



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 269 139**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
C07K 14/31 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00928884 .6**
86 Fecha de presentación : **03.05.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1177317**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **06.02.2002**

54 Título: **Sondas polinucleotídicas para la detección exclusiva y cuantificación de *Staphylococcus*.**

30 Prioridad: **03.05.1999 US 132409 P**

73 Titular/es: **GEN-PROBE INCORPORATED**
10210 Genetic Center Drive
San Diego, California 92121-4362, US

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

72 Inventor/es: **Hogan, James, J. y**
Gordon, Patricia

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

Sondas polinucleotídicas para la detección exclusiva y cuantificación de *Staphylococcus*.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a sistemas de detección de ácidos nucleicos. De forma más específica, la invención se refiere a sondas polinucleotídicas que presentan especificidad de unión a rRNA o a rDNA de bacterias que son miembros del género *Staphylococcus*.

10 **Antecedentes de la invención**

Las bacterias del género *Staphylococcus* están clasificadas como miembros de la agrupación amplia *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus*. Los parientes filogenéticos más cercanos al género *Staphylococcus* incluyen los géneros, 15 *Bacillus*, *Bronchothrix*, *Enterococcus*, *Listeria* y *Planococcus*. Las bacterias tipo estafilococo son cocos no motiles, gram positivos, con unos porcentajes molares genómicos de guanina y citosina (G + C) del orden del 30 al 39%. Estas bacterias generalmente se encuentran en la piel o en superficies mucosas de humanos. Cabe destacar que estos organismos pueden llegar a ser patógenos oportunistas en caso de traumatismo en la piel. De hecho, el *S. aureus* está asociado frecuentemente a infecciones cutáneas. Las infecciones de heridas y tejido profundo con especies de estafilococos pueden amenazar la supervivencia del individuo.

Se sabe que dos cadenas simples de ácido desoxiribonucleico (DNA) o de ácido ribonucleico (RNA) pueden asociarse o “hibridar” entre sí para formar una estructura de doble cadena con las dos cadenas unidas entre sí mediante enlaces de hidrógeno entre pares de bases complementarias. Las cadenas individuales de ácidos nucleicos están formadas por nucleótidos que contienen las bases adenina (A), citosina (C), timina (T), guanina (G), uracilo (U) e inosina (I). En la estructura de doble hélice de los ácidos nucleicos la base adenina se une mediante enlace de hidrógeno con las bases timina o uracilo, la base guanina se une mediante enlace de hidrógeno con la base citosina y la base inosina se une mediante enlace de hidrógeno con adenina, citosina o uracilo. Por lo tanto, en cualquier punto a lo largo de la cadena pueden encontrarse los pares de bases clásicos de “Watson-Crick” A:T o A:U, T:A o U:A y G:C o C:G. Aún 30 sí, también se pueden encontrar A:G, G:U y otros pares “inestables” o mal aparejados además de los pares de bases tradicionales (“convencionales”).

Si, bajo condiciones promotoras de la hibridación, se pone en contacto un polinucleótido de cadena simple con un segundo polinucleótido de cadena simple con un número suficiente de bases contiguas complementarias a la secuencia 35 del primer polinucleótido se obtiene un híbrido de ácidos nucleicos de cadena doble. Bajo las condiciones apropiadas se pueden formar híbridos DNA/DNA, RNA/DNA o RNA/RNA.

Generalmente una sonda es un polinucleótido de cadena simple con cierto grado de complementariedad con la secuencia de ácidos nucleicos a detectar (“secuencia diana”). Las sondas generalmente están marcadas con un fragmento detectable, como un radioisótopo, antígeno o fragmento quimioluminiscente.

Khone en la Patente Estadounidense Núm. 4 851 330 y Hogan *et al.* en las Patentes Estadounidenses Núms. 5 541 308 y 5 681 698 proporcionan descripciones de la hibridación de ácidos nucleicos como procedimiento para detectar secuencias de ácidos nucleicos en particular. Estas referencias también describen métodos para determinar la presencia 45 de organismos que contienen RNA en una muestra que pudiera contener este tipo de organismos. Los procedimientos requieren sondas que sean suficientemente complementarias al RNA ribosomal (rRNA) de uno o más organismos no-virales o grupos de organismos no-virales. De acuerdo con este método, primero se mezclan ácidos nucleicos de una muestra a analizar con la sonda apropiada y después se incuba bajo condiciones específicas de hibridación. Generalmente, aunque no necesariamente, la sonda se marcará con un marcador detectable. Después se analiza la reacción de hibridación resultante para detectar y cuantificar la cantidad de sonda marcada que ha formado estructuras de dúplex, para así detectar la presencia de rRNA contenido en la muestra de prueba.

Con la excepción de los virus, todos los organismos procariotas contienen genes de rRNA que codifican homólogos de las moléculas de RNA procariotas 5S, 16S y 23S. En eucariotas, estas moléculas de rRNA son los rRNA 5S, 5.8S, rRNA 18S y rRNA 28S, que son sustancialmente similares a las moléculas procariotas. Anteriormente se han descrito sondas para detectar subsecuencias diana de rRNA específicamente en organismos particulares o en grupos de organismos en una muestra. La PE-A-0 786 519 (Human Genome Sciences Inc., 1997) describe secuencias nucleotídicas del genoma de *Staphylococcus aureus*. En particular esta referencia describe sondas de ácidos nucleicos y pruebas para la detección de *Staphylococcus aureus* en una muestra. Por lo tanto se emplearon condiciones astringentes 60 de hibridación y sondas de DNA que contenían un marcador detectable. De forma ventajosa, bajo las condiciones de astringencia apropiadas, estas secuencias de sonda altamente específicas no presentan reacciones cruzadas con otros ácidos nucleicos de cualquier otra especie de bacteria o agente infeccioso.

La presente invención proporciona sondas nucleotídicas que pueden utilizarse para detectar los miembros del género *Staphylococcus* de forma altamente específica.

Resumen de la invención

Un aspecto de la presente invención se refiere a una composición de sonda para detectar ácidos nucleicos de bacterias miembros del género *Staphylococcus*. Esta composición incluye una sonda oligonucleotídica que hibrida con una región diana de estafilococo que corresponde a las posiciones nucleotídicas 1276-1305 del rRNA 16S de *E. coli* para formar un dúplex diana. Esta sonda oligonucleotídica tiene la longitud y secuencia de ID DE SEC NUM: 1 o el complemento de la misma y opcionalmente una secuencia no complementaria que no hibrida con la región diana de dichos rRNA o rDNA estafilocócos e hibrida específicamente con los ácidos nucleicos presentes en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus delphi*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus warneri*. En determinadas realizaciones la sonda oligonucleotídica está formada por DNA. En otras realizaciones la composición de sonda inventada además incluye un marcaje detectable en la sonda oligonucleotídica. El marcador detectable puede ser quimioluminiscente, como éster de acridinio, o un radiomarcador. En una realización preferida la composición de sonda inventada incluye al menos un oligonucleótido adyuvante que facilita la formación del dúplex detectable sonda:diana. Estos oligonucleótidos adyuvantes pueden incluir al menos un análogo de nucleótido, como una fracción ribosa con un grupo metoxi dispuesto en la posición 2'. En una realización especialmente preferida de la composición de sonda de la invención, el oligonucleótido adyuvante tiene una secuencia proporcionada en ID DE SEC NUM: 2 o ID DE SEC NUM: 3.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para detectar la presencia de bacterias del género *Staphylococcus* en una muestra de prueba. Este método implica pasos para situar en la muestra de prueba una composición de sonda que incluye una sonda oligonucleotídica que hibrida con una región diana de estafilococo correspondiente a las posiciones nucleotídicas 1276-1305 de rRNA 16 S de *E. coli* para formar un dúplex detectable sonda:diana. La sonda oligonucleotídica tiene la longitud y secuencia de ID DE SEC NUM: 1 o el complemento de la misma y opcionalmente una secuencia no complementaria que no hibrida con la región diana de dichos rRNA o rDNA estafilocócos e hibrida específicamente los ácidos nucleicos presentes en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus delphi*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus warneri*. Después la mezcla resultante se hibrida de manera que los ácidos nucleicos de las bacterias *Staphylococcus* que pueden estar presentes en la muestra forman dúplex sonda:diana con los oligonucleótidos de la sonda. Finalmente, el método implica la detección de dúplex sonda:diana como indicadores de la presencia de bacterias *Staphylococcus* en la muestra de prueba. En una realización del método de la invención la muestra de prueba incluye bacterias y se lleva a cabo un paso preliminar para liberar ácidos nucleicos de cualquier bacteria que pueda estar presente en dicha muestra de prueba. En otra realización del método, la muestra de prueba es un lisado. En general, se pueden proporcionar condiciones de hibridación altamente astringentes mediante: (a) tampón de fosfato sódico 0,48 M; sulfato sódico dodecílico al 0,1%; y EDTA y EGTA 1 mM cada uno; o (b) LiCl 0,6 M, laurilsulfato de litio al 1%; succinato de litio 60 mM y EDTA y EGTA 10 mM cada uno. Aún así, debe tenerse en cuenta que otras condiciones de hibridación altamente astringentes pueden proporcionar buenos resultados. La sonda oligonucleotídica puede incluir opcionalmente un marcador detectable. Este marcador detectable puede ser un éster de acridinio. Cuando este es el caso, el paso de detección del método de la invención puede incluir una luminometría para detectar cualquier dúplex sonda:diana que se forme en el paso de hibridación. La composición de sonda además puede incluir al menos un oligonucleótido adyuvante que facilita la formación del dúplex sonda:diana. Son oligonucleótidos altamente preferidos los que tienen las secuencias ID DE SEC NUM: 2 y ID DE SEC NUM: 3.

Otro aspecto de la invención se refiere a un equipo que puede utilizarse para detectar la presencia de ácidos nucleicos de bacterias del género *Staphylococcus* en una muestra de prueba. El equipo contiene una composición de prueba que incluye una sonda oligonucleotídica que hibrida bajo condiciones altamente astringentes con una región diana de estafilococo correspondiente a las posiciones nucleotídicas 1276-1305 del rRNA 16S de *E. coli*, para formar un dúplex sonda: diana. La sonda oligonucleotídica tiene la longitud y secuencia de ID DE SEC NUM: 1 o el complemento de la misma y opcionalmente una secuencia no complementaria que no hibrida con la región diana de dichos rRNA o rDNA estafilocócos e hibrida específicamente los ácidos nucleicos presentes en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus delphi*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus warneri*.

Definiciones

Como se utilizan aquí, los siguientes términos tienen los significados proporcionados, excepto en caso de que se indique expresamente lo contrario.

