



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 152 933**

⑤① Int. Cl.<sup>7</sup>: C12Q 1/68  
C12N 1/11

⑫

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **92923440.9**  
⑧⑥ Fecha de presentación : **21.10.1992**  
⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0 610 396**  
⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **17.08.1994**

⑤④ Título: **Determinación de huellas relativas a cepas bacterianas utilizando amplificación de secuencias de ADN repetitivas.**

③⑩ Prioridad: **23.10.1991 US 781424**

④⑤ Fecha de la publicación de la mención BOPI:  
**16.02.2001**

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de patente:  
**16.02.2001**

⑦③ Titular/es:  
**BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE**  
**One Baylor Plaza**  
**Houston, TX 77030, US**

⑦② Inventor/es: **Lupski, James R.;**  
**Koeuth, Thearith y**  
**Versalovic, James**

⑦④ Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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 (artº 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCION

Determinación de huellas relativas a cepas bacterianas utilizando amplificación de secuencias de ADN repetitivas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere generalmente a la utilización de sondas oligonucleótidas dirigidas a elementos secuenciales repetitivos, entremezclados y no codificantes del ADN para identificar bacterias. Más particularmente, se refiere a la utilización de dichas sondas como iniciadores para la amplificación del ADN genómico bacteriano entre las secuencias repetitivas, y a la utilización de tales productos de amplificación para construir huellas de ADN únicas para el genoma sondeado. Se refiere asimismo a la exposición de iniciadores específicos que son útiles como sondas oligonucleótidas para poner en práctica la invención. En el contexto de la presente invención, las secuencias repetitivas del ADN significan secuencias entremezcladas, no codificantes repetitivas del ADN.

15 **Antecedentes de la invención**

Los elementos secuenciales repetitivos, entremezclados y no codificantes del ADN se han caracterizado extensamente en los eucariotas, aunque su función permanezca todavía ampliamente desconocida. La naturaleza conservada y la distribución entremezclada de dichas secuencias repetitivas se ha aprovechado para amplificar las secuencias únicas entre las secuencias repetitivas mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Además, los elementos repetitivos especie específicos del ADN se han utilizado para diferenciar entre especies murinas muy relacionadas.

Los genomas procarióticos son mucho más pequeños que los genomas de las especies de mamíferos (aproximadamente  $10^6$  respecto a  $10^9$  pares de bases del ADN, respectivamente). Debido a que estos genomas procarióticos más pequeños se conservan a través de las presiones selectivas para una replicación rápida del ADN y una reproducción celular, el ADN repetitivo no codificante debe conservarse mínimamente a menos que se mantenga mediante otras fuerzas selectivas. En su mayor parte, los procariontes poseen una alta densidad de secuencias transcritas. Sin embargo, en las bacterias se encuentran familias de cortas secuencias intergénicas repetidas.

La presencia de secuencias repetitivas se ha demostrado en muchas especies distintas de bacterias. Informes de nuevas secuencias repetidas en los géneros de eubacteriales *Escherichia*, *Salmonella*, *Deinococcus*, *Calothrix* y *Neisseria*, y los hongos *Candida albicans* y *Pneumocystis carinii*, ilustran la presencia de secuencias repetitivas dispersas extragénicas en muchos organismos. Una de tales familias de secuencias repetitivas de ADN en las eubacterias es la constituida por los elementos Repetitivos Extragénicos Palindrómicos (REP). La secuencia de consenso REP para esta familia incluye una secuencia de 38 unidades poliméricas que contiene seis posiciones totalmente degeneradas, que incluye un bucle variable de 5 pares de bases entre cada lado del eje conservado del palíndromo. Otra familia de elementos repetitivos la constituyen las secuencias del Consenso Intergénico Repetitivo Enterobacteriáceo (ERIC). ERIC es más grande (la secuencia consenso es de 126 polímeros) y contiene una repetición invertida central muy conservada. Las secuencias consenso ERIC y REP no parecen estar relacionadas.

Estudios anteriores han utilizado genes rARN repetidos como sondas en transferencias Southern para detectar polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) entre las cepas. Los genes tARN repetidos se han utilizado como sitios de unión consensuados de iniciadores para amplificar directamente fragmentos de ADN de distintos tamaños mediante amplificación PCR de diferentes cepas, tal como se describe en Nucl. Acids. Res., vol 19, p. 861-866 (1991). Las limitaciones de ambas técnicas incluyen la utilización de procedimientos radioisotópicos y tempointensivos, tales como la transferencia Southern y la electroforesis en gel de poliacrilamida para distinguir claramente diferencias sutiles en los tamaños de los fragmentos de ADN generados. La última técnica solamente podría distinguir organismos al nivel de especie y género. Las huellas tADN-PCR no varían generalmente entre cepas de una especie dada y entre especies relacionadas. Otros estudios anteriores incluyen la utilización de elementos repetitivos de ADN específicos de la especie como sitios de unión del iniciador para la identificación de la especie bacteriana basada en la PCR. Aunque tales procedimientos permiten la identificación de las especies mediante PCR con cantidades de ADN de picogramos, solamente se generan productos PCR individuales que impiden la generación de huellas genómicas específicas de las cepas.

Aunque estos estudios anteriores demostraron que los elementos repetitivos del ADN específicos de la especie podían utilizarse como sitios de unión de los iniciadores para la identificación de las especies bacterianas basada en la PCR, estos procedimientos solamente generaron productos PCR individuales en

una especie única. La presente invención proporciona un nuevo enfoque en la utilización de secuencias repetitivas extragénicas para obtener huellas directamente de los genomas bacterianos. El análisis de los productos de amplificación resultantes de amplificar secuencias únicas entre iniciadores para secuencias repetitivas entremezcladas y no codificantes de ADN bacteriano, revela distancias únicas entre las secuencias de repetición. Este patrón de distancias únicamente obtiene huellas de distintas especies y cepas bacterianas. Por tanto, este enfoque proporciona un procedimiento rápido y fiable para tipificar las bacterias mediante la obtención de huellas genómicas.

Entre la técnica anterior conocida, se encuentran:

*Ledbetter et al., Genomics 6:475-481 (1990)*

- enseña que un ADN humano puede aislarse a partir de híbridos celulares somáticos utilizando oligonucleótidos dirigidos a la porción específica humana de los elementos repetitivos entremezclados. La obtención de huellas que se describe en Ledbetter se refiere a la identificación de clones que contienen la porción cromosómica que se solapa, pero no la identificación de distintas cepas de bacterias.

*Stern et al., Cell 37:1015-1026 (1984)*

- enseña la existencia de secuencias palindrómicas extragénicas repetitivas (secuencias REP). También menciona las secuencias consensuadas REP, tales como en *E.coli* y *Styphimurium*. Stern et al. consideran el papel potencial de las REP en la expresión génica bacteriana.

*Hutton et al. Molecular Microbiology 5:825-834 (1991)*

- enseña la secuencia de consenso intergénica repetitiva conservada (ERIC) de las enterobacteriáceas en un puñado de cepas bacterianas. Hutton et al. hacen diversas comparaciones entre las secuencias ERIC y REP. Hutton et al. la secuencia y especulan respecto de la función genética de las secuencias.

*Correia et al., J. Bacteriology 167:1009-1015 (1986)*

- enseña genomas de cepas de *Neisseria* que contienen una secuencia nucleótida de 27 pares de bases que se repite en el genoma. Correia también enseña una secuencia conservada. Una vez más, esta referencia enseña que existe una secuencia repetitiva.

*Lennon et al., J. Bacteriology 173:3127-2140 (1991)*

- enseña que en SARK existe una secuencia repetida conservada.

Por tanto, según un aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para la identificación de una cepa bacteriana en una muestra, que comprende las etapas siguientes: amplificar el ADN entre las secuencias repetitivas entremezcladas no codificantes en la bacteria añadiendo a la muestra un par de iniciadores dirigidos hacia el exterior, los cuales son capaces de hibridizar las secuencias repetitivas del ADN en el ADN bacteriano, y extenderse externamente desde una secuencia repetitiva hibridizable a otra secuencia repetitiva hibridizable; separar por el tamaño los productos de extensión generados en la etapa de amplificación; y determinar la cepa específica bacteriana mediante medición del patrón de los productos de extensión clasificados por el tamaño.

En formas de realización específicas de la presente invención, los iniciadores contienen entre aproximadamente 10 y 29 unidades poliméricas y preferentemente entre 15 y 25 unidades poliméricas, aproximadamente.

Los iniciadores pueden ser específicos para cualquier secuencia repetitiva entremezclada no codificante, pero en las formas de realización específicas son específicos para ERIC, REP, Ngrep o Drrep.

