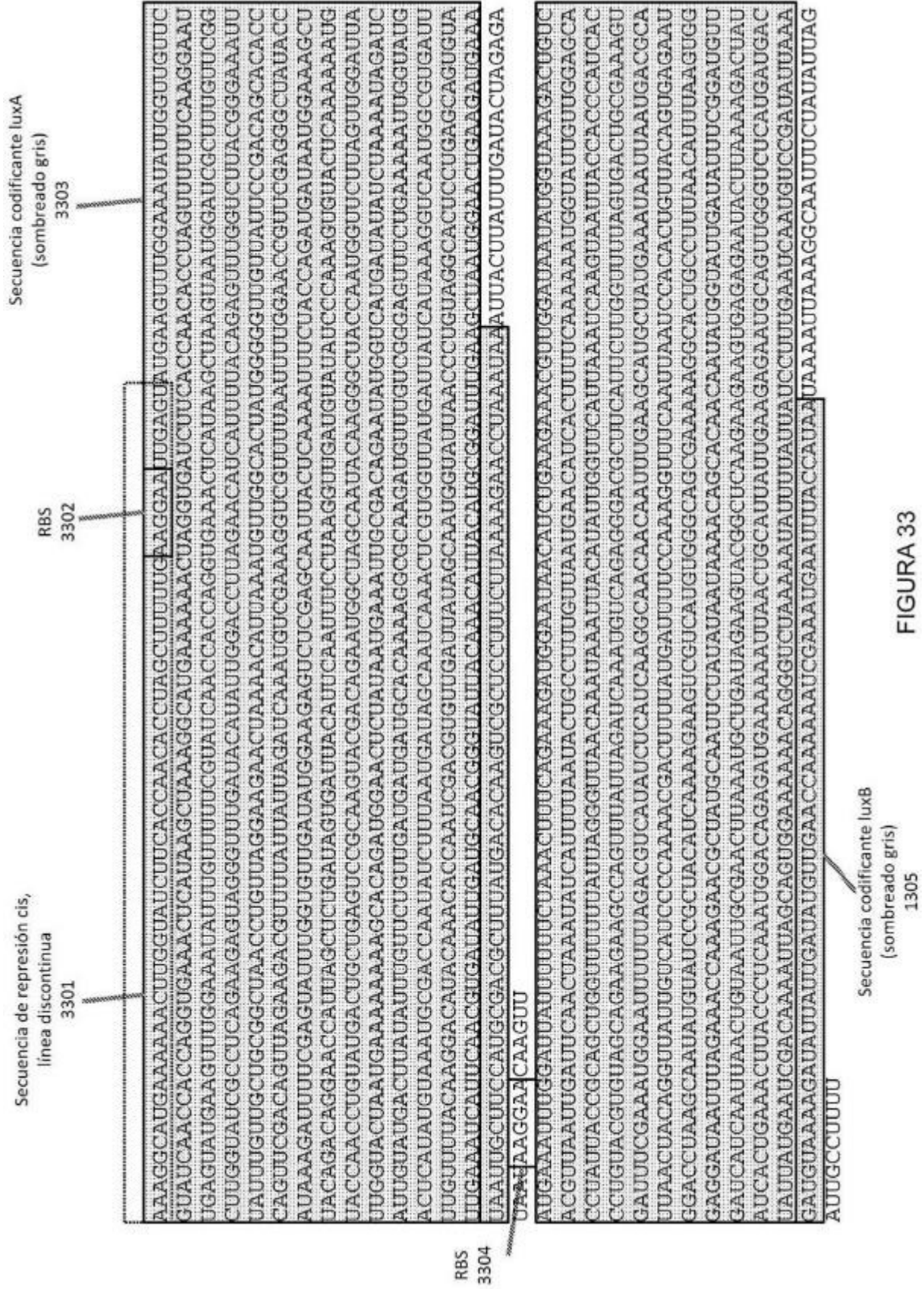


FIGURA 33