Un "nucleótido" es una subunidad de un ácido nucleico que consiste en un grupo fosfato, un azúcar de 5 carbonos y una base nitrogenada. El azúcar de 5 carbonos que se encuentra en el RNA es la ribosa. En el DNA el azúcar de 5 carbonos es la 2'-desoxirribosa. En los nucleótidos 5' el azúcar contiene un grupo hidroxilo (-OH) en el carbono 5'. El término también incluye análogos de estas subunidades, como un grupo metoxi en la posición 2' de la ribosa (OMe). Como se utiliza aquí, los oligonucleótidos metoxi que contienen residuos "T" tienen un grupo metoxi en la posición 2' de la fracción ribosa y un uracilo en la posición base del nucleótido.

Una “unidad no nucleotídica” es una unidad que no participa significativamente en la hibridación de un polímero. Estas unidades no deben participar, por ejemplo, en ningún enlace de hidrógeno con un nucleótido y se excluyen las unidades que tienen como componente una de las cinco bases nucleotídicas o análogos de las mismas.

5 Un “oligonucleótido” es un polímero de nucleótidos que tiene dos o más subunidades nucleotídicas unidas de forma covalente entre sí. Los oligonucleótidos tienen generalmente de 10 a 100 nucleótidos de longitud. Los grupos azúcar de las subunidades nucleotídicas pueden ser ribosa, desoxiribosa o derivados modificados de los mismos como el OMe. Las subunidades nucleotídicas pueden unirse mediante enlaces fosfodiéster, enlaces modificados o fragmentos no nucleotídicos que no evitan la hibridación de los oligonucleótidos con su secuencia nucleotídica diana complementaria. 10 Los enlaces modificados incluyen aquellos en los que un enlace fosfodiéster estándar está reemplazado por un enlace diferente, como un enlace fosforotioato, un enlace metilfosfonato o un enlace peptídico neutral. Los análogos de bases nitrogenadas también pueden ser componentes de oligonucleótidos de acuerdo con la invención.

15 Un “ácido nucleico diana” es un ácido nucleico que contiene una secuencia diana de ácido nucleico.

Una “secuencia diana de ácido nucleico”, “secuencia nucleotídica diana” o “secuencia diana” es una secuencia de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos que puede hibridar con un oligonucleótido.

20 Una sonda “oligonucleotídica” es un oligonucleótido con una secuencia nucleotídica suficientemente complementaria a su secuencia de ácidos nucleicos diana como para ser capaz de formar un dúplex híbrido sonda:diana detectable bajo condiciones de hibridación altamente astringentes. Una sonda oligonucleotídica es una especie química aislada y puede incluir nucleótidos adicionales fuera de la región diana siempre que estos nucleótidos no eviten la hibridación bajo condiciones de hibridación altamente astringentes. Para facilitar la detección mediante las sondas de la invención se pueden utilizar secuencias no complementarias, como las secuencias promotoras, sitios de reconocimiento 25 de endonucleasas de restricción, o secuencias que confieren una estructura secundaria o terciaria deseada como un sitio catalítico activo. Las sondas oligonucleotídicas opcionalmente se pueden marcar con una fracción detectable como un radioisótopo, una fracción fluorescente, una fracción quimioluminiscente, un enzima o un ligando, que puede utilizarse para detectar o confirmar la hibridación de la sonda con su secuencia diana. Se prefiere que las sondas oligonucleotídicas sean de una longitud dentro de rango de 10 a 100 nucleótidos.

30 Una “fracción detectable” es una molécula unida a, o sintetizada como parte de, una sonda de ácidos nucleicos. Esta molécula debe ser detectable de forma única y permitir que la sonda sea detectada como resultado de esto. Estas fracciones detectables son a menudo radioisótopos, moléculas quimioluminiscentes, enzimas, haptenos, o incluso secuencias únicas de oligonucleótidos.

35 Un “híbrido” o un “dúplex” es un complejo formado entre dos secuencias de ácidos nucleicos de cadena simple mediante emparejamientos de bases de Watson-Crick o emparejamientos de bases no convencionales entre las bases complementarias.

40 “Hibridación” es el proceso mediante el cual dos cadenas de ácidos nucleicos complementarias se combinan para formar una estructura de doble cadena (“híbrido” o “dúplex”).

“Complementariedad” es una propiedad que confiere la secuencia de bases de una cadena simple de DNA o de RNA que puede formar un híbrido o doble cadena DNA:DNA, RNA:RNA o DNA:RNA mediante enlaces de hidrógeno 45 entre pares de bases de Watson-Crick en las respectivas cadenas. Generalmente la adenina (A) complementa la timina (T) o uracilo (U), y la guanina (G) generalmente complementa la citosina (C).

50 “Mal apareamiento” se refiere a cualquier apareamiento de dos nucleótidos, en un híbrido, que no forme enlaces de hidrógeno de Watson-Crick convencionales. Además, para los propósitos de las siguientes exposiciones, un mal apareamiento puede incluir una inserción o delección en una cadena del híbrido que conduce a un nucleótido desaparejado.

El término “astringencia” se utiliza para describir la temperatura y composición de disolvente que hay durante la hibridación y los siguientes pasos de tratamiento. Bajo condiciones altamente astringentes solamente se formarán 55 híbridos de ácidos nucleicos altamente complementarios; los híbridos sin un grado de complementariedad suficiente no se formarán. De acuerdo con esto, la astringencia de las condiciones de ensayo determina la complementariedad necesaria para que dos cadenas de ácidos nucleicos formen un híbrido. Las condiciones de astringencia se escogen de forma que maximicen la diferencia en estabilidad entre los híbridos formados con ácidos nucleicos diana y no diana. En los Ejemplos de trabajo se proporcionan ejemplos de condiciones altamente astringentes.

60 El término “especificidad de sonda” se refiere a una característica de la sonda que describe su capacidad para distinguir entre las secuencia diana y no diana.

El término “región variable” se refiere a un polímero de nucleótidos que difiere en al menos una base entre los 65 organismos diana y los organismos no diana que contiene la muestra.

Una “región conservada” es una subsecuencia de ácidos nucleicos que no es variable entre al menos dos polinucleótidos distintos.

Las “bacterias” son miembros del grupo filogenético eubacteria, que se considera uno de los tres reinos principales.

El término “divergencia de secuencia” se refiere a un proceso mediante el cual los polímeros de nucleótidos se vuelven menos similares durante la evolución.

El término “convergencia de secuencia” se refiere a un proceso mediante el cual los polímeros de nucleótidos se vuelven más similares durante la evolución.

“Tf” se refiere a la temperatura a la que el 50% de la sonda pasa de la forma hibridada a la no hibridada.

Un “oligonucleótido adyuvante” es un oligonucleótido que se une a una región del ácido nucleico diana distinta a la que se une a la sonda oligonucleotídica. Los oligonucleótidos adyuvantes imponen estructuras secundarias y terciarias sobre la región diana del ácido nucleico de cadena simple de forma que la tasa de unión de la sonda oligonucleotídica se acelera. Aunque los oligonucleótidos adyuvantes no están marcados con un marcador detectable cuando se utilizan junto con las sondas oligonucleotídicas marcadas, facilitan la unión de las sondas marcadas y además potencian las señales de hibridación de forma indirecta.

Las expresiones “consiste esencialmente en” y “que consiste esencialmente en” significan que el oligonucleótido tiene una secuencia nucleotídica similar a la secuencia nucleotídica especificada. Cualquier adición o delección será una variación no material de la secuencia nucleotídica especificada que no evite que los oligonucleótidos tengan su propiedad reivindicada, como ser capaces de hibridar preferentemente bajo condiciones de alta astringencia con sus ácidos nucleicos diana respecto a con los ácidos nucleicos no diana.

Los expertos en la materia deben comprender que las sondas que corresponden sustancialmente a la invención pueden diferir de la secuencia referida y aún así hibridar con la misma secuencia diana de ácidos nucleicos. Esta variación del ácido nucleico puede expresarse en términos de porcentaje de bases idénticas dentro de la secuencia o como porcentaje de bases perfectamente complementarias entre la sonda y su secuencia diana. Las sondas de la presente invención corresponden sustancialmente a una secuencia de ácidos nucleicos si estos porcentajes son de 100% al 80% o si se dan de 0 a 2 malos apareamientos en una secuencia diana de 10 nucleótidos. En realizaciones preferidas, el porcentaje es del 100% al 85%. En realizaciones aún más preferidas en porcentaje es del 90% al 100%; en otras realizaciones preferidas este porcentaje es del 95% al 100%.

Las expresiones “suficientemente complementarios” o “sustancialmente complementarios” se refieren a los ácidos nucleicos con una cantidad suficiente de nucleótidos complementarios contiguos para formar, bajo condiciones de alta astringencia, un híbrido estable para la detección.

“Híbrido de ácidos nucleicos” o “dúplex sonda:diana” se refieren a la estructura de doble cadena con uniones de hidrógeno, preferiblemente de 10 a 100 nucleótidos de longitud, más preferiblemente de 14 a 50 nucleótidos de longitud. La estructura es suficientemente estable para detectarse mediante medios como la detección de luz quimioluminiscente o fluorescente, autoradiografía, análisis electroquímico o electroforesis de gel. Estos híbridos incluyen moléculas dúplex RNA:RNA, RNA:DNA o DNA:DNA.

“Sentido negativo” se refiere a la molécula de ácidos nucleicos perfectamente complementaria a una referencia (es decir, sentido) de molécula de ácido nucleico.

“Equivalentes de RNA y DNA” se refiere a moléculas de RNA y DNA con las mismas propiedades de hibridación de bases complementarias. Los equivalentes de RNA y DNA tienen grupos de azúcar diferentes (es decir, ribosa en vez de desoxirribosa) y pueden diferir por la presencia de uracilo en el RNA y de timina en el DNA. La diferencia entre los equivalentes de RNA y DNA no conlleva diferencias sustanciales en las correspondientes secuencias de ácidos nucleicos porque los equivalentes tienen el mismo grado de complementariedad con una secuencia en particular.

La expresión “hibridan preferentemente” se refiere a que bajo condiciones de hibridación altamente astringentes las sondas de oligonucleótidos pueden hibridar con sus ácidos nucleicos diana para formar híbridos sonda:diana estables (indicando de esta manera la presencia de los ácidos nucleicos diana) sin formar híbridos sonda:no-diana estables (esto indicaría la presencia de ácidos nucleicos no diana de otros organismos). De esta forma, la sonda hibrida con el ácido nucleico diana en un grado suficientemente superior al de con los ácidos nucleicos no diana como para permitir que el experto en la materia detecte de forma adecuada la presencia de bacterias del género *Staphylococcus* y distinga su presencia de la de otros organismos. La hibridación preferente puede medirse mediante técnicas conocidas en la materia y descritas aquí. Por ejemplo, al comparar con la hibridación con ácidos nucleicos de *C. albicans*, las sondas oligonucleotídicas de la invención hibridan de 500 a 3.000 veces más preferentemente con ácidos nucleicos de bacterias del género *Staphylococcus*.