En varios aspectos de la presente invención, el procedimiento puede utilizarse para: (1) diagnóstico de enfermedad bacteriana, en las plantas, animales y en el hombre; (2) supervisión del contenido bacteriano y/o contaminación en el entorno; (3) supervisión del alimento en cuanto a la contaminación bacteriana; (4) supervisión de los procedimientos de fabricación en cuanto a la contaminación bacteriana; (5) supervisión del seguro de calidad/control de calidad de los ensayos de laboratorio relacionados con los ensayos microbiológicos; (6) rastreo de la contaminación bacteriana y/o el comienzo de las infecciones bacterianas; (7) realización de los mapas genómicos; (8) supervisión de los sitios de biorreparación; y (9) supervisión

de los lugares agrícolas para ensayar las cosechas, bacterias y moléculas recombinantes.

El procedimiento es útil en cultivos aislados o puros así como en muestras reales del sitio de prueba. En una forma de realización preferida, pueden utilizarse iniciadores múltiples para ADN repetitivo distinto.  
5

A causa de la facilidad de la prueba, también puede automatizarse para el ensayo rápido de las muestras.

## 10 Descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama que muestra la unión de los iniciadores dirigidos hacia el exterior.

La Figura 2 muestra la alineación de varias secuencias de iniciadores oligonucleótidos REP respecto a una secuencia REP consensuada.  
15

La Figura 3 muestra la alineación de las secuencias de iniciadores oligonucleótidos ERIC respecto a la repetición invertida central de una secuencia de consenso ERIC.

La Figura 4 muestra la amplificación PCR del ADN genómico de la cepa W3110 de *E. coli* con distintos conjuntos de iniciadores oligonucleótidos REP y ERIC.  
20

La Figura 5 es un gel de agarosa al 1 % que demuestra la especificidad de las interacciones iniciador oligonucleótido ERIC/matriz.  
25

La Figura 6 muestra los resultados REP-PCR de las cepas correspondientes a las especies de enterobacterias Gram negativas.

La Figura 7 muestra los resultados ERIC-PCR de las cepas correspondientes a las especies de enterobacterias Gram negativas.  
30

La Figura 8 muestra una hibridación por “transferencia de microorganismos” de REP en una extensa variedad de bacterias.

La Figura 9 muestra la conservación evolutiva de las secuencias REP.  
35

La Figura 10 muestra una hibridación por “transferencia de microorganismos” de ERIC en una extensa variedad de bacterias.

La Figura 11 muestra la conservación evolutiva de las secuencias ERIC.  
40

La Figura 12 muestra la conservación evolutiva de Ngrep.

La Figura 13 muestra la obtención de la huella REP/ERIC de *B. subtilis*.

La Figura 14 es la REP-PCR de la biblioteca cosmiática genómica de la cepa W3110 de *E. coli*.  
45

La Figura 15 es la REP-PCR de la biblioteca cosmiática genómica de la cepa W3110 de *E. coli*.

Los dibujos no están necesariamente a escala. Algunas características de la invención pueden exagerarse a escala, o, en aras de la claridad y concisión, mostrarse en forma esquemática.  
50

## Descripción detallada de la invención

La amplificación del ADN tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier procedimiento que aumenta el número de copias de una secuencia específica de ADN. Se conocen diversos procedimientos. Uno de los más utilizados habitualmente es el procedimiento de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de Mullis, tal como se describe en las patentes U.S. n° 4.683.195 y n° 4.683.202, ambas concedidas el 28 de julio de 1987. En general, el procedimiento de amplificación PCR implica una reacción enzimática en cadena para preparar cantidades exponenciales de una secuencia específica de ácido nucleico. Requiere una pequeña cantidad de una secuencia para iniciar la reacción en cadena e iniciadores oligonucleótidos que hibridarán a la secuencia. En la PCR los iniciadores se hibridizan al ácido  
60

nucleico desnaturalizado, a lo cual sigue la extensión con un agente inducible (enzima) y nucleótidos. Esto da lugar a que se sinteticen nuevos productos de extensión. Debido a que estas nuevas secuencias sintetizadas se convierten en matrices para los iniciadores, ciclos repetidos de desnaturalización, hibridación de los iniciadores y extensión, dan lugar a la acumulación exponencial de la secuencia específica que se está amplificando. El producto de extensión de la reacción en cadena consistirá en un discreto ácido nucleico duplex con un extremo que corresponde a los extremos de los iniciadores específicos empleados. En este procedimiento, el producto de extensión cruza desde una secuencia repetitiva a otra secuencia repetitiva. Debido a que las secuencias repetitivas están entremezcladas por todo el genoma a diferentes distancias unas de otras, existirá un crecimiento exponencial de todos los tamaños distintos. El patrón de los productos de extensión de los distintos tamaños proporciona una huella específica para cada bacteria.

El término “iniciador oligonucleótido” tal como se utiliza en la presente memoria, define una molécula que comprende más de tres desoxiribonucleótidos u oligonucleótidos. Su longitud exacta dependerá de muchos factores que se relacionan con la función fundamental y la utilización del iniciador oligonucleótido, incluyendo la temperatura, el origen del oligonucleótido y la utilización del procedimiento. El iniciador oligonucleótido puede producirse de modo natural (como un fragmento purificado o un producto digestivo de restricción) o sintéticamente. El iniciador oligonucleótido es capaz de actuar como un punto de iniciación para la síntesis, cuando se sitúa bajo condiciones que inducen la síntesis de un producto de extensión del iniciador que es complementario a una cadena de ácido nucleico. Las condiciones pueden incluir la presencia de nucleótidos y un agente inductor tal como una ADN polimerasa a una temperatura y pH apropiados. En la forma de realización preferida, el iniciador es un oligodesoxiribonucleótido monocatenario de longitud suficiente para iniciar la síntesis de un producto de extensión a partir de una secuencia específica en presencia de un agente inductor. En esta solicitud, en la forma de realización preferida, los oligonucleótidos contienen habitualmente entre aproximadamente 10 y 29 unidades poliméricas. En la forma de realización preferida contienen entre 15 y 25 unidades poliméricas. La sensibilidad y la especificidad de los iniciadores oligonucleótidos están determinadas por la longitud del iniciador y la singularidad de la secuencia en el interior de una muestra dada de un ADN matriz. Los iniciadores que son demasiado cortos, por ejemplo, menores de 10 unidades poliméricas, pueden mostrar una unión no específica con una amplia variedad de secuencias en el ADN genómico y, por tanto, no resultan de gran ayuda.

En el presente caso, cada par de iniciadores se selecciona para ser sustancialmente complementario de las distintas cadenas de cada secuencia repetitiva específica a las cuales se unen los pares de iniciadores. Así, un iniciador de cada par es lo suficientemente complementario para hibridarse con una parte de la secuencia en la cadena con sentido y el otro iniciador de cada par es suficientemente complementario para hibridarse con una parte distinta de la misma secuencia repetitiva, en la cadena antisentido.