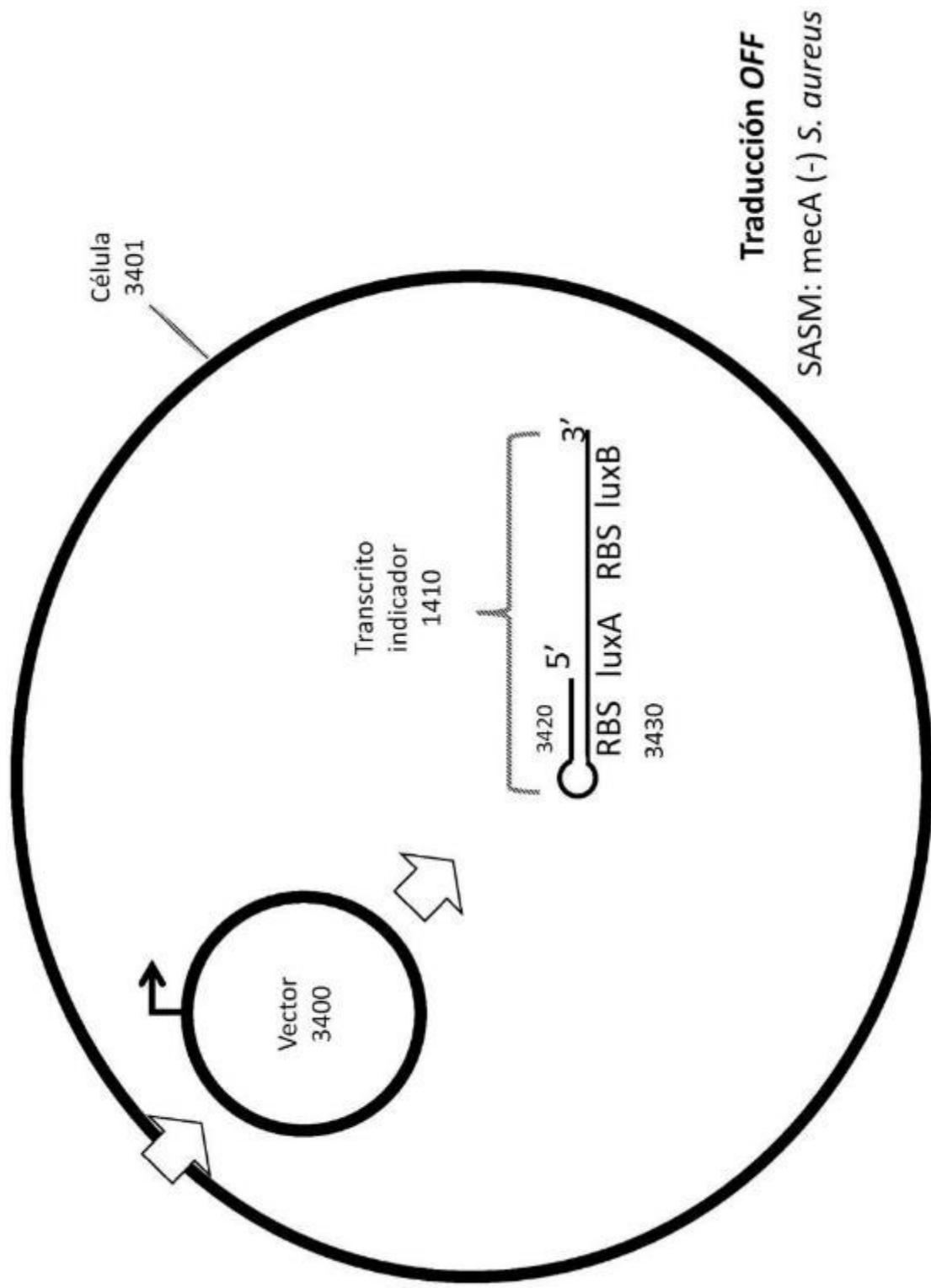


FIGURA 34