Una “región de secuencia de ácidos nucleicos diana” de bacterias del género *Staphylococcus* se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos presente en los ácidos nucleicos o en una secuencia complementaria de los mismos encontrada en bacterias estafilocócicas que no está presente en los ácidos nucleicos de otras especies. Los ácidos nucleicos con secuencias nucleotídicas complementarias a una secuencia diana pueden generarse mediante técnicas de amplificación de diana como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la amplificación mediada por transcripción (p.ej., Kacian y Fultz, Nucleic Acid Sequence Amplification Methods, Patente Estadounidense Núm. 5 824 518).

Descripción breve de las figuras

La Figura 1 muestra las secuencias de una sonda oligonucleotídica y dos oligonucleótidos adyuvantes alineadas con las secuencias de algunos miembros de las especies que reaccionan de forma positiva y de las no relacionadas filogenéticamente que no hibridan con las sondas de la invención.

Descripción detallada de la invención

Aquí se describen las secuencias de nucleótidos diana preferidas para sondas oligonucleotídicas y oligonucleótidos adyuvantes que pueden utilizarse para detectar e identificar el rRNA o rDNA de bacterias miembros del género *Staphylococcus*. Se describen en particular una sonda de polinucleótidos especialmente preferida y oligonucleótidos accesorios para detectar específicamente estas bacterias. La sonda, que es complementaria a secuencias de rRNA particulares del rRNA 16S, tiene la ventaja de ser capaz de distinguir los organismos *Staphylococcus* de los organismos conocidos más próximos filogenéticamente.

Como se indica anteriormente, el oligonucleótido de la invención tenía como diana las secuencias de ácidos nucleicos de organismos del tipo estafilococo. Este oligonucleótido puede utilizarse como una sonda que hibrida preferentemente con una región diana de ácido nucleico para formar un dúplex detectable que indica la presencia de un organismo del tipo estafilococo. De forma alternativa, los oligonucleótidos de la invención pueden utilizarse como oligonucleótidos adyuvantes que hibridan con una región diana de ácido nucleico presente en estas bacterias y que pueden potenciar la formación de un dúplex entre una sonda de oligonucleótidos marcada y su ácido nucleico diana complementario.

En realizaciones preferidas, la sonda oligonucleotídica aquí descrita hibrida selectivamente con ácidos nucleicos de organismos estafilocócicos mejor que con los de otros organismos. En algunas realizaciones de la presente invención la sonda oligonucleotídica contiene un fragmento detectable, como un éster de acridinio o un radioisótopo.

Los métodos preferidos para detectar la presencia de organismos del tipo estafilococo incluyen la puesta en contacto de una muestra de prueba con una sonda oligonucleotídica que hibrida preferentemente con un ácido nucleico diana de organismos estafilocócicos frente a una secuencia de ácidos nucleicos de otros organismos.

Las sondas preferidas para detectar el rRNA de bacterias del género *Staphylococcus* tienen la longitud y secuencia proporcionada en ID DE SEC NUM: 1 o el complemento de la misma, y opcionalmente incluyen una secuencia no complementaria que no hibrida con dicho rRNA de estafilococo. Las secuencias de oligonucleótidos preferidas incluyen equivalentes de RNA y de DNA y pueden incluir al menos un análogo de nucleótido.

Introducción y antecedentes

Durante el desarrollo de la invención, se alinearon secuencias de rRNA de un conjunto de organismos relacionados y no relacionados para identificar secuencias candidatas conservadas dentro del género *Staphylococcus* presentes en el rRNA 16S que pudieran utilizarse para distinguir organismos *Staphylococcus* de otras bacterias y organismos eucariotas. Los procedimientos empleados para realizar este descubrimiento incluyeron el examen de secuencias parciales o totales de rRNA o de rDNA de organismos estafilocócicos y organismos próximos filogenéticamente y no relacionados, alineando las secuencias para revelar las áreas de homología máxima y examinar el alineamiento en regiones con variación de secuencia para así poder identificar las secuencias de rRNA que se conservan entre los miembros del género *Staphylococcus* pero que muestran malos apareamientos con las secuencias de rRNA de otros géneros relacionados estrecha o distantemente. Las secuencias deducidas como sondas candidatas de acuerdo con los métodos descritos posteriormente se pusieron a prueba frente a un panel de rRNA estándar y lisados bacterianos para verificar su utilidad como sondas bajo condiciones de laboratorio.

Las secuencias de polinucleótidos de rRNAs se determinan de forma más conveniente mediante un procedimiento de secuenciación de didesoxinucleótidos. En este procedimiento, los cebadores de oligonucleótidos de aproximadamente 10-100 bases de longitud y complementarios a regiones conservadas de rRNA de cualquiera de las subunidades ribosómicas 5S, 16S o 23S pueden extenderse mediante transcriptasa inversa. Los productos de extensión de DNA resultantes se pueden secuenciar después o mediante degradación química o mediante secuenciación de didesoxinucleótidos (Lane *et al.*, Proc Natl. Acad. Sci. USA 82: 6955 (1985)). De acuerdo con otro método preferido, también pueden determinarse las secuencias de genoma que codifican el rRNA.

La marcada independencia de la estructura secundaria y función de las moléculas de rRNA se conoce ampliamente. De hecho, los cambios en la evolución de la secuencia primaria del rRNA están restringidos de forma efectiva de manera que la estructura secundaria se mantiene. Por ejemplo, si se cambia una base en un lado de la hélice de una molécula de rRNA, se producirá un cambio de compensación en el otro lado de la hélice para conservar la complementariedad (esto se denomina covariación). Esta relación permite que dos secuencias de rRNA muy diferentes se "alineen" en base a una secuencia primaria conservada y a elementos conservados de la estructura secundaria. Una vez se han alineado las secuencias se vuelve posible identificar las regiones conservadas y variables de la secuencia de RNA.

Las regiones variables de rRNAs se identificaron mediante análisis comparativo mediante secuencias de rRNA publicadas y secuencias que se determinaron durante el desarrollo de la presente invención. Se puede utilizar o adaptar software comercialmente disponible con los propósitos aquí descritos. Dado que la evolución de secuencia en cada una de las regiones variables de rRNA (por ejemplo, cruzando un mínimo de 10 nucleótidos) es, en su mayor parte, divergente y no convergente, se pueden diseñar de forma fiable sondas basadas en unas pocas secuencias de rRNA de varios organismos diana y sus parientes filogenéticos más cercanos en una sola muestra para permitir el diseño de una sonda que pueda utilizarse de acuerdo con los métodos descritos a continuación.

Directrices de Selección de Sondas

Las siguientes directrices generales se pueden utilizar para diseñar sondas con las características deseadas de acuerdo con la presente invención. La manipulación de uno o más de los muchos factores que influyen en el grado y especificidad de una reacción de hibridación puede determinar la sensibilidad y especificidad de una sonda en particular. Esto es cierto independientemente de si la sonda es perfectamente complementaria durante la longitud completa de su secuencia polinucleotídica completa. A continuación se proporcionan directrices para preparar sondas útiles relacionadas con la invención.

Primero, se debe escoger una estabilidad de híbrido sonda:ácido nucleico diana compatible con las condiciones de ensayo. Esto puede conseguirse evitando secuencias largas ricas en A y T, terminando los híbridos con pares de bases G:C y diseñado la sonda de tal forma que la Tf sea apropiada para las condiciones estándar a utilizar en el ensayo. La secuencia de nucleótidos de la sonda debe escogerse de tal forma que la longitud y % de G y % de C conduzcan a una sonda con una Tf de aprox 2-10°C superior a la temperatura a la que se realice la prueba final. La composición de bases de la sonda es significativa porque los pares de bases G:C muestran una estabilidad térmica superior a los pares de bases A:T. De esta forma, los híbridos que implican ácidos nucleicos complementarios con un alto contenido en G:C son estables a temperaturas superiores a los que contienen menos G:C.

La fuerza iónica y las condiciones de temperatura a las que se llevará a cabo la reacción de hibridación deben considerarse al diseñar sondas con una cadena principal de carga negativa, como proporcionarían los enlaces fosfodiéster entre nucleótidos. Es de conocimiento general el hecho de que la tasa de hibridación aumenta proporcionalmente a la fuerza iónica de la mezcla de reacción. De forma similar, la estabilidad térmica de los híbridos aumenta proporcionalmente a la fuerza iónica. De forma contraria, los reactivos disruptores de enlaces de hidrógeno como la formamida, urea, DMSO y alcoholes potencian la astringencia de hibridación. La desestabilización de los enlaces de hidrógeno mediante reactivos para sondas de oligonucleótidos sintéticos de aproximadamente 10 a 50 bases de longitud tienen lugar a aproximadamente 5°C por debajo de la temperatura de fusión para un dúplex dado. Las reacciones de hibridación llevadas a cabo por debajo de la temperatura óptima pueden permitir que secuencias de bases mal aparejadas hibriden y reducir la especificidad de la sonda.

Segundo, la posición en la que la sonda se une a su polinucleótido diana debe escogerse de forma que se minimice la estabilidad de los híbridos sonda:polinucleótidos no diana formados. Esto puede conseguirse minimizando la longitud de complementariedad perfecta con polinucleótidos de organismos no diana, evitando regiones de homología ricas en G:C con secuencias no diana, y situando la sonda de forma que abarque tantos desaparejamientos como sea posible. El hecho de si una sonda es útil para detectar solamente un tipo de organismo específico depende mayoritariamente de las diferencias en la estabilidad térmica entre los híbridos sonda:diana y los híbridos sonda:no diana. Para producir sondas altamente específicas las diferencias entre las Tf deben ser las máximas posibles.

La longitud de la secuencia de ácidos nucleicos diana y la longitud correspondiente de la secuencia de sonda también son factores importantes a considerar al diseñar una sonda útil para detectar *Staphylococcus* de forma específica. Mientras que es posible que los polinucleótidos que no son perfectamente complementarios hibriden entre sí, el determinante principal de la estabilidad del híbrido generalmente será el fragmento más largo de secuencia de bases perfectamente homólogos.

Tercero, las regiones del rRNA que se sabe que forman fuertes estructuras internas que inhiben la hibridación de las sondas son menos preferidas como diana. Las sondas con un alto grado de autocomplementariedad también deben evitarse. Como se indica anteriormente, la hibridación es la asociación de dos cadenas simples de ácidos nucleicos complementarios para formar una estructura de doble cadena unida por enlaces de hidrógeno. Si una de las dos cadenas es total o parcialmente bicatenaria, entonces será menos capaz de participar en la formación de un nuevo híbrido. De forma significativa, todas las moléculas de rRNA forman híbridos intramoleculares muy estables.