Debe también apreciarse que en la presente invención un iniciador único puede funcionar como un par de iniciadores. A causa de que el iniciador se une a secuencias repetitivas, y debido a que éstas pueden orientarse en ambas direcciones, un iniciador único puede unirse a ambas cadenas de una secuencia repetitiva y amplificar la secuencia entre dos secuencias repetitivas separadas.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término par de iniciadores “dirigido hacia el exterior” se refiere a los iniciadores oligonucleótidos y su unión, tal como se aprecia en la Figura 1. En la presente solicitud, un iniciador es absolutamente complementario de la cadena con sentido. Este iniciador se une a la cadena con sentido con una orientación tal que el producto de extensión que se genera a partir del extremo 3' del iniciador se extiende más allá de la secuencia repetitiva de ADN a la que el iniciador oligonucleótido está unido, y a través del ADN no repetitivo, a una segunda secuencia de ADN repetitivo. El otro miembro del par de iniciadores se une a la cadena antisentido. Este iniciador se une con una orientación tal que los productos de extensión generados en el extremo 3' se extienden más allá de la secuencia repetitiva de ADN a la que el iniciador está unido y a través del ADN no repetitivo, a la siguiente secuencia repetitiva de ADN. De este modo, en el interior de una secuencia repetitiva específica de ADN, el par de iniciadores se une a las cadenas complementarias de ADN 5' a 5' (véase Figura 1) y, de este modo, los productos de extensión crecen lejos uno de otro a través del ADN no repetitivo. Los productos de extensión a partir del par de iniciadores son complementarios entre sí y pueden servir como matrices para una síntesis ulterior mediante unión al otro miembro del par de iniciadores.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “producto de extensión” se refiere a la secuencia nucleótida que se sintetiza en presencia de nucleótidos y un agente inductor tal como una polimerasa a partir del extremo 3' del iniciador oligonucleótido y que es complementario a la cadena a la cual está unido el iniciador oligonucleótido.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “marcado de modo diferencial” indicará que el producto de extensión puede distinguirse de todos los demás debido a que posee un marcador distinto unido, o bien presenta un tamaño diferente, o bien se une a un oligonucleótido específico, o a una combinación de estos factores. Un experto en la materia apreciará que están disponibles varios marcadores. Por ejemplo, estos pueden incluir radioisótopos, fluorescentes, quimioluminiscentes, enzimas y anticuerpos. Varios factores afectan a la selección del marcador. Estos incluyen el efecto del marcador sobre el grado de hibridación y de unión del iniciador al ADN, la sensibilidad del marcador, la facilidad en obtener el iniciador, sonda o productos de extensión marcados, la capacidad para automatizar, los instrumentos disponibles, conveniencias y análogos. Por ejemplo, en una forma de realización de la presente invención, hasta el tamaño para distinguir los patrones y por tanto no es necesario otro marcador. Las diferencias en el tamaño pueden determinarse después de tinción del ADN, por ejemplo con bromuro de etidio. Sin embargo, cuando se detectan especies múltiples en una muestra o para múltiples secuencias repetitivas, puede resultar ventajoso añadir un marcador radioactivo tal como  $^{32}\text{P}$ ,  $^3\text{H}$  o  $^{14}\text{C}$ ; un fluorescente distinto tal como fluoresceína, tetrametilrodamina, Rojo de Texas o 4-cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1-diazol (NBD); o una mezcla de distintos marcadores tales como radioisótopos, fluorescentes y quimioluminiscentes.

El término “ADN repetitivo” tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a secuencias no codificantes del ADN que contienen secuencias repetidas cortas y dispersas por todo del genoma bacteriano.

Tal como se utiliza en la presente memoria (1) “REP” se refiere a elementos palindrómicos extragénicos repetitivos. La secuencia de consenso REP se muestra en SEC. ID. NO. 1. (2) “ERIC” se refiere a la secuencia de consenso intergénica repetitiva de enterobacteriáceas. La secuencia de consenso ERIC se muestra en SEC. ID. NO. 36. (3) “Ngrep” se refiere a los elementos repetitivos de *Neisseria*. La secuencia de consenso Ngrep se muestra en SEC. ID. NO. 46. (4) “Drrep” se refiere a los elementos repetitivos de *Deinococcus*. La secuencia de consenso Drrep se muestra en SEC. ID. NO. 60. Estos elementos repetitivos se encuentran entremezclados por todo el genoma bacteriano. Estas cuatro secuencias, o cualquier combinación de las mismas, puede utilizarse en la presente invención. Además, el experto en la materia comprenderá que, dado que se conocerán nuevas secuencias repetitivas entremezcladas y no codificantes en las bacterias, pueden también utilizarse en el procedimiento de la presente invención. Uniendo iniciadores dirigidos exteriormente a dichas secuencias repetitivas y llevando a cabo la amplificación, se pueden generar huellas únicas e identificar cepas individuales de bacterias.

Los iniciadores oligonucleótidos pueden prepararse utilizando cualquier procedimiento apropiado que se conozca en la técnica. Por ejemplo, los procedimientos fosfodiéster y fosfotriéster, o sus formas de realización automatizadas. También es posible utilizar un iniciador que se haya aislado de fuentes biológicas tal como con un digesto endonucleásico de restricción.

La secuencia repetitiva a la que se unen los iniciadores, puede seleccionarse a partir de cualquiera de las regiones repetitivas que se encuentran en las bacterias. Las secuencias repetitivas se pueden identificar mediante varios procedimientos. Se puede realizar manualmente comparando las secuencias de las secuencias publicadas de los ácidos nucleicos para genomas bacterianos. Un procedimiento más conveniente, sin embargo, consiste en utilizar un programa informático para comparar las secuencias. De esta forma, se puede generar una secuencia consenso de ADN para utilizarla en los procedimientos de la presente invención.

Como material de partida, puede utilizarse cualquier fuente de ácido nucleico bacteriano en forma purificada o no, teniendo en cuenta que contiene o se sospecha que contiene un genoma bacteriano de interés. Así, los ácidos nucleicos bacterianos pueden obtenerse a partir de cualquier fuente que pueda estar contaminada por bacterias. Cuando se busca una infección bacteriana o distinguir bacterias de individuos animales o humanos, la muestra que va a ensayarse puede ser seleccionada o extraída a partir de cualquier muestra del organismo tal como sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, tejidos, escobillón vaginal, heces, líquido amniótico o lavado bucal.

En otras aplicaciones, la muestra puede tener diversos orígenes, por ejemplo: (1) en horticultura y en ensayos agrícolas, la muestra puede ser una planta, fertilizante, suelo, líquido u otro producto agrícola u hortícola; (2) en el ensayo de alimentos, la muestra puede consistir en alimentos frescos o en procesados (por ejemplo, fórmulas para niños, pescado, productos recién preparados y alimentos empaquetados); (3) en los ensayos medioambientales, la muestra puede ser líquida, del suelo, tratamiento de aguas residuales, fango y cualquier otra muestra en el entorno que se considere o se sospeche que está contaminada por bacterias.

## ES 2 152 933 T3

Cuando la muestra es una mezcla de material, por ejemplo, sangre, suelo y fango, puede tratarse en el interior de un reactivo apropiado que sea efectivo para abrir las células y exponer o separar las cadenas de los ácidos nucleicos. Aunque no es necesario, esta lisis y la etapa de desnaturalización del ácido nucleico, permitirá que la amplificación tenga lugar más fácilmente. Además, si se desea, las bacterias pueden cultivarse antes de análisis y obtener de este modo una muestra pura. Sin embargo, esto no es necesario.

El agente inductor para la polimerización puede ser cualquier compuesto o sistema que funcione para llevar a cabo la síntesis de los productos de extensión del iniciador. Entre los ejemplos de enzimas inductores que se han utilizado con esta finalidad, se incluyen la ADN polimerasa I de *E.coli*, el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E.coli*, la T4 ADN polimerasa, la *Taq* ADN polimerasa, la Vent ADN polimerasa y otras ADN polimerasa disponibles.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "huella" se refiere al hecho de que cada cepa bacteriana posee su patrón de tamaño característico de los productos de extensión que pueden utilizarse para identificarla. Este patrón único es cada huella genómica de la cepa.

Una forma de realización de la presente invención incluye un procedimiento para identificar una cepa bacteriana en una muestra, que comprende las etapas siguientes: amplificación del ADN añadiendo a la muestra un par de iniciadores dirigidos al exterior, en el que los iniciadores son capaces de hibridizarse a secuencias entremezcladas no codificantes repetitivas en el ADN bacteriano y prolongarse hacia el exterior desde una secuencia repetitiva hibridizable a otra secuencia repetitiva hibridizable; separación de los productos de extensión generados en la etapa de amplificación mediante el tamaño; y determinación de la cepa bacteriana específica midiendo el patrón de los productos de extensión clasificados por tamaño.

Debe apreciarse que la etapa de separación de esta forma de realización puede llevarse a cabo mediante cualesquiera técnicas y procedimientos que separen los productos de extensión por el tamaño. Los ejemplos incluyen sin limitarse a ellos, a la electroforesis en gel, electroforesis capilar, cromatografía, electroforesis de impulsos de campo en gel y espectrometría de masas. Así, un experto en la materia reconocerá que la separación de los productos de extensión puede realizarse mediante diversos procedimientos. La selección del procedimiento dependerá de diversos factores, tales como el equipo disponible de laboratorio, la cantidad de productos de extensión presentes, el marcado si es que existe, el colorante, la preferencia de la parte que lleve a cabo el ensayo, la conveniencia y análogos.

La electroforesis capilar permite la separación rápida de fragmentos de ADN a través de geles diminutos de poliacrilamida en capilares delgados. La principal ventaja es que pueden aplicarse voltajes mucho más altos y se potencia la resolución. El procedimiento puede automatizarse. Una vez los tubos se cargan, la electroforesis y la adquisición de datos pueden automatizarse mediante la conexión directa al ordenador. Un ejemplo incluye el modelo 270A-HT del High Throughput Capillary Electrophoresis System (Applied Biosystems). En lugar de bandas sobre un gel, los fragmentos de ADN se representan mediante picos como función del tiempo, que indican la presencia de distintas moléculas de diferentes tamaños. Otra ventaja es que no sólo pueden obtenerse rápidamente los patrones de picos generados por la PCR con una resolución mayor de los fragmentos con tamaños diferentes, sino que la intensidad de las distintas bandas puede cuantificarse con exactitud; permitiendo incluso una mayor resolución.