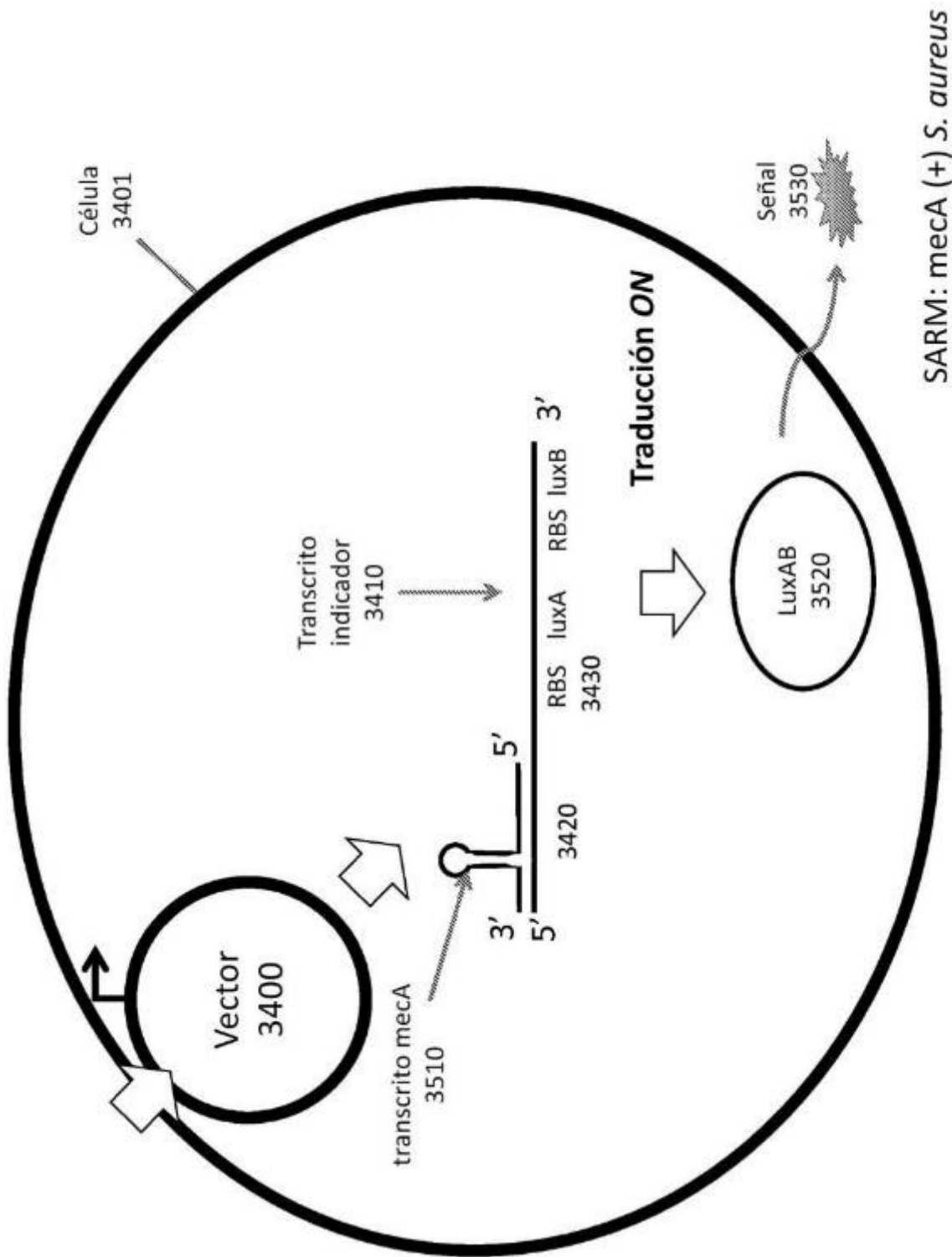


FIGURA 35