La proporción y extensión de la hibridación entre una sonda y su diana puede aumentarse de forma sustancial al diseñar la sonda de forma que una parte sustancial de la secuencia de interés sea de cadena simple. Si el ácido nucleico diana a detectar es una secuencia genómica que codifica rRNA, la diana estará en forma natural de doble cadena. Este es también el caso en productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estas dianas de doble cadena son inhibidoras naturales de la hibridación con una sonda. Finalmente, se pueden formar híbridos intramoleculares e intermoleculares indeseables dentro de una molécula sola de sonda o entre distintas moléculas de sonda si hay suficiente autocomplementariedad. De esta forma, deben evitarse las proporciones altas de autocomplementariedad en una secuencia de sonda.

Preferiblemente, las sondas útiles para llevar a cabo los procedimientos descritos posteriormente hibridarán únicamente bajo condiciones de alta astringencia. Bajo estas condiciones solamente se formarán híbridos de ácidos nucleicos altamente complementarios (es decir, aquellos que en una serie contigua de bases tengan al menos 14 de 17 bases complementarias). En ausencia de suficiente grado de complementariedad no se formarán híbridos. De acuerdo con esto, la astringencia de las condiciones de ensayo determina la cantidad de complementariedad necesaria para que dos cadenas de ácidos nucleicos formen un híbrido. La astringencia se escoge de forma que maximice las diferencias en la estabilidad entre los híbridos formados con los ácidos nucleicos diana y no diana.

Aunque para detectar *Staphylococcus* se pueden utilizar sondas oligonucleotídicas de longitudes y composiciones de bases diferentes, la sonda de esta invención tiene la longitud y secuencia proporcionadas en ID DE SEC NUM: 1 o un complemento de la misma. Aún así, las secuencias de sonda descritas posteriormente también pueden proporcionarse en un vector de clonación de ácidos nucleicos o un transcrito u otros ácidos nucleicos más largos y utilizarse igualmente para detectar miembros del género *Staphylococcus*.

15 Estructura química de los oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos de la presente invención pueden modificarse con grupos químicos para potenciar su rendimiento. De esta forma, debe entenderse que las referencias a “sondas oligonucleotídicas” o “oligonucleótidos adyuvantes” o simplemente “oligonucleótidos” incluyen polímeros de nucleótidos nativos así como polímeros que incluyen al menos un análogo de nucleótido.

Los oligonucleótidos con cadena modificada, como los que presentan grupos fosforotioato o metilfosfonato, son ejemplos de análogos que se pueden utilizar junto con oligonucleótidos de la presente invención. Estas modificaciones hacen que los oligonucleótidos sean resistentes a la actividad nucleolítica de determinadas polimerasas o enzimas nucleasa. Otros análogos que se pueden incorporar en las estructuras de los oligonucleótidos aquí descritos incluyen ácidos nucleicos peptídicos, o “PNA”. Los PNA son compuestos que contienen ligandos unidos a un esqueleto peptídico más que a un esqueleto fosfodiéster. Los ligandos representativos incluyen las cuatro bases naturales de DNA (es decir, timina, citosina, adenina o guanina) u otras nucleobases naturales (por ejemplo, inosina, uracilo, 5-metilcitosina o tiouracilo) o bases artificiales (por ejemplo, bromotimina, azaadeninas o azaguaninas, etc.) unidas a un esqueleto peptídico a través de un factor de unión adecuado. Los PNA son capaces de unirse a cadenas complementarias de ssDNA y RNA. En la Patente Estadounidense Número 5 539 082 se describen métodos para producir y utilizar PNA. Otro tipo de modificación que puede utilizarse para producir oligonucleótidos con las secuencias aquí descritas implica la utilización de factores de unión no nucleotídicos (por ejemplo, Arnold *et al.*, “Non-Nucleotidic Reagents for Nucleotide Probes”, Patente Estadounidense Núm. 6 031 091, incorporados aquí a modo de referencia) incorporados entre nucleótidos en la cadena de ácidos nucleicos que no interfieren con la hibridación o la elongación de un cebador.

Métodos Basados en Ácidos Nucleicos para Detectar rRNA o rDNA

Para detectar rRNA o rDNA de bacterias miembros del género *Staphylococcus* en un ensayo de hibridación puede utilizarse una composición que incluye una sonda oligonucleotídica, sola o en combinación con uno o más oligonucleótidos adyuvantes. Los oligonucleótidos definidos que pueden utilizarse para poner en práctica la invención pueden producirse mediante cualquiera de los diversos métodos conocidos, incluyendo la síntesis química automatizada de fase sólida mediante precursores cianoetilfosforamídita (Barone *et al.*, Nucl Acid Res 12:4051 (1984)). También se pueden utilizar otros métodos conocidos para preparar oligonucleótidos.

Esencialmente se puede utilizar cualquier sistema de marcaje y detección para monitorizar hibridaciones específicas de ácidos nucleicos junto con las sondas aquí descritas cuando se desea una sonda marcada. Entre un conjunto de marcadores útiles se encuentran: marcadores isotópicos, enzimas, haptenos, oligonucleótidos unidos, moléculas quimioluminiscentes y fragmentos activos redox útiles para métodos de detección electroquímicos. Los marcadores isotópicos que pueden utilizarse para obtener oligonucleótidos marcados son ^3H , ^{35}S , ^{32}P , ^{125}I , ^{57}Co y ^{14}C . Cuando se utilizan sondas radiomarcadas, se pueden detectar híbridos mediante autoradiografía, conteo de centelleo o conteo gamma.

Los materiales no isotópicos también pueden utilizarse para marcar sondas oligonucleotídicas. Estos marcajes no isotópicos pueden posicionarse de forma interna o en la parte terminal de una sonda oligonucleotídica. Se pueden incorporar nucleótidos modificados de forma enzimática o química, realizando las modificaciones de la sonda durante o después de la síntesis de esta, por ejemplo, mediante la utilización de grupos de unión no nucleotídicos. Los marcadores no isotópicos incluyen moléculas fluorescentes, moléculas quimioluminiscentes, enzimas, cofactores, sustratos de enzimas, haptenos u otros ligandos. Los ésteres de acridinio son marcadores no isotópicos particularmente preferidos útiles para la detección de híbridos de sonda.

De hecho, para preparar oligonucleótidos marcados de acuerdo con la invención se puede utilizar cualquier cantidad de marcadores no isotópicos distintos. Las moléculas quimioluminiscentes preferidas incluyen ésteres de acridinio del tipo descrito por Arnold *et al.*, en la Patente Estadounidense Número 5 283 174 para la utilización relacionada con ensayos de protección homogénea y del tipo descrito por Woodhead *et al.*, en la Patente Estadounidense Núm. 5 656 207 para la utilización relacionada con ensayos que cuantifican dianas múltiples en una sola reacción. Las descripciones incluidas en estas patentes se incorporan aquí a modo de referencia. La Patente Estadounidense 5 998 135 describe otro método que se puede utilizar para marcar y detectar las sondas de la presente invención mediante fluorimetría pa-

ra detectar emisión de fluorescencia de marcadores metálicos de lantánido dispuestos en sondas, donde la emisión de estos marcadores se potencia en caso de proximidad con una pareja que le transfiera energía. En las Patentes Estadounidenses Números 5 591 578 y 5 770 369 y la Solicitud de Patente Internacional publicada PCT/US98/12082, las descripciones de las cuales están incorporadas aquí a modo de referencia, se describen marcajes electroquímicos y aproximaciones de detección preferidas. Los fragmentos activos redox útiles como marcadores electroquímicos en la presente invención incluyen metales de transición como Cd, Mg, Cu, Co, Pd, Zn, Fe y Ru.

Los expertos en la materia sabrán apreciar que los procedimientos alternativos para detectar bacterias estafilocóccicas mediante las sondas inventadas pueden llevarse a cabo utilizando sondas marcadas o sin marcar. Por ejemplo, los métodos de ensayos de hibridación que no se basan en la utilización de una sonda marcada se describen en la Patente Estadounidense Número 5 945 286 que describe la inmovilización de sondas sin marcar hechas de ácidos nucleicos peptídicos (PNA) y moléculas intercaladas marcadas de forma detectable que se pueden unir a dobletes de doble cadena de ácidos nucleicos PNA sonda:diana. En estos procedimientos, así como en determinados procedimientos de detección electroquímicos, como los descritos en la Solicitud de Patente Internacional Núm PCT/US98/12082 publicada y titulada "Detección de Analitos mediante Energía de Reorganización", la Solicitud de Patente Internacional Núm PCT/US98/12430 publicada y titulada "Métodos eléctricos para la detección de analitos" y en la Solicitud de Patente Internacional Núm PCT/US97/20014 publicada y titulada "Electrodos unidos a ácidos nucleicos a través de oligómeros conductivos" la sonda oligonucleotídica no necesita contener un marcador detectable.

El grado de aceptabilidad del producto final tras la síntesis y purificación de un oligonucleótido puede verificarse mediante diversos procedimientos. Primero, se puede utilizar electroforesis en gel de poliacrilamida para determinar el tamaño y la pureza del oligonucleótido de acuerdo con métodos estándar de laboratorio (véase *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Sambrook *et al.*, eds. Cold Spring Harbor Lab Publ., 11.51, (1989)). De forma alternativa, se pueden utilizar cromatografías líquidas de alta presión ("HPLC") con este mismo propósito.

La hibridación entre la sonda oligonucleotídica marcada y el ácido nucleico diana en los procedimientos descritos a continuación puede potenciarse mediante la utilización de "oligonucleótidos adyuvantes" no marcados, de acuerdo con el procedimiento descrito por Hogan *et al.* en la Patente Estadounidense Núm 5 030 557 con título "Medios y métodos para potenciar la hibridación de ácidos nucleicos". Como se indica anteriormente, los oligonucleótidos adyuvantes se unen a una región del ácido nucleico diana distinta a la región a la que se une la sonda del experimento. Esta unión impone nuevas estructuras secundarias y terciarias en la región diana del ácido nucleico monocatenario y acelera la tasa de unión de la sonda. Los oligonucleótidos adyuvantes que se pueden utilizar junto con la sonda oligonucleotídica marcada de la presente invención tienen preferiblemente de 17 a 100 nucleótidos de longitud y más preferiblemente tienen la longitud y secuencia de ID DE SEC NUM: 2 o de ID DE SEC NUM: 3.

Los expertos en la materia apreciarán que los factores que afectan la estabilidad térmica del híbrido sonda:diana también pueden influir en la especificidad de sonda. De acuerdo con esto, las características de fusión, incluyendo la temperatura de fusión (T_f) de los híbridos sonda:diana, deben determinarse empíricamente para cada combinación sonda:diana. Un método preferido para llevar a cabo esta determinación es el descrito por Arnold *et al.* en la Patente Estadounidense Núm. 5 283 174, titulada "Ensayo de protección homogénea".