Los procedimientos no electroforéticos, principalmente la cromatografía, pueden utilizarse para separar fragmentos de ADN generados mediante PCR en cuanto a su tamaño. Los procedimientos de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) pueden utilizarse para separar fragmentos del ADN mediante la utilización de columnas de exclusión del tamaño (Sistema de Gradiente Serie 800 HRLC-BioRad). Los fragmentos de ADN están representados mediante picos como función del tiempo y los datos se digitalizan y se envían directamente a un ordenador. Sin embargo, generalmente se prefieren los procedimientos electroforéticos a causa de su mayor fiabilidad y resolución.

Un experto en la materia reconocerá que la medición del patrón de los productos de extensión clasificados por tamaño para determinar la cepa específica de las bacterias presentes, también puede realizarse mediante diversos medios, visualización directa o mediante automatización utilizando un lector de código de barras, un lector de laser, un digitalizador, un fotómetro, un lector de fluorescencia o planimetría computerizada. La selección del procedimiento de medición depende en parte de la etapa de separación y del instrumental disponible.

Pueden utilizarse diversos iniciadores para detectar secuencias repetitivas en las bacterias. Los iniciadores dependen de qué secuencia repetitiva se está detectando y qué bacterias se detectan. El experto en la materia puede fácilmente determinar la secuencia repetitiva y los iniciadores que va a utilizar, de-

pendiendo de las bacterias que van a examinarse. En la forma de realización de la presente invención, los pares iniciadores se han seleccionado a partir de las secuencias en los grupos formados por SEC. ID. NOS 4 a 35, 38 a 45 y 48 a 57. En la forma de realización preferida, cuando REP se utiliza para el sitio de hibridación del iniciador, un miembro del par de iniciadores se selecciona a partir del grupo formado por SEC. ID. NOS. 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 y 34 y el otro miembro del par se selecciona a partir del grupo formado por SEC. ID. NO. 7, 8, 9, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 y 35. En la forma de realización más preferida, se utilizan la SEC.ID.NO 4 y la SEC. ID. NO. 7.

Cuando la secuencia repetitiva es ERIC, un miembro del par de iniciadores se selecciona a partir de este grupo formado por SEC. ID. NO. 38, 39, 40 y 41 y el otro miembro del par se selecciona a partir de SEC. ID. NOS. 42, 43, 44 y 45, y en la forma de realización más preferida se utilizan SEC. ID. NO. 38 y SEC. ID. NO. 42.

Cuando la secuencia repetitiva es Ngrep, un miembro del par de iniciadores se selecciona a partir del grupo formado por SEC. ID. NOS 48, 49, 50 y 51 y el otro miembro del par se selecciona a partir del grupo formado por SEC. ID. NOS. 52, 53, 54 y 55. En la forma de realización preferida se utilizan SEC. ID. NO. 48 y SEC. ID. NO. 52.

Cuando la secuencia repetitiva es Drrep, sólo se utiliza un único iniciador. El iniciador es SEC. ID. NOS. 56 ó 57. Este es un ejemplo en el que un único iniciador actúa como un par. La utilización de ambos iniciadores no llevará a un único patrón de huellas.

El experto en la materia reconocerá fácilmente que cuantas más secuencias repetitivas se determinen, más fácilmente podrá seleccionarse el par de iniciadores que da lugar al mejor patrón de huellas. Por ejemplo, se sintetiza un iniciador para la nueva secuencia, y se evalúa el presente procedimiento. Después de examinar el patrón resultante de cada par de iniciadores, puede identificarse el par de iniciadores que mejor distingue las cepas específicas del ensayo.

Además del procedimiento descrito anteriormente, pueden añadirse al procedimiento una pluralidad de pares de iniciadores. Cada par de iniciadores se unirá a una secuencia repetitiva diferente. Por ejemplo, pueden añadirse cualquier combinación de dos o más de cada uno de los pares de iniciadores de REP, ERIC, Ngrep y Drrep. Además, el ensayo multiiniciador puede potenciarse marcando diferencialmente los pares de iniciadores. Así, después de la amplificación, no sólo puede examinarse el patrón clasificado (por tamaños), sino que puede examinarse el patrón de tamaño para cada marcador. Por ejemplo, pueden utilizarse iniciadores oligonucleótidos REP y ERIC. Cada uno se marca con un marcador fluorescente diferente. El patrón resultante de marcado diferencial puede determinarse mediante escaneo fluorescente. Este procedimiento puede proporcionar patrones de huellas más refinados.

Después de electroforesis en geles de poliacrilamida, los geles se escanean mediante un detector de fluorescencia basado en el láser y los resultados se digitalizan directamente mediante un ordenador conectado al detector. Posteriormente, la utilización de un Genescanner (Applied Biosystems), permite que se automatice el procedimiento en su totalidad.

El experto en la materia apreciará claramente que este procedimiento posee muchas ventajas. Puede ser modificado fácilmente para identificación automatizada de cepas bacterianas. En una forma de realización, la amplificación se realiza en un instrumento de auto-PCR, eliminándose los productos de extensión y separándose en un gel de calibración o mediante cromatografía. El patrón de calibración se determina mediante un lector automático y cada patrón puede reconocerse mediante medios computerizados. El ordenador guardará huellas de bacterias conocidas para compararlas con los resultados del ensayo. En el procedimiento automatizado, lectores de código de barras, lectores de laser, digitalizadores, fotómetros, lectores fluorescentes y planimetría computacional, pueden utilizarse para ayudar a automatizar el sistema.

En otra forma de realización de la presente invención, se proporciona un equipo para determinar la identidad de las cepas bacterianas. Dicho equipo comprende un contenedor que posee un par de iniciadores PCR dirigidos hacia el exterior a una secuencia repetitiva en las bacterias. Este equipo puede disponer de cualquiera de los iniciadores PCR seleccionados de entre el grupo formado por SEC. ID. NO 4 a 35, 38 a 45 y 48 a 57, o sus combinaciones. Un experto en la materia apreciará fácilmente que el número y tipo de iniciadores que se encuentran en el equipo dependerán de la utilización de éste, así como de las secuencias que tienen que detectarse.

Se conocen en el mercado diversos medios de amplificación PCR automatizados. Por ejemplo, puede

utilizarse un ciclador térmico. Existen diversos brazos de dispositivos robóticos y otras pipetas automáticas y máquinas de muestreo que pueden utilizarse para eliminar los productos de extensión a partir de la reacción PCR en los tiempos apropiados y transfiriendo la muestra a cromatografía, electroforesis capilar o en gel, espectrometría de masas u otros procedimientos o técnicas utilizados para separar las muestras. En la forma de realización preferida, el medio de separación es regulado por ordenador. Después de la separación, el medio de lectura se utiliza para medir el patrón. Los medios de lectura dependerán del tipo de separación que se utilice. Por ejemplo, pueden utilizarse un lector densitométrico de longitud de onda o un lector de fluorescencia, dependiendo del marcador que va a detectarse. Un detector radioisotópico puede utilizarse para los iniciadores marcados radioisotópicamente. En la espectrometría de masas, los iones se detectan en el espectrómetro. Un gel puede teñirse y leerse con un densitómetro. El ordenador regula el procedimiento de amplificación PCR automatizado, el muestreo y la eliminación del PCR, la separación automática y la lectura de las muestras y puede utilizarse para interpretar los resultados y producir los datos.

Los métodos, instrumentos y procedimientos descritos en la presente memoria pueden utilizarse con diversas finalidades. A causa de la sensibilidad y especificidad del ensayo, los expertos en la materia reconocerán fácilmente usos para esta metodología. Lo que sigue no constituye una lista exhaustiva de usos, sino únicamente un muestreo de áreas específicas en las que existe una necesidad habitual de un ensayo rápido y fiable.

La metodología de la presente invención puede utilizarse para diagnosticar enfermedades bacterianas si éstas se presentan en plantas, animales o en el hombre. No sólo puede diagnosticarse la enfermedad, sino que puede identificarse la cepa específica que está implicada.

El entorno puede supervisarse en cuanto a la contaminación bacteriana. El procedimiento actúa sobre diversas muestras que incluyen líquidos, barro, tratamiento de las aguas residuales, muestras vegetales y el suelo. De esta forma, en cualquier sitio en el que se haya producido contaminación ambiental que requiera supervisión, el ensayo será operativo.

Este procedimiento resultará muy útil en el área de supervisión de la contaminación alimentaria. Distintos productores de alimentos ensayan habitualmente sus productos en cuanto a la contaminación bacteriana. Este procedimiento ayudará a facilitar este ensayo. Por ejemplo, las fórmulas infantiles, pescados, productos recién preparados y alimentos procesados pueden todos ensayarse fácilmente mediante este procedimiento. Este procedimiento también puede ser útil para detectar el origen del envenenamiento alimentario.

Otra importante utilización de este método es en la supervisión de las poblaciones bacterianas en un sitio de biorreparación. Esta habitualmente utiliza poblaciones bacterianas específicas para destruir la contaminación. Las bacterias pueden ser la población natural que se desarrolla en el lugar o bacterias añadidas al lugar para potenciar la desintegración. Las bacterias utilizadas en los procedimientos de potenciación habitualmente proceden de cultivos y/o barro. En cualquiera de estos casos, es importante supervisar la población de bacterias en el estado de biorreparación para tener la seguridad de que la cepa (o cepas) apropiada(s) está(n) presente(s) y se está(n) desarrollando. Este procedimiento permite la identificación rápida de las bacterias en la población, de forma que puede supervisarse fácilmente. El ensayo actúa sobre muestras de suelo, líquidos, barro u otros materiales que deben añadirse al sitio de biorreparación.

En las áreas de horticultura y agricultura se encuentran diversas utilidades de este método. Se pueden supervisar inoculaciones bacterianas de plantas o enfermedades bacterianas de éstas. Puede también utilizarse para supervisar la distribución de bacterias recombinantes añadidas al entorno. Las muestras pueden provenir del suelo al que se han añadido las bacterias, o de los fertilizadores con el fin de asegurarse de que éstos poseen las bacterias apropiadas. Puede utilizarse para supervisar el control de las plagas en las que las bacterias se añaden con objeto de eliminarlas, tales como las de insectos. Este procedimiento permite la supervisión rápida y precisa de la aplicación del insecticida bacteriano y la actividad de éste. Así, en cualquier procedimiento de horticultura o agricultura que requiera la adición de bacterias, éstas pueden supervisarse mediante aquél.

Otra aplicación de este método es en el procedimiento de fabricación. Diversos procedimientos de fabricación, por ejemplo de medicamentos, síntesis auxiliada por microorganismos, fabricación de alimentos, procedimientos de fabricación química y de fermentación, dependen todos de la presencia o ausencia de las bacterias. En cualquier caso, puede utilizarse el método de la presente invención. Puede supervisarse la contaminación bacteriana o ensayar que la pureza de las cepas se conserve.

Este método también puede utilizarse para ensayar los alimentos almacenados en cuanto a la contaminación bacteriana. Esto sería importante en los bancos de sangre, en los que las bacterias tales como *Yersinia enterocolitica* pueden provocar infecciones graves y la muerte si se encuentran en la sangre que se ha utilizado en las transfusiones.

5

El procedimiento también puede utilizarse en cuanto al seguro de calidad y en el control de ésta, al supervisar la contaminación bacteriana en los ensayos de laboratorio. Por ejemplo, el ensayo de inhibición bacteriana de Guthrie utiliza una cepa específica de bacterias para medir la fenilalanina en el rastreo de los recién nacidos. Si esta cepa cambia, puede afectar a los resultados del ensayo y por tanto afectar a la precisión del programa de rastreo de los recién nacidos. Este método de la presente invención puede utilizarse para supervisar la pureza de la cepa. Cualquier otro ensayo de laboratorio que utilice o dependa de las bacterias en el ensayo puede supervisar. El laboratorio o el entorno del ensayo también puede supervisarse en cuanto a la contaminación bacteriana mediante el muestreo del laboratorio y el ensayo de cepas específicas de bacterias.

15

Este procedimiento será también útil en los hospitales para detectar el origen y distribución de las infecciones bacterianas. Puede mostrar si la infección del paciente está provocada o no por una cepa específica del hospital. El tipo de tratamiento y de agente antibacteriano específico puede depender del origen y la naturaleza de las bacterias.

20

Los ejemplos siguientes se ofrecen a título de ejemplo y, de ninguna manera, pretenden limitar el alcance de la invención.

#### Ejemplo 1

25

##### *Aislamiento y cuantificación del ADN genómico*

###### *1. ADN genómico de bacterias Gram negativas y espiroquetas*

30

Se sedimentaron las células y se lavaron dos veces en 1 ml de 1M NaCl mediante centrifugación en una microcentrífuga de ángulo fijo a 15000 rpm durante 5 minutos. Las células se lavaron dos veces y se volvieron a suspender en TE (10 mM Tris, 25mM EDTA, pH 8,0) y se incubaron en 0,2 mg/ml de lisozima y 0,3 mg/ml de RNasa A durante 20 minutos a 37°C. Si no era visible la lisis mediante la lisozima con cepas patogénicas refractarias, se añadió SDS al 0,6%. A estas suspensiones se añadieron Sarkosyl al 1% y 0,6 mg/ml de proteinasa K, incubándose las células durante 1 hora a 37°C. Se extrajeron los lisados celulares dos veces con fenol y tres veces con cloroformo. La fase acuosa se precipitó con 0,33M de acetato de NH<sub>4</sub> y 2,5 volúmenes de etanol. Las hebras precipitadas del ADN se eliminaron con la punta de una pipeta de Pasteur estéril y se disolvieron en TE (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8,0).

35

40

###### *2. ADN genómico de las bacterias Gram positivas*

Sedimentos celulares concentrados se lavaron dos veces en 1 M de NaCl y dos veces en TE (50 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 7,8) y se hicieron rotar en una centrifuga de ángulo fijo durante 5 minutos. Se volvieron a suspender los sedimentos celulares en TE y se incubaron con 250 U/ml de mutanolisina y 0,3 mg/ml de RNasa A durante 30 minutos a 37°C. A esta reacción, se añadieron SDS al 0,6% y 0,6 mg/ml de proteinasa K, incubándose la mezcla durante 1 hora a 37°C, seguido por 65°C durante 45 minutos. Se extrajeron los lisados dos veces con fenol y dos veces con cloroformo. El ADN cromosómico se precipitó y disolvió tal como se describe para las bacterias Gram negativas.

45

50

En ambos casos, el ADN genómico se cuantificó mediante espectrofluorimetría a longitudes de onda de excitación y emisión de 365 nm y 460 nm, respectivamente, utilizando el colorante específico del ADN Hoechst 33258 y un fluorómetro.

#### Ejemplo 2

55

##### *Síntesis de los iniciadores*

Los iniciadores oligonucleótidos se sintetizaron mediante el procedimiento de la fosforamidita utilizando un sintetizador de ADN automatizado, e información de la secuencia del ADN a partir de los datos de la secuencia de consenso. Los iniciadores se marcaron en el extremo 5' de cada oligonucleótido tal como se describe por Maniatis et al. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1982). Cincuenta pmol de cada iniciador se utilizaron con 20 U de T4

60

## ES 2 152 933 T3

polinucleótido quinasa y 5  $\mu\text{l}$  de  $\gamma$   $^{-32}\text{P}$ -ATP (6000 Ci/mmol). Se separó ADN marcado del isótopo no incorporado diluyendo los 50  $\mu\text{l}$  del volumen de reacción hasta 1,0 ml en agua millipore, seguido de centrifugación de dicha solución a través de tubos Centricon-3<sup>®</sup> (Amicon). La solución retenida contiene la sonda de hibridación. Los oligonucleótidos se cuantificaron mediante espectrofotometría UV-VIS con absorción medida a 260 nm.

### Ejemplo 3

#### *Diseño de los iniciadores*

1. Las secuencias REP oligonucleótidas se muestran en SEC. ID. NOS. 1 a 35 y en la Fig. 2. Se diseñaron sondas degeneradas de 38 unidades poliméricas REPALL (SEC. ID. NOS. 2 y 3) que abarcaron la secuencia entera de consenso REP (SEC. ID. NO. 1). Otros pares de sondas oligonucleótidas REP, cada uno representando parte de la secuencia de consenso conservada, se diseñaron con orientaciones opuestas, de forma que los extremos 3' estaban dirigidos hacia el exterior desde cada secuencia REP. Este diseño constituyó un par de iniciadores dirigidos hacia el exterior. Si el iniciador a un lado de la secuencia es más corto que el otro, pueden añadirse inosinas para hacer que las longitudes del par sean iguales. La degeneración, total se representa mediante cualquiera de las cuatro bases habituales (A, G, C ó T) localizadas en posiciones específicas, o con las inosinas situadas en posiciones específicas. La inosina contiene las bases purina e hipoxantina, y es capaz de formar pares de bases Watson-Crick con A, G, C o T. Las posiciones pueden degenerar parcialmente con dos de estas cuatro bases situadas en posiciones específicas, tal como se elija a partir de la secuencia REP de consenso.