Un enfoque para medir la T_f de un híbrido sonda:diana implica llevar a cabo un estudio de protección de hibridación. De acuerdo con el método de este ensayo, se forma un híbrido sonda:diana bajo condiciones de exceso de diana en una solución tamponada con succinato de litio que contiene laurilsulfato de litio. Se diluyen alícuotas de los híbridos "preformados" en el tampón de hibridación y se incuban durante cinco minutos a varias temperaturas empezando por debajo de la T_f prevista (generalmente 55°C) y aumentándola en incrementos de 2-5 grados. Después esta solución se diluye con un tampón de boratos moderadamente alcalino y se incuba a temperatura inferior (por ejemplo 50°C) durante 10 minutos. Un éster de acridinio (AE) unido a una sonda de cadena simple se hidrolizará bajo estas condiciones, mientras que un éster de acridinio unido a una sonda hibridada estará relativamente "protegido". Este procedimiento se denomina ensayo de protección de hibridación ("HPA"). La cantidad de quimioluminiscencia remanente es proporcional a la cantidad de híbrido y se mide en un luminómetro mediante adición de peróxido de hidrógeno seguido de una base. Los datos se expresan como porcentaje de un máximo de señal (generalmente de la temperatura más baja) en relación a la temperatura. La T_f se define como el punto en el que permanece un 50% de la señal máxima.

En un enfoque alternativo, la T_f de un híbrido sonda:diana puede determinarse mediante una sonda marcada de forma isotópica. En todos los casos, la T_f de un híbrido variará dependiendo de la concentración de sales, detergentes y otros solutos que contengan las soluciones de hibridación. Todos estos factores influyen en la estabilidad relativa de híbrido durante la desnaturalización térmica (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Sambrook *et al.*, eds. Cold Spring Harbor Lb Publ., 9.51 (1989)).

La tasa a la que la sonda hibrida con su diana es una medida de la estabilidad térmica de la estructura secundaria de la diana en la región de la sonda y puede determinarse mediante medidas de $C_0t_{1/2}$. Estas determinaciones cinéticas de la tasa de hibridación tienen unidades de (moles de nucleótido por litro) x (segundo). Expresado de forma más sencilla, el valor de $C_0t_{1/2}$ es la concentración de sonda por la vida media de hibridación a esa concentración. Este valor puede determinarse mediante hibridación de varias cantidades de sonda con una cantidad constante de ácido nucleico diana durante un tiempo determinado. Por ejemplo, se incuban 0,05 pmol de diana con 0,012; 0,025; 0,05; 0,1 y 0,2 pmol de sonda durante 30 minutos. La $C_0t_{1/2}$ también puede determinarse hibridando la sonda y la diana bajo condiciones de exceso de diana y midiendo después el incremento de la formación de dúplex a lo largo del

tiempo. La cantidad de híbrido presente se puede medir mediante el procedimiento de HPA descrito anteriormente o mediante conteo de centelleo, si en el procedimiento se utiliza una sonda radiomarcada. La señal medida, cuando se utiliza una sonda marcada AE se plasma como el log del porcentaje del máximo de Unidades de Luz Relativa ("RLU") de la concentración más alta de sonda frente a la concentración de sonda (moles de nucleótido por litro). La $C_{0t_{1/2}}$ se determina de forma gráfica a partir de la concentración que corresponde al 50% del máximo de hibridación multiplicada por el tiempo de hibridación en segundos. Estos valores oscilan desde 9×10^{-6} hasta 9×10^{-5} siendo los valores preferidos inferiores a $3,5 \times 10^{-5}$. Se pueden obtener valores similares midiendo la radiactividad y expresando el % de hibridación en un tiempo determinado frente al máximo.

En un método preferido para determinar si una muestra biológica contiene rRNA o rDNA que indicaría la presencia de miembros del género *Staphylococcus*, los ácidos nucleicos se pueden liberar de las células bacterianas mediante disrupción sónica, por ejemplo de acuerdo con el método descrito por Murphy *et al.* en la Patente Estadounidense Núm. 5 374 522. Otros métodos conocidos para la disrupción de células incluyen la utilización de enzimas, choque osmótico, tratamiento químico, y vortado en recipientes de vidrio. Otros métodos adecuados para liberar de los microorganismos los ácidos nucleicos que se pueden someter a los métodos de hibridación aquí descritos han sido descritos por Clark *et al.*, en la Patente Estadounidense Núm. 5 837 452, y por Kacian *et al.*, en la Patente Estadounidense Núm. 5 364 763. Después o durante la liberación de rRNA se puede añadir sonda marcada en presencia de agentes acelerantes y se incubaba a la temperatura óptima de hibridación durante un periodo de tiempo necesario para obtener una reacción de hibridación significativa.

La siguiente secuencia polinucleotídica se caracterizó mediante criterios de longitud, Tf y secuencia nucleotídica y se descubrió que era específica para el rRNA de bacterias del género *Staphylococcus*: (Sau A 1276) CCGAACT GAGAACAACCTTTATGGGATTTGC (ID DE SEC NUM: 1). Esta secuencia es complementaria a un segmento único encontrado en el rRNA 16S de todos los organismos *Staphylococcus*. En la tabla 2 puede encontrarse una lista representativa de bacterias del género *Staphylococcus*. La sonda tiene 30 bases de longitud, tiene un factor de unión RXL entre los nucleótidos 19 y 20 del extremo 5' y tiene una Tf de 60,2°C, y rRNA hibridado de *Staphylococcus aureus* en una región correspondiente a las bases 1276-1305 del rRNA 16S de *E. coli*.

Esta sonda es una ilustración de un oligonucleótido que: (1) hibrida con el ácido nucleico diana e (2) incluye al menos 17 nucleótidos contiguos dentro de la región diana 1276-1344 o su complemento.

De forma similar, los oligonucleótidos con las secuencias de ID DE SEC NUM: 2 y 3 se describen aquí como ilustraciones de oligonucleótidos adyuvantes útiles. Como los oligonucleótidos adyuvantes empleados en los Ejemplos de trabajo aquí descritos, otros oligonucleótidos relacionados con la invención también tienen secuencias de hasta 100 nucleótidos de longitud y además tienen hasta 17 nucleótidos contiguos dentro de la región diana o su complemento.

Como se indica a continuación, la sonda SauA1276 hibridó con el rRNA de *Staphylococcus aureus* de una forma promovida por la utilización de oligonucleótidos adyuvantes. De acuerdo con el procedimiento utilizado para realizar esta determinación, se puso en contacto una sonda oligonucleotídica de cadena simple radiomarcada en el extremo 5' con el rRNA de *Staphylococcus aureus* en presencia o ausencia de oligonucleótidos adyuvantes. Las moléculas de sonda que hibridan el rRNA para formar híbridos de cadena doble se separaron de las moléculas de sonda de cadena simple mediante captura con hidroxipatito. Los híbridos de cadena doble se unieron al hidroxipatito y se detectaron y cuantificaron mediante conteo de centelleo. Después se calculó el grado de hibridación como porcentaje. Como se indica a continuación, la Tf del híbrido sonda:diana aumentó de forma ventajosa en presencia de uno o más oligonucleótidos adyuvantes.

El siguiente Ejemplo describe los métodos utilizados para demostrar que la sonda SauA1276 hibridó con rRNA de *Staphylococcus aureus* y que esta interacción se facilitó incluyendo oligonucleótidos adyuvantes en la mezcla de hibridación.

Ejemplo 1

Determinación de Tf para Híbridos Sonda:Diana

Los valores de Tf para los híbridos sonda:diana y adyuvante:diana se determinaron mediante una sonda marcada en un extremo con la secuencia de SauA1276 y oligonucleótidos adyuvantes marcados en un extremo seleccionados del grupo: (A) OMe SauA1259 y (B) SauA1306. La secuencia de SauA1276 es CCGAACTGAGAACAACCTTTATGG GATTTGC (ID DE SEC NUM: 1), la secuencia de OMe Sau A1259 es UUGACCUCGCGGUUUCG (ID DE SEC NUM: 2) y la secuencia de SauA1306 es GCGATTCCAGCTTCATGTAGTCGAGTTGCAGACTACAAT (ID DE SEC NUM: 3). Los adyuvantes A y B se seleccionaron para unirse al rRNA de organismos estafilocócicos en las regiones de la molécula inmediatamente adyacentes a la sonda, el adyuvante A se une aproximadamente en la región 1259-1275 del rRNA 16S, y el adyuvante B se une en la región 1306-1344 del rRNA 16S. La sonda y los oligonucleótidos adyuvantes se marcaron en el extremo 5' mediante [γ -32P]ATP como donante de fosfatos y polinucleótido cinasa T4 para catalizar la reacción de transferencia de fosfatos esencialmente como se describe en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook *et al.*, eds. Cold Spring Harbor Lab Publ. 10.59 (1989)). Los oligonucleótidos marcados en un extremo se combinaron por separado con rRNA purificado de *Staphylococcus aureus* para proporcionar las condiciones de exceso de diana. En los estudios que incluyeron tanto la sonda como los oligonucleótidos adyuvantes, solamente la sonda se marcó en un extremo y cada oligonucleótido estuvo presente en un exceso molar 10 veces superior a la diana. Todas las

mezclas se hibridaron hasta terminar en una solución que incluía tampón fosfato sódico 0,48 M, dodecil sulfato sódico al 0,1%, EDTA 1 mM y EGTA 1 mM. Como controles negativos, la sonda o los oligonucleótidos diana se hibridaron en ausencia de diana de ácido nucleico diana. Al finalizar el procedimiento de hibridación, las mezclas se diluyeron y se pasaron a una columna de hidroxipatito para separar los ácidos nucleicos monocatenarios de los híbridos de cadena doble. La cantidad de radioactividad en el flujo de la columna representó la sonda monocatenaria y se midió mediante
5 contaje de centelleo. La cantidad de radiactividad unida al hidroxipatito se midió de forma separada mediante conteo de centelleo. El grado de formación de híbrido, expresado como porcentaje, se calculó dividiendo la cantidad de sonda (medida en cpm) unido al hidroxipatito entre la cantidad total de sonda (en cpm) aplicada a la columna. Los resultados de estos procedimientos se representan en la Tabla 1.

TABLA 1

Hibridación de la Sonda SauA1276 con el rRNA Diana

	% Hibridación	Tf (°C)
SauA 1276 (Sonda)	75	60,2
Adyuvante A (OMe SauA1259)	94,2	76,8
Adyuvante B (SauA1306)	92,2	75,2
Sonda + adyuvante A	87,5	63
Sonda + adyuvante B	92,6	62,5
Sonda + adyuvante A + adyuvante B	91,9	65,2

Los resultados de este procedimiento confirmaron que la sonda marcada en el extremo hibrida con el rRNA de *Staphylococcus aureus* y que su incremento se facilita de forma ventajosa mediante oligonucleótidos adyuvantes. Se observó particularmente que la Tf del complejo sonda:diana podía incrementarse de 60,2 hasta 65,2°C cuando se incluían oligonucleótidos adyuvantes en la reacción de hibridación. Aunque la sonda puede utilizarse sola o en
35 combinación con uno o más oligonucleótidos adyuvantes para hibridar con el rRNA de *Staphylococcus*, los experimentos para determinar la sonda descritos a continuación se llevaron a cabo utilizando la sonda en combinación con oligonucleótidos adyuvantes con las secuencias de OMe SauA1259 y SauA1306. Las combinaciones de sonda y oligonucleótidos diana útiles en los procedimientos aquí descritos preferiblemente presentan valores de Tf sonda:diana en un rango de aproximadamente 62-66°C bajo las condiciones descritas anteriormente.