2. Las secuencias oligonucleótidas ERIC se muestran en las SEC. ID. NOS. 36 a 45 y en la Fig 3. El oligonucleótido ERICALL es un compuesto de 44 unidades poliméricas de la SEC. ID. NO. 37 desde la posición 42 a la 85 y contiene la repetición entera invertida conservada del núcleo central. Se diseñaron los oligonucleótidos consensuados ERIC1R (SEC. ID. NO. 38) y ERIC2 (SEC. ID. NO. 42) no degenerados, a partir de cada mitad de esta repetición invertida nuclear, con orientaciones opuestas, de forma que los extremos 3' se dirigen hacia el exterior a partir del centro del elemento ERIC.

3. Las secuencias Ngrep se muestran en las SEC. ID. NOS. 46 a 55. La SEC. ID. NO. 46 es la secuencia de consenso.

4. Las secuencias Drrep se muestran en SEC. ID. NOS. 56, 57 y 60. La SEC. ID. NO. 60 es la secuencia de consenso.

### Ejemplo 4

#### *Hibridación soportada por la membrana*

Se denominó "transferencia de microorganismos" una membrana única que contenía ADN genómico de 39 especies eubacterianas distintas que representan 7 de sus 10 diferentes 'films', tal como se define por Woese, *Microbiol. Rev.*, 51:221-271 (1987), basada en las comparaciones secuenciales de rADN. Esta transferencia de microorganismos se obtuvo añadiendo 100 ng de ADN genómico desnaturalizado por microorganismos, a partir de cada especie que se lista en las Figs 8 ó 10, sobre membranas Gene Screen Plus (Du Pont). La transferencia de microorganismos representa una hibridación ADN de transferencia de microorganismos: ADN del ADN genómico sondeado con la SEC. ID. NO. 3 marcada terminalmente con  $^{32}\text{P}$  (Fig. 8) o con la SEC. ID. NO. 42 (Fig. 10). Estas membranas se pretrataron tal como se describe en Maniatis et al. Los ADN genómicos se desnaturalizaron en solución calentando hasta 100°C durante 5 minutos. Las muestras de ADN se aplicaron entonces a la membrana, y 500  $\mu\text{l}$  0,4 N de NaOH se añadieron a cada huella. Las membranas se enjuagaron en 1XSSC, y se transfirieron en seco con papel Whatman. Las membranas se calentaron a 80°C durante una hora, y se almacenaron en bolsas de plástico precintadas a -20°C.

La solución de hibridación se preparó tal como se describe en Noda, A, et al., *Biotechniques* 10: 474-477 (1991) para utilizarla con las sondas oligonucleótidas sobre una membrana que contenía fagos lambda ordenados que representaban al genoma W3110 de *E.coli*. Para la hibridación de los oligonucleótidos REP, las membranas se prehibridizaron a 42°C durante 1,5 horas. La sonda se desnaturalizó a 100°C durante 5 minutos. Se añadió la sonda a razón de  $1 \times 10^6$  cpm/ml de solución de hibridación y las membranas se incubaron a 42°C durante 15 horas. Las prehibridaciones e hibridaciones del oligonucleótido ERIC se llevaron a cabo ambas a 65°C. Después de incubación, las membranas se lavaron dos veces a temperatura ambiente durante 10 minutos con 2X SSPE y SDS al 0,1%, seguido de un lavado

final (REP, 37°C durante 15 minutos; ERIC 40°C durante 1 minuto). Los autoradiogramas se expusieron a una película Kodak X-Omat con dos pantallas de intensificación a -85°C durante 24 horas.

#### Ejemplo 5

##### Amplificación del ADN

Existen diversos procedimientos de amplificación del ADN que están disponibles en la técnica. Dependen generalmente de la utilización de una o varias polimerasas para catalizar la extensión de la cadena del ADN (polimerización) a partir de las bases nucleótidas componentes. Un ejemplo de una técnica de amplificación del ADN es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada en la presente memoria para catalizar la extensión del iniciador oligonucleótido desde el extremo 3' a lo largo de la matriz del ADN a la que el iniciador se hibridiza.

Cada 25  $\mu$ l de la reacción PCR contenía 50 pmol de cada uno de 2 iniciadores opuestos, 100 ng de ADN matriz (genómico), 1,25 mM de cada uno de los 4 dNTP, 2 U de AmpliTaq ADN polimerasa (Perkin Elmer/Cetus) en un tampón con DMSO al 10% (vol/vol). Las amplificaciones PCR se realizaron en un ciclador térmico automatizado, con una desnaturalización inicial a 95°C durante 7 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 90°C durante 30 segundos, seguido de enfriado (REP, 40°C durante 1 min; ERIC, 52°C durante 1 minuto), realizándose entonces la extensión (65°C durante 8 minutos), con una extensión final única (65°C durante 16 minutos). Todos los tubos de la reacción PCR se situaron en capas internas del ciclador térmico y todos los tubos periféricos se rodearon de tubos "ficticios" que contenían agua y aceite mineral. De cinco a ocho  $\mu$ l de cada volumen de reacción PCR se sometieron entonces a electroforesis directamente en geles de agarosa al 1% que contenían 1x TAE (Tris acetato-EDTA), y 0,5  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio. Los geles se fotografiaron con exposiciones de 20 segundos en una película tipo 55 de Polaroid.

#### Ejemplo 6

##### Iniciadores REP

El ADN genómico de las células *E. coli* W3110 lisadas, sirvió como muestra del ensayo. Los oligonucleótidos REP1R-I (SEC. ID. NO. 4) y REP2-I (SEC. ID. NO. 7) se utilizaron como el par de iniciadores dirigidos al exterior. La amplificación se realizó tal como se describe anteriormente. La separación de los productos de amplificación se llevó a cabo sobre gel 1 x Tris-acetato-EDTA al 1% de agarosa, y el patrón de los productos de extensión clasificados por tamaño se determinó utilizando bromuro de etidio para teñir el ADN. No se añadió ADN matriz a los carriles de control negativo. Los iniciadores REP1R y REP2-I se utilizaron en el carril 11 de control negativo. Los resultados se muestran en la Figura 4. El par de iniciadores dirigido hacia el exterior que contiene inosina, REP1R-I y REP2-I, proporcionó la huella genómica más distinta del ADN cromosómico de la cepa W3110 de *E. coli*. Los oligonucleótidos REP (Fig. 2) se ensayaron todos como iniciadores para la amplificación del ADN, a causa de que estos iniciadores dirigidos hacia el exterior pueden amplificar el ADN entre sucesivas secuencias REP en cualquier orientación. El iniciador que contiene inosina, sin embargo, proporcionó unos patrones de las bandas de amplificación del ADN más distintos y menos marcados, a causa posiblemente de que cada iniciador está representado por una secuencia única de iniciador en lugar de por un conjunto de múltiples secuencias de iniciadores, como con REP1R-D (SEC. ID. NO. 5) y REP2-D (SEC. ID. NO. 8). Cada iniciador REP solamente produjo productos de amplificación visibles de una complejidad relativa limitada. Este resultado se deriva probablemente del hecho de que cada lado de la repetición invertida posee una secuencia de consenso ligeramente distinta. La utilización de ambos iniciadores REP1R-I y REP2-I parece permitir una hibridación óptima con ambos lados del origen conservado de cada secuencia de tipo REP en el genoma. La amplificación ineficiente con REPALL-I (SEC. ID. NO. 2) y REPALL-D (SEC. ID. NO. 3) se observó presumiblemente a causa de que un palíndromo se encuentra presente en el iniciador. A causa de la posible auto-hibridación entre los iniciadores REPALL de orientación opuesta, no fue posible diseñar los iniciadores para la secuencia consenso REP completa en ambas orientaciones.