La especificidad de sonda se confirmó mediante demostración de hibridación positiva de rRNAs de un panel específico. El conjunto de organismos utilizados como fuentes de ácidos nucleicos diana en este procedimiento representó una amplia selección taxonómica de organismos y de un grupo más cercano. En el siguiente procedimiento, los resultados cuantitativos mediante la sonda de hibridación AE se compararon con la cantidad de rRNA bacteriano presente en cada muestra utilizando una sonda control positiva. Esta sonda control positiva, que hibridaba con el rRNA de todas
45 las especies de bacterias, fue particularmente útil para confirmar la presencia de rRNA bacteriano en las muestras que no hibridaron con la sonda SauA1276. En este tipo de caso, la sonda control positiva proporcionaba la presencia de rRNA hibridable y de esta forma validaba los resultados negativos. En el caso de dianas de rRNA de hongos, como control positivo se utilizó una sonda de hibridación ampliamente reactiva con rRNA de hongo.

El siguiente Ejemplo describe los métodos utilizados para demostrar que la sonda SauA1276 AE hibrida con los rRNA de un panel de organismos del género *Staphylococcus*.

Ejemplo 2

Verificación de la Especificidad de Sonda

Se utilizaron lisados bacterianos o RNA purificado como dianas de ácidos nucleicos para la hibridación de una sonda con la secuencia de SauA1276 AE 19.20 junto con oligonucleótidos adyuvantes con las secuencias SauA1259 y SauA1306. Los organismos empleados como fuentes de rRNA en este procedimiento fueron aislados clínicos típicos o se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC). Todas las muestras se identifican en la Tabla 2 mediante cifras log patrón de Gen-Probe Incorporated. Se hibridaron muestras paralelas de cada rRNA con una sonda control positiva marcada, con la secuencia CGACAAGGAAUUUCGC (OMe EcoB 1933 AE 12.13) (ID DE SEC NUM: 4) y oligonucleótidos adyuvantes sin marcar, con las secuencias UACCUUAGGACCGUUAU (OMe EcoB1916) (ID DE SEC NUM: 5) y CAGGUCGGAACUUACC (OMe EcoB1949a) (ID DE SEC NUM: 6). La solución de hibridación contenía LiCl 0,6 M, laurilsulfato de litio al 1%, succinato de litio 60 mM y EDTA y EGTA, cada uno 10 mM, pH 5,5. Tanto la sonda SauA1276 como la sonda control positiva se marcaron con éster de acridinio esencialmente de acuerdo con el método descrito en la Patente Estadounidense Núm. 5 185 439, titulada "Marcaje con
65 "

éster de acridinio y purificación de sondas nucleotídicas". A la conclusión de la reacción de hibridación, el éster de acridinio unido a la sonda sin hibridar se despojó de quimioluminiscencia bajo condiciones moderadamente alcalinas, mientras que el éster de acridinio unido a la sonda hibridada permaneció resistente a la inactivación. Se describen condiciones para la hidrólisis y delección de sonda hibridada marcada con éster de acridinio en Arnold *et al.*, Clin. Chem. 35:1588 (1989). Las magnitudes de hibridación de sonda en estos procedimientos se cuantificaron mediante luminometría utilizando procedimientos familiares para los expertos en la materia. Después, la magnitud de la señal de la sonda de *Staphylococcus* se dividió entre la magnitud de la señal del control bacteriano positivo para normalizar cuantitativamente los resultados del estudio. Las muestras con señales de sonda SauA1276 AE 19.20 que fueron superiores al 30% de la señal del control positivo indicaron hibridación específica con la sonda SauA1276 AE con los adyuvantes, mientras que los valores inferiores indicaron resultados negativos en este tipo de ensayo. Los resultados de este ensayo se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2

Hibridación de la Sonda SauA1276 y lisados que contienen rRNA de un conjunto de especies de *Staphylococcus*

GP#	Fuente de rRNA (Organismo)	Resultados de Hibridación		
		Sonda Pan- Bacteria- na (RLU)	Sonda <i>Staphylo-</i> <i>coccus</i> (RLU)	Hibri- dación Frac- cional (%)
49	<i>Staphylococcus aureus</i>	5286	23717	449
63	<i>Staphylococcus Conhii</i>	5544	14621	264
6	<i>Staphylococcus Delphi</i>	5917	23431	396
50	<i>Staphylococcus epider- midis</i>	7754	30347	391
62	<i>Staphylococcus haemo- lyticus</i>	4645	23331	502
61	<i>Staphylococcus hominis</i>	4884	23381	479
69	<i>Staphylococcus hycus</i>	5484	27551	502
60	<i>Staphylococcus inter- medius</i>	6823	24677	362
59	<i>Staphylococcus saprop- hyticus</i>	3484	10116	290
39	<i>Staphylococcus simu- lans</i>	5890	19007	323
67	<i>Staphylococcus warneri</i>	3565	14881	417

La columna "GP#" indica valores log patrón de Gen-Probe Incorporated.

Los resultados presentados en la Tabla 2 confirmaron que la sonda dirigida al rRNA de *Staphylococcus* hibridó de forma efectiva con las muestras de rRNA de diversas especies estafilocócicas.

La especificidad de la sonda frente al rRNA del género *Staphylococcus* se continuó investigando mediante la hibridación de sonda marcadora con rRNAs de un conjunto de especies representativas de un amplio espectro de organismos distintos filogenéticamente. En este procedimiento se mezcló sonda AE por separado con lisados de organismos con rRNA o con rRNA solamente relacionados de una forma filogenéticamente distante con el género *Staphylococcus*. Los resultados positivos de hibridación al utilizar la sonda control positiva y los resultados negativos al utilizar la sonda SauA1276 en el siguiente procedimiento indicaron, además, que la sonda SauA127 era altamente específica para el género *Staphylococcus*.

ES 2 269 139 T3

El siguiente Ejemplo describe métodos adicionales utilizados para demostrar la especificidad de la sonda. Más particularmente, los siguientes procedimientos mostraron que la sonda SauA1276 no hibridó de forma cruzada con los lisados de organismos relacionados de una forma filogenéticamente distante.

5 Ejemplo 3

Ausencia de Hibridación Cruzada con Organismos Filogenéticamente No Relacionados

Se llevaron a cabo ensayos de hibridación mediante la sonda marcada AE y oligonucleótidos adyuvantes de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo previo con la excepción de que los lisados que contenían rRNA aislado de diversas especies distintas sirvieron como ácidos nucleicos diana. Los resultados del procedimiento se presentan en la Tabla 3. Como controles positivos para detectar rRNAs fúngicos se utilizaron una sonda pan-fúngica con la secuencia GTCTGGACCTGGTGAGTTTCCC (ID DE SEC NUM: 7) y oligonucleótidos adyuvantes con las secuencias CGUGUUGAGUCAAUUAAGCCGC (ID DE SEC NUM: 8) y GCUCUCAAUCUGUCAAUCCUUAUUGU (ID DE SEC NUM: 9). En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos al utilizar un conjunto de organismos.

TABLA 3

20 *Hibridación de la sonda SauA1276 con rRNA de un conjunto de organismos no relacionados filogenéticamente*

GP#	Fuente de rRNA (Organismo)	Resultados de Hibridación		
		Sonda Pan-Bacteriana (RLU)	Sonda SauA1276 AE (RLU)	Hibridación Fraccional (%)
234	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	3784	0	0
233	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	3914	83	2
13	<i>Bacillus brevis</i>	8615	118	1
11	<i>Bacillus subtilis</i>	4506	155	3
212	<i>Bacteroides fragilis</i>	7165	541	8
226	<i>Bacteroides ovatus</i>	3676	254	7
225	<i>Bacteroides thetaiotami-</i>	32979	118	0

ES 2 269 139 T3

		Resultados de Hibridación		
GP#	Fuente de rRNA (Organismo)	Sonda Pan- Bacte- riana (RLU)	Sonda SauA127 6 AE (RLU)	Hibri- dación Frac- cional (%)
	<i>cron</i>			
152	<i>Citrobacter diversus</i>	6126	203	3
150	<i>Citrobacter freundii</i>	8479	326	4
192	<i>Clostridium perfringens</i>	7144	0	0
236	<i>Corynebacterium aquaticum</i>	19019	132	1
239	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	8827	180	2
237	<i>Corynebacterium xerosis</i>	8776	190	2
153	<i>Enterobacter aerogenes</i>	7597	478	6
154	<i>Enterobacter agglomerans</i>	8044	81	1
155	<i>Enterobacter cloacae</i>	7441	252	3
215	<i>Enterobacter fragilis</i>	6457	50	1
156	<i>Enterobacter gergoviae</i>	2729	405	15
46	<i>Enterococcus avium</i>	9135	33	0
27	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	9661	316	3
7	<i>Enterococcus cecorum</i>	5233	466	9
15	<i>Enterococcus dispar</i>	8492	233	3
85	<i>Enterococcus durans</i>	8130	221	3
82	<i>Enterococcus faecalis</i>	7201	797	11
79	<i>Enterococcus faecium</i>	6987	0	0
23	<i>Enterococcus faecium V1</i>	4929	0	0
17	<i>Enterococcus faecium V6</i>	5083	798	16
89	<i>Enterococcus gallinarum</i>	7973	277	3

ES 2 269 139 T3

		Resultados de Hibridación		
GP#	Fuente de rRNA (Organismo)	Sonda Pan- Bacte- riana (RLU)	Sonda SauA127 6 AE (RLU)	Hibri- dación Frac- cional (%)
81	<i>Enterococcus hirae</i>	5429	198	4
45	<i>Enterococcus malodoratus</i>	14729	52	0
25	<i>Enterococcus mundtii</i>	8804	575	7
26	<i>Enterococcus pseudoavium</i>	9364	254	3
33	<i>Enterococcus raffinosus</i>	5984	127	2
47	<i>Enterococcus sacchrolyti- cus</i>	8339	0	0
159	<i>Escherichia coli</i>	5141	306	6
161	<i>Escherichia fergusonii</i>	4152	602	14
162	<i>Escherichia hermanii</i>	2821	317	11
217	<i>Haemophilus influenzae</i>	3726	191	5
219	<i>Haemophilus influenzae A</i>	3751	248	7
220	<i>Haemophilus influenzae B</i>	3816	182	5
222	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	24669	233	1
188	<i>Hafnia alvei</i>	47098	358	1
163	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2642	289	11
164	<i>Klebsiella ozaenae</i>	4806	132	3
176	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4185	70	2
178	<i>Klebsiella rhinosclero</i>	3121	174	6
36	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	20052	636	3
56	<i>Lactobacillus jensenii</i>	5863	1451	25
9	<i>Lactococcus lactis</i>	36172	74	0