#### Ejemplo 7

##### Iniciadores ERIC

Utilizando como muestra de ensayo ADN genómico de células *E. coli* W3110 lisadas, se utilizaron los oligonucleótidos ERIC1R/SEC. ID. NO. 38) y ERIC2 (SEC. ID. NO. 42) como el par de iniciadores dirigidos hacia afuera. Se utilizó la PCR de amplificación tal como se describió anteriormente. La separación de los productos de amplificación se realizó en gel de agarosa-1 x Tris acetato -EDTA al 1%, y el patrón

de productos de extensión clasificados por tamaños se determinó utilizando bromuro de etidio para teñir el ADN. No se añadió ADN matriz a los carriles de control negativos. Los iniciadores ERIC1R y ERIC2 se utilizaron en el carril 15 de control negativo. Los resultados se muestran en la Figura 4. Los resultados de la amplificación obtenidos con el conjunto único de iniciadores de consenso ERIC, ERIC1R y ERIC2 (Fig 4) se correspondían en complejidad con los resultados obtenidos con ERIC2 solo (Fig 4). Dos razones posibles para esta observación son que o bien existe en el lado de la repetición invertida complementaria a ERIC2 una conservación mayor de la secuencia o que secuencias no relacionadas homólogas complementarias a ERIC2, existen por fuera de los elementos ERIC en el genoma.

#### 10 Ejemplo 8

##### *Especificidad de las interacciones iniciador/matriz*

Las reacciones PCR que utilizan sitios de unión de iniciadores a distancias conocidas de las secuencias ERIC se realizaron para comprobar el tamaño de los productos de amplificación. La especificidad de las interacciones iniciador REP/matriz se demostró mediante amplificación entre una secuencia REP conocida y una inserción Tn5 en el gen *glpD* de *E. coli*. Los iniciadores ERIC generaron productos PCR de los tamaños esperados después de la amplificación de los fagos lambda Kohara que contienen el locus *hsdR* de *E. coli* y una secuencia adyacente ERIC. Los resultados se muestran en la Fig 5. Los fagos lambda Kohara utilizados se listan mediante números de clon y entre paréntesis se muestran números seriados de miniconjuntos. Un  $\mu$ l de cada lisado del fago Kohara se utilizó como matriz del ADN. Las condiciones de PCR fueron tal como se describieron anteriormente. Los carriles 2-5 representan amplificaciones PCR con iniciadores en el interior del gen *hsdR*, *hsdR* + 2758 (SEC. ID. NO. 58) y *hsdR*-3235R (SEC. ID. NO. 59). Los carriles 7-10 representan los productos de PCR generados por los iniciadores *hsdR* + 2758 y ERIC2. El carril 6 es un carril blanco en el que no se añadió nada al gel. El marcador de peso molecular es una escala de 1 kb. Los geles fueron agarosa al 1% -1x Tris acetato-EDTA y contenían 0,5  $\mu$ g de bromuro de etidio por ml. La especificidad de ERIC-PCR se confirmó mediante amplificación PCR de un segmento definido de ADN entre una secuencia ERIC publicada, (a/k/a como secuencia IRU) y una secuencia dentro del gen *hsdR* de *E. coli*, utilizando la biblioteca fágica Kohara ordenada. Productos PCR únicos del tamaño esperado se amplificaron tanto en el interior del gen *hsdR* como entre las secuencias *hsdR* y ERIC transportadas por los fagos Kohara que contienen el locus *hsdR* de *E. coli*. La amplificación solamente con un único iniciador *hsdR* no dió lugar a ningún producto.

#### Ejemplo 9

##### 35 *Distinción entre cepas de bacterias con REP*

Los iniciadores REP se utilizaron para distinguir distintas cepas dentro de las especies enterobacteriáceas Gram negativas. La Figura 6 muestra los productos de extensión generados por la amplificación PCR del ADN genómico de las enterobacteriáceas con los iniciadores REP, REP1R-I (SEC. ID. NO. 4) y REP2-1 (SEC. ID. No. 7). Las reacciones PCR se realizaron tal como se describió anteriormente. No se añadió ADN matriz al carril de control negativo. El marcador del peso molecular es una escala de 1 kb. Los geles eran de agarosa al 1%-1x Tris acetato-EDTA y contenían 0,5  $\mu$ g de bromuro de etidio por ml.

La huella genómica REP-PCR de diferentes cepas de diversas especies bacterianas reveló patrones distintos, tal como se muestra en la Fig. 6. La amplificación PCR del ADN de múltiples cepas de distintas especies de enterobacteriáceas utilizando iniciadores REP1R-I y REP2-I demostraron subespecies o patrones de banda específicos de cepa. Las cepas dentro de las especies, se identificaron de forma certera. En los carriles 2 y 3 (Fig. 6) las cepas HB101 y W3110 de las cepas K-12 de *E. coli* se distinguieron claramente mediante una banda extra de aproximadamente 400 pares de bases en W3110. Las cepas de laboratorio de *E. coli* K-12 se relacionaron entre ellas y de forma distinta de las cepas patogénicas de *E. coli*. De forma interesante, la cepa de laboratorio *Salmonella typhimurium* LT-2 reveló una similitud cercana a la cepa 2304 *Salmonella typhi*. Ambas cepas mostraron patrones REP-PCR claramente distintos de otras cepas patogénicas de *Salmonella* de especies no determinadas. Las dos cepas de *Klebsiella pneumoniae* que se muestran se obtuvieron de distintas fuentes y mostraron distintos patrones de unión. En los carriles 14-15 y en los carriles 20-21 cepas idénticas de *Salmonella* y *Enterobacter sakazakii*, respectivamente, se representaron mediante idénticos patrones REP-PCR.

#### Ejemplo 10

##### 60 *Distinción entre cepas de bacterias con ERIC*

Los iniciadores ERIC se utilizaron para distinguir distintas cepas entre las especies de enterobac-

terriáceas Gram negativas. La Fig. 7 muestra los productos de extensión generados por la amplificación PCR del ADN genómico enterobacteriáceo con los iniciadores oligonucleótidos ERIC, ERIC1R (SEC. ID. NO. 38) y ERIC2 (SEC. ID: NO. 42) (Fig. 2). Se realizaron las reacciones PCR tal como se describe anteriormente. No se añadió ADN matriz al carril de control negativo. El marcador del peso molecular del ADN está a una escala de 1 kb. Los geles eran de agarosa al 1 %-1x Tris acetato-EDTA y contenían 0,5  $\mu$ g de bromuro de etidio por ml.

La huella genómica ERIC-PCR de diferentes cepas de diversas especies bacterianas reveló patrones distintos, tal como se muestra en la Fig. 7. La amplificación PCR del ADN de múltiples cepas de distintas especies de enterobacteriáceas utilizando iniciadores ERIC1R y ERIC2 demostraron patrones de banda específicos de especies. La complejidad, sin embargo, fue menor que la obtenida con REP-PCR (Fig. 6) y las diferencias entre especies fueron más fáciles de distinguir. Esta disminución en la complejidad de las huellas genómicas, sin embargo, hizo más difícil realizar distinciones afinadas entre cepas, por ejemplo, las cepas HB101 y W3110 de *E. coli*. Se apreciaron mayores diferencias de patrón ERIC-PCR cuando se compararon cepas de laboratorio de *E. coli* con cepas patógenas de las mismas especies que entre las *E. coli* de laboratorio con las patógenas *Shigella*. Los patrones ERIC-PCR de mayor complejidad se observaron con *Salmonella* y estos resultados están de acuerdo con búsquedas en bases de datos anteriores que revelaban una abundancia de ERIC en *Salmonella*. A causa de que tanto REP como ERIC PCR produjeron bandas comunes entre las cepas de una especie dada, se proporciona la capacidad de agrupar cepas dentro de una determinada especie.

#### Ejemplo 11

##### *Conservación evolutiva de las secuencias REP*

Las Figuras 8 y 9 muestran la utilización de iniciadores REP para demostrar la conservación evolutiva de las secuencias REP. En la Fig 8 se encuentra un listado de especies bacterianas y no bacterianas que se emparejan con el ADN genómico en cada muesca de la hibridación de la transferencia de microorganismos que se presenta en la Fig. 8. La transferencia de microorganismos representa una hibridación del ADN de la transferencia de huella: ADN del ADN genómico sondeado con REPALL-D marcado en su extremo con  $^{32}$ P (SEC. ID. NO. 3). Se prepararon filtros y se llevaron a cabo las hibridaciones tal como se describe anteriormente. La Fig. 9 muestra dos geles de productos de amplificación PCR de ADN, genómicos bacterianos utilizados en la hibridación de transferencia de microorganismos con iniciadores REP, REP1R-I y REP2-I. Estas reacciones PCR se presentan exactamente en el mismo orden que las huellas de la transferencia de microorganismos. Todas las reacciones PCR se realizaron tal como se describió anteriormente. No se añadió ADN matriz al carril de control negativo. El marcador del peso molecular del ADN está a una escala de 1 kb. Los geles eran de agarosa al 1 %-1x Tris acetato-EDTA y contenían 0,5  $\mu$ g de bromuro de etidio por ml.

La hibridación de la transferencia de la huella de la transferencia de microorganismos con la SEC. ID. NO. 3 (Fig 8) indica que las especies entéricas Gram negativas y las relacionadas pertenecientes al mismo 'filum', comprenden la mayoría de las especies REP positivas. Las hibridaciones con REPALL-I y REP2-I dieron lugar a resultados similares a la hibridación con REPALL-D. Las sondas REPALL de 38 unidades poliméricas se utilizaron para la hibridación a causa de que la longitud aumentada proporciona un alargamiento homólogo más largo y, por tanto, una estabilidad mayor para la hibridación. Tal como se esperaba, varias especies de bacterias Gram positivas y espiroquetas, además de hongos eucarióticos filogenéticamente distantes, no produjeron señales de hibridación. Sorprendentemente, sin embargo, las señales de hibridación se observaron con la bacteria radioresistente lejanamente relacionada *Deinococcus radiophilus*, la bacteria verde no sulfurada *Herpetosiphon giganteus*, y la arqueobacteria, *Halobacterium halobium*.

La amplificación PCR de estas mismas especies bacterianas con iniciadores REP1R-I y REP2-I dió lugar a resultados de acuerdo con la hibridación de transferencia de microorganismos descrita anteriormente. Las especies que mostraron las señales de hibridación más intensas en la Fig. 8 demostraron generalmente los patrones de amplificación más complejos por REP-PCR (Fig. 9). La amplificación PCR del ADN genómico de distintas especies reveló claramente patrones REP-PCR especie-específicos (Fig. 9).

#### Ejemplo 12

##### *Conservación evolutiva de las secuencias ERIC*

Las Figuras 10 y 11 muestran la utilización de iniciadores ERIC para demostrar la conservación evolu-

tiva de las secuencias ERIC. En la Fig. 10 se encuentra un listado de especies bacterianas y no bacterianas que se emparejan con el ADN genómico en cada huella de la hibridación de la transferencia de muesca que se presenta en la Fig. 10. La transferencia de muesca representa una hibridación del ADN de la transferencia de muesca: ADN del ADN genómico sondeado con ERIC2 marcado en su extremo con  $^{32}\text{P}$ .  
 5 Se prepararon filtros y se llevaron a cabo las hibridaciones tal como se describe anteriormente. La Fig. 11 muestra dos geles de productos de amplificación PCR de los ADN genómicos bacterianos utilizados en la hibridación de transferencia de microorganismos con iniciadores ERIC, ERIC1R Y ERIC2. Estas reacciones PCR se presentan exactamente en el mismo orden que las huellas de la transferencia de microorganismos. Todas las reacciones PCR se realizaron tal como se describió anteriormente. No se añadió  
 10 ADN matriz al carril de control negativo. El marcador del peso molecular del ADN está a una escala de 1 kb. Los geles eran de agarosa al 1%-1x Tris acetato-EDTA y contenían 0,5  $\mu\text{g}$  de bromuro de etidio por ml.

Los iniciadores ERIC mostraron una hibridación y amplificación PCR similares. Debe tenerse en  
 15 cuenta que la hibridación con ERICALL dió lugar a resultados que estaban de acuerdo con la hibridación con ERIC2. Las bacterias entéricas gram negativas y las especies relacionadas de la misma familia incluyen una mayoría de especies positivas ERIC y, como se sospechaba, varias especies de bacterias Gram positivas y espiroquetas, además de hongos, no produjeron señales de hibridación. De forma similar a REP (Ex.11) las bacterias radiorresistente y verde no sulfurada, así como la arquibacteria, dieron lugar  
 20 a señales de hibridación.

ERIC-PCR también proporcionó resultados (Fig. 11) de acuerdo con la hibridación ERIC de la transferencia de microorganismos (Fig. 10). Las especies entéricas Gram negativas dieron lugar a patrones de amplificación de la mayor complejidad (Fig. 11). La mayoría de las especies gram positivas (por ejemplo,  
 25 *Bacillus subtilis*) mostraron una amplificación ERIC-PCR mínima (Fig. 11). Este resultado está de acuerdo con las búsquedas informáticas de las bases de datos secuenciales de ERIC en el ADN y de las distancias filogenéticas conocidas entre las bacterias Gram positivas y las entéricas Gram negativas.

#### Ejemplo 13

30 *Biblioteca de huellas del ADN bacteriano*

El procedimiento descrito anteriormente se utilizó para rastrear diversas cepas bacterianas. El patrón para cada cepa se categorizó y se guardó. Esta amplia biblioteca de huellas se utilizó para comparar con  
 35 las muestras desconocidas y determinar la identidad de la cepa.

#### Ejemplo 14

40 *PCR de células completas*

Se recolectan colonias bacterianas gram negativas con asas disponibles, y las células en el borde de las asas se situaron directamente en tubos PCR que contienen un tampón de reacción PCR. Los iniciadores oligonucleótidos de secuencia repetitiva se añaden entonces con dNTP y ADN polimerasa, y se llevan a  
 45 cabo las reacciones PCR. Durante la etapa inicial de desnaturalización a 94°C, las células presumiblemente se lisan y el ADN cromosómico que se libera en la solución sirve como matriz para la amplificación PCR. Así, el aislamiento del ADN y su previa purificación a la amplificación PCR, no siempre es necesaria.

#### Ejemplo 15

50 *Elaboración de mapas del genoma*

Se realizó la PCR de REP sobre ADN cosmidico purificado procedente de la biblioteca cósmida Tabata (Tabata, et al., J. Bacteriol., 171:1214-1218 (1989)). Esta biblioteca cubre aproximadamente el 70 % del  
 55 genoma de la cepa W3110 de *E.coli*. Esta biblioteca representa un conjunto de cósmidos que se solapan o están aislados, que contienen ADN genómico procedente de distintas localizaciones en el cromosoma de *E.coli*. Cada ADN cosmidico individual se purifica y utiliza como ADN matriz en la reacción PCR. Se utilizan 100 ng de ADN de cada ADN cosmidico (representado por los números de serie en las Figs. 14-15) como matriz en PCR de REP con los iniciadores REP1R-I y REP2-I (50 pmol de cada iniciador).  
 60 Los productos PCR se someten entonces a electroforesis en agarosa al 1 %, 1x TAE, y se tiñen con 0,5 microgramos por ml de bromuro de etidio.

Como resulta evidente a partir de las Figs. 14-15, los distintos cósmidos poseen distintas huellas REP-PCR, dependiendo de qué segmento genómico se inserta en un clon particular. Casando los patrones de huellas de los clones individuales con el ordenador, se construyen alargamientos contiguos y ordenados de los clones solapantes.

5 Además, el procedimiento de las huellas proporciona una herramienta útil para verificar la integridad de la biblioteca y la pureza de cada clon. Un experto en la materia reconocerá fácilmente que estas bibliotecas pueden construirse a partir de cualquier posible vector de ADN (incluso de ARN) cosmídico o fágico.

10 Ejemplo 16

*Toma de huellas de las cepas bacterianas utilizadas en el rastreo de recién nacidos*

15 Las técnicas de la presente invención se utilizaron para supervisar la validez de las cepas bacterianas utilizadas en el rastreo de recién nacidos. REP-PCR, ERIC-PCR, y REP/ERIC-PCR combinadas se llevaron a cabo en cepas de *Bacillus subtilis*, ATCC 6633 y 6051, que se utilizaron para el rastreo en los recién nacidos de la fenilcetonuria (PKU) y de la enfermedad urinaria del jarabe de arce (MSUD), respectivamente. En la Fig 13, se utilizaron REP1R-I, REP2-I, ERIC1R, y ERIC2 (50 pmoles de cada iniciador) en reacciones PCR únicas (REP-ERIC-PCR) sobre muestras individuales del ADN genómico  
20 de *Bacillus subtilis*. Una cepa que era supuestamente ATCC 6633 volvió a ser una cepa anómala (carril 12) que fue claramente distinta de las otras. La cepa utilizada para el diagnóstico de MSUD, ATCC 6051, se distinguió de la cepa utilizada para el diagnóstico de PKU, la ATCC 6633. No se añadió ADN matriz al carril de control negativo. Los productos PCR se sometieron a electroforesis sobre geles de agarosa al  
25 1% en 1x TAE y se tiñeron con 0,5 microgramos por ml de bromuro de etidio. Debe también