ES 2 269 139 T3

		Resultados de Hibridación		
GP#	Fuente de rRNA (Organismo)	Sonda Pan- Bacte- riana (RLU)	Sonda SauA127 6 AE (RLU)	Hibri- dación Frac- cional (%)
41	<i>Listeria grayi</i>	2278	139	6
72	<i>Listeria ivanovii</i>	5646	316	6
31	<i>Listeria monocytogenes 1/2b</i>	9424	24	0
28	<i>Listeria monocytogenes 4b</i>	7547	153	2
73	<i>Listeria seeligeri</i>	6292	97	2
40	<i>Listeria welshimeri</i>	4610	798	17
240	<i>Micrococcus luteus</i>	1712	56	3
184	<i>Morganella morganii</i>	3406	262	8
196	<i>Neisseria gonorrhoea</i>	6152	169	3
198	<i>Neisseria meningitidis</i>	19758	137	1
191	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	6313	485	8
190	<i>Propionibacterium acnes</i>	5008	556	11
179	<i>Proteus mirabilis</i>	4669	38	1
183	<i>Proteus penneri</i>	3607	170	5
181	<i>Proteus vulgaris</i>	5621	46	1
186	<i>Providencia alcalifaciens</i>	43548	449	1
187	<i>Providencia rettgeri</i>	30678	470	2
185	<i>Providencia stuartii</i>	13480	151	1
200	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5099	565	11
203	<i>Pseudomonas cepacia</i>	24918	353	1
205	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	8004	505	6

ES 2 269 139 T3

		Resultados de Hibridación		
GP#	Fuente de rRNA (Organismo)	Sonda Pan- Bacte- riana (RLU)	Sonda SauA127 6 AE (RLU)	Hibri- dación Frac- cional (%)
206	<i>Pseudomonas maltophilia</i>	7031	478	7
209	<i>Pseudomonas mendocina</i>	17308	151	1
208	<i>Pseudomonas pickettii</i>	7282	551	8
210	<i>Pseudomonas putida A</i>	7544	599	8
211	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	7100	420	6
189	<i>Salmonella enteritidis</i>	20228	2166	11
216	<i>Salmonella paratyphi</i>	3822	273	7
165	<i>Salmonella typhi</i>	7326	126	2
166	<i>Salmonella typhimurium</i>	5119	102	2
170	<i>Serratia liquefaciens</i>	5355	532	10
171	<i>Serratia marcescens</i>	4647	380	8
168	<i>Shigella dysenteriae</i>	4787	263	5
169	<i>Shigella sonnei</i>	4675	355	8
53	<i>Streptococcus agalactiae</i>	6617	949	14
32	<i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Ia</i>	9466	348	4
43	<i>Streptococcus anginosus</i>	8183	189	2
16	<i>Streptococcus avium</i>	5688	74	1
34	<i>Streptococcus bovis</i>	8620	41	0
51	<i>Streptococcus equi</i>	12255	651	5
80	<i>Streptococcus equinus</i>	4550	275	6
37	<i>Streptococcus equisimilis</i>	7445	517	7

ES 2 269 139 T3

		Resultados de Hibridación		
GP#	Fuente de rRNA (Organismo)	Sonda Pan- Bacte- riana (RLU)	Sonda SauA127 6 AE (RLU)	Hibri- dación Frac- cional (%)
97	<i>Streptococcus grp C</i>	8552	356	4
98	<i>Streptococcus grp G</i>	6769	182	3
44	<i>Streptococcus mutans</i>	6196	394	6
42	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	5475	142	3
91	<i>Streptococcus pyogenes</i>	5707	215	4
92	<i>Streptococcus pyogenes</i>	6082	61	1
38	<i>Streptococcus salivarius</i>	7366	622	8
35	<i>Streptococcus sanguis</i>	11240	293	3
66	<i>Streptococcus sp gp F2</i>	6212	363	6
3	<i>Streptococcus sp. Gp. B, II</i>	5476	329	6
5	<i>Streptococcus uberis</i>	5389	247	5
173	<i>Yersinia enterocolitica</i>	5719	371	6
175	<i>Yersinia intermedia</i>	4800	0	0
174	<i>Yersinia pseudotuberculo- sis</i>	5118	178	3

La columna "GP#" indica valores log patrón de Gen-Probe Incorporated.

ES 2 269 139 T3

TABLA 4

Hibridación de la sonda SauA1276 con rRNA de un conjunto de organismos no relacionados filogenéticamente

GP#	Fuente de rRNA (Organismo)	Sonda Pan- Bacte- riana (RLU)	Sonda del Gé- nero Staph (RLU)	Sonda Pan- Fúngica (RLU)	Hibri- dación (%)
F-932	<i>Arachnoitus flavoluteus</i>	481	684	232076	0,3
F-906	<i>Aspergillus flavus</i>	364	674	348387	0,2
F-899	<i>Aspergillus fumigatus</i>	382	676	419831	0,2
F-907	<i>Aspergillus niger</i>	194	572	650747	0,1
F-930	<i>Auxarthron thaxteri</i>	301	638	494055	0,1
F-1022	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	296	569	422465	0,1
715	<i>Candida albi- cans</i>	369	571	327951	0,2
1123	<i>Candida gla- brata</i>	1419	2219	45039	4,9
717	<i>Candida parap- sillosis</i>	352	1318	312482	0,4
1091	<i>Candida tropi- calis</i>	1566	2199	24023	9,2

ES 2 269 139 T3

GP#	Fuente de rRNA (Organismo)	Sonda Pan- Bacte- riana (RLU)	Sonda del Gé- nero Staph (RLU)	Sonda Pan- Fúngica (RLU)	Hibri- dación (%)
F-1399	<i>Coccidioides immitis</i>	303	958	141956	0,7
F-900	<i>Cryptococcus neoformans</i>	316	998	452943	0,2
F-965	<i>Gymmoascus dugwayensis</i>	317	700	506033	0,1
F-968	<i>Histoplasma capsulatum</i>	254	794	346283	0,2
F-933	<i>Myxotrichum deflexum</i>	267	648	366688	0,2
F-934	<i>Oidiodendron ecinulatum</i>	238	746	322685	0,2
716	<i>Candida krusei</i>	669	318	71371	0,4
1087	<i>Candida pseudotropicalis</i>	243	112	79868	0,1
384	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	116	233	75954	0,3
1080	<i>Candida guilliermondii</i>	320	607	65011	0,9

La columna "GP#" identifica organismos mediante valores log patrón de Gen-Probe Incorporated.

Los resultados presentados en la Tabla 3 confirmaron que la sonda no hibridaba de forma cruzada con el rRNA de varias especies de bacterias distintas filogenéticamente. Los resultados de la Tabla 4 muestran que la sonda no hibridó de forma cruzada con el rRNA de las especies fúngicas. Tomado esto en cuenta junto con los resultados positivos de hibridación presentados en la Tabla 2, es evidente que la sonda de hibridación fue altamente específica para el rRNA del género *Staphylococcus*.

ES 2 269 139 T3

Los resultados presentados anteriormente confirmaron que las sondas nuevas aquí descritas eran capaces de detectar organismos del género *Staphylococcus*. Además, las sondas fueron capaces de distinguir los *Staphylococcus* de organismos con una relación filogenética estrecha.

5 Esta invención se ha descrito en referencia a varios ejemplos específicos y realizaciones de los mismos. Evidentemente, los expertos en la materia deducirán varias realizaciones distintas de la presente invención al estudiar la descripción detallada que se proporciona. De esta forma, el alcance real de la presente invención se determina en referencia a las reivindicaciones anexas.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una composición de sonda para detectar ácidos nucleicos de bacterias miembros del género *Staphylococcus*, que contiene:

una sonda oligonucleotídica que hibrida con un región diana estafilocócica de rRNA o rDNA correspondiente a las posiciones nucleotídicas 1276-1305 de rRNA 16S de *E. coli* para formar un dúplex sonda:diana detectable, en la que dicha sonda oligonucleotídica tiene la longitud y secuencia ID DE SEC NUM: 1 o el complemento de la misma y opcionalmente una secuencia no complementaria que no hibrida con dicha región diana estafilocócica de rRNA o rDNA y en la que dicha sonda oligonucleotídica hibrida específicamente con ácidos nucleicos presentes en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus delphi*, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus warneri*.

2. La composición de sonda de la reivindicación 1, en la que la sonda oligonucleotídica contiene DNA.

3. La composición de sonda de la reivindicación 1, en la que dicha sonda oligonucleotídica tiene la longitud y secuencia de ID DE SEC NUM: 1.

4. La composición de sonda de la reivindicación 1, en la que dicha sonda oligonucleotídica además contiene un marcador detectable.

5. La composición de sonda de la reivindicación 4, en la que el marcador detectable es un marcador quimioluminiscente o un radiomarcador.

6. La composición de sonda de la reivindicación 5, en la que el marcador quimioluminiscente es un éster de acridinio.

7. La composición de sonda de la reivindicación 5, que además contiene al menos un oligonucleótido adyuvante que facilita la formación de un dúplex detectable sonda:diana.

8. La composición de sonda de la reivindicación 7, en la que al menos uno de dichos oligonucleótidos adyuvantes incluye al menos un análogo de nucleótido.

9. La composición de sonda de la reivindicación 8, en la que al menos uno de dichos análogos de nucleótido contiene un fragmento ribosa con un grupo metoxi dispuesto en la posición 2'.

10. La composición de sonda de la reivindicación 7, en la que al menos uno de dichos oligonucleótidos adyuvantes tiene una secuencia seleccionada a partir del grupo que consiste en ID DE SEC NUM: 2 e ID DE SEC NUM: 3.

11. Un método para detectar la presencia de bacterias *Staphylococcus* en una muestra de prueba, que implica los pasos de:

(a) proporcionar a dicha muestra de prueba una composición de sonda que incluye una sonda oligonucleotídica que hibrida con una región diana de rRNA o rDNA estafilocócica correspondiente a las posiciones nucleotídicas 1276-1305 del rRNA 16S de *E. coli* para formar un dúplex sonda:diana detectable, en la que dicha sonda oligonucleotídica tiene la longitud y secuencia ID DE SEC NUM: 1 o el complemento de la misma y opcionalmente una secuencia no complementaria que no hibrida con dicha región diana estafilocócica de rRNA o rDNA y en el que dicha sonda oligonucleotídica hibrida específicamente con ácidos nucleicos presentes en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus delphi*, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus warneri*;

(b) hibridar cualquier ácido nucleico de bacterias estafilocócicas presentes en la muestra de prueba con dicha composición de sonda para formar un dúplex sonda:diana; y

(c) detectar dicho dúplex sonda:diana como un indicador de la presencia de bacterias estafilocócicas en la muestra de prueba.

12. El método de la reivindicación 11, en el que dicha muestra de prueba puede contener bacterias y en el que antes del paso (a) se realiza un paso para liberar ácidos nucleicos de cualquier bacteria que pueda estar presente en dicha muestra de prueba.

13. El método de la reivindicación 11, en el que dicha muestra de prueba es un lisado.

14. El método de la reivindicación 11, en el que la sonda oligonucleotídica tiene la longitud y secuencia de ID DE SEC NUM: 1.

ES 2 269 139 T3

15. El método de la reivindicación 11, en el que dicha sonda oligonucleotídica contiene un marcador detectable.

16. El método de la reivindicación 15, en el que el marcador detectable es un éster de acridinio y en el que el paso de detección implica realizar una luminometría para detectar cualquiera de dichos dúplex sonda:diana.

17. El método de la reivindicación 15, en el que dicha composición de sonda además contiene al menos un oligonucleótido adyuvante que facilita la formación de dúplex sonda:diana.

18. El método de la reivindicación 17, en el que se selecciona al menos un oligonucleótido adyuvante a partir de grupo formado por ID DE SEC NUM: 2 e ID DE SEC NUM: 3.

19. Un equipo para detectar la presencia en una muestra de prueba de ácidos nucleicos de bacterias miembros del género *Staphylococcus*, que implica:

(a) una composición de sonda que incluye una sonda oligonucleotídica que hibrida con una región diana de rRNA o rDNA estafilocócico correspondiente a las posiciones nucleotídicas 1276-1305 del rRNA 16S de *E. coli* para formar un dúplex sonda:diana detectable, en la que dicha sonda oligonucleotídica tiene la longitud y secuencia ID DE SEC NUM: 1 o el complemento de la misma y opcionalmente una secuencia no complementaria que no hibrida con dicha región diana estafilocócica de rRNA o rDNA y en el que dicha sonda oligonucleotídica hibrida específicamente con ácidos nucleicos presentes en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus delphi*, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus simulans* y *Staphylococcus warneri*;

GENERO STAPH	
<i>S. epidermidis</i>	
ID DE SEC NUM 12	--AGCGAAACCGCGAGGUAAGC-----AAAUCCCAUAAAGUUGUUCUAGUUCGGAUUGUAGUCUGCAACUCGACUAUAUGAAGCUGGAAUUCGCUAGU
<i>Staph.aureus</i>	
ID DE SEC NUM 13	--AGCGAAACCGCGAGGUAAGC-----AAAUCCCAUAAAGUUGUUCUAGUUCGGAUUGUAGUCUGCAACUCGACUAUAUGAAGCUGGAAUUCGCUAGU
OmeSauA1259(-)	
ID DE SEC NUM 2	(3 ') GCUUUGGCGCUCCAGUU (5 ')
SauA1276(-)	
ID DE SEC NUM 1	(3 ') CG-----TTTAGGGTATTTCACAAAGAGTCAAGCC (5 ')
SauA1306(-)	
ID DE SEC NUM 3	(3 ') TAAACATCAGACGTTGAGCTGATGTACTTCGACCTTAGCG (5 ')
NO DIANA	
<i>E.coli</i>	
ID DE SEC NUM 14	--AGCGACCUCGCGAGAGCAAGC-----GGACCUCUAAAGUGCGUGUAGUCCGGAUUGGAGUCUGCAACUCGACUCCAUUGAAGUCGGAUUCGCUAGU
<i>S.bovis</i>	
ID DE SEC NUM 15	--CGCGAGUCGGUGACGGCAAGC-----AAAUUCUUAAGCCAAUCUCAGUUCGGAUUGUAGGCGUGCAACUCGCCUACAUGAAGUCGGAUUCGCUAGU
<i>S.pneumoniae</i>	
ID DE SEC NUM 16	--CGCAAGCGCGGUGACGGCAAGC-----UAAUCUCUUAAGCCAGUCUCAGUUCGGAUUGUAGGCGUGCAACUCGCCUACAUGAAGUCGGAUUCGCUAGU
<i>S.aqalactiae</i>	
ID DE SEC NUM 17	--CGCAAGCGCGGUGACGGCAAGC-----UAAUCUCUUAAGCCAAUCUCAGUUCGGAUUGUAGGCGUGCAACUCGCCUACAUGAAGUCGGAUUCGCUAGU
<i>S.sanguis</i>	
ID DE SEC NUM 18	--CGCAAGCGCGGUGACGGCAAGC-----UAAUCUCUGAAAGCCAGUCUCAGUUCGGAUUGUAGGCGUGCAACUCGCCUACAUGAAGUCGGAUUCGCUAGU
<i>S.cerevisiae</i>	
ID DE SEC NUM 19	GGCCGAGAGGUCUTUGUAAUCUTUGUGAAACUCCGUGGUGGGAUAGAGCAUUGUAAUUAUUGCUUUAACGAGGAAUUCUAGUAAGCGCAAGUCA
<i>Cand.albicans</i>	
ID DE SEC NUM 20	---AUAAGCCUUGGCCGAGAGGUCUGGGGAAAUUUTUGUGAAACUCCGUGGUGGGAUAGAGCAUUGUAAUUGUUCUCUUAACGAGGAAUUCUCCUAGU

FIG. 1

ES 2 269 139 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Gen-Probe Incorporated	
5	<120> Polynucleotide Probes for Detection and Quantitation of <i>Staphylococcus</i>	
	<130> GP111-PCT	
10	<150> 60/132,409	
	<151> 1999-05-03	
	<160> 20	
15	<170> FastSEQ for Windows Versión 3.0	
	<210> 1	
	<211>30	
20	<212> DNA	
	<213> <i>Staphylococcus genus</i>	
25	<400> 1	
	ccgaactgag aacaacttta tgggatttgc	30
	<210>2	
30	<211>17	
	<212> RNA	
	<213> <i>Staphylococcus genus</i>	
35	<400> 2	
	uugaccucgc gguuucg	17
40	<210> 3	
	<211> 39	
	<212> DNA	
45	<213> <i>Staphylococcus genus</i>	
	<400> 3	
50	gcgattccag cttcatgtag tcgagttgca gactacaat	39
	<210> 4	
	<211> 16	
55	<212> RNA	
	<213> Pan-bacterial	
	<400> 4	
60	cgacaaggaa uuucgc	16
	<210> 5	
65	<211> 17	
	<212> RNA	
	<213> Pan-bacterial	

ES 2 269 139 T3

	<400> 5		
	uaccuuagga ccguuau		17
5	<210>6		
	<211>16		
	<212> RNA		
10	<213> Pan-bacterial		
	<400> 6		
15	caggucggaa cuuacc		16
	<210> 7		
	<211> 22		
20	<212> DNA		
	<213> Pan-fungal		
	<400> 7		
25	gtctggacct ggtgagtttc cc		22
	<210> 8		
30	<211> 23		
	<212> RNA		
	<213> Pan-ungal		
35	<400> 8		
	cguguugagu caaaauaagc cgc		23
40	<210> 9		
	<211> 26		
	<212> RNA		
	<213> Pan-ungal		
45	<400> 9		
	gcucucaauc ugucaauccu uauugu		26
50	<210> 10		
	<211> 86		
	<212> DNA		
55	<213> <i>Staphylococcus</i> genus		
	<400> 10		
60	ggcattccag cttcatgtag tgcagttgca gactacaate cgaactgaga acaactttat	60	
	gggatttgct tgacctegcg gtttcg	86	
65	<210> 11		
	<211> 86		
	<212> RNA		

ES 2 269 139 T3

<213> *Staphylococcus* genus

<400> 11

5 cgaaaccgcg aggucaagca aaucccauaa agucguucuc agucggauu guagucugca 60
acucgacuaac augaagcugg aaucgc 86

<210> 12

<211> 92

<212> RNA

<213> *S. epidermidis*

15
<400> 12

20 agcgaaccg cgaggucaag caaaucccau aaaguuguuc ucaguucgga uuguagucug 60
caacucgacu auaugaagcu ggaauccgua gu 92

<210> 13

<211> 92

25 <212> RNA

<213> *S. aureus*

<400> 13

30

agcgaaaccg cgagggucaag caaaucccau aaaguuguuc ucaguucgga uuguagucug 60
caacucgcacu acaugaagcu ggaaucgcua gu 92

35 <210> 14

<211> 92

<212> RNA

<213> *E. coli*

40
 <400> 14

45 agcgaccucg cgagagcaag cggaccucau aaagugcguc guaguccgga uuggagucug 60
caacucgacu ccaugaaguc ggaaucgcuu gu 92

<210> 15

<211> 92

50 <212> RNA

<213> *S. bovis*

55 <400> 15

cgcgagucgg ugacggcaag caaaucucuu aaagccaauc ucaguucgga uuguaggcug 60
caacucgccu acaugaaguc ggaauccgua gu 92

60
 $\langle 210 \rangle$ 16

<211> 92

<212> RNA

65 <213> *S. pneumonia*

ES 2 269 139 T3

<400> 16				
5	cgcaagccgg ugacggcaag cuaaucucuu aaagccaguc ucaguucgga uuguaggcug	60		
	caacucgccu acaugaaguc ggaaucgcua gu	92		
<210> 17				
<211> 92				
10	<212> RNA			
<213> <i>S. agalactiae</i>				
<400> 17				
15	cgcaagccgg ugacggcaag cuaaucucuu aaagccaauc ucaguucgga uuguaggcug	60		
	caacucgccu acaugaaguc ggaaucgcua gu	92		
<210> 18				
<211> 92				
<212> RNA				
25	<213> <i>S. sanguis</i>			
<400> 18				
30	cgcaagccgg ugacggcaag cuaaucucug aaagccaguc ucaguucgga uuguaggcug	60		
	caacucgccu acaugaaguc ggaaucgcua gu	92		
<210> 19				
35	<211> 100			
<212> RNA				
<213> <i>S. cerevisiae</i>				
40	<400> 19			
45	ggccgagagg ucuugguaau cuugugaaac uccgucgugc ugagggauaga gcauuguaau	60		
	uauugcucuu caacgaggaa uuccuaguaa ggcgaaguca	100		
<210> 20				
<211> 97				
50	<212> RNA			
<213> <i>C. albicans</i>				
<400> 20				
55	auaagccuug gccgagaggu cugggaaauc uugugaaacu ccgucgugcu ggggauagag	60		
	cauuguaauu guugcucuu aacgaggaau uccuagu	97		
60				
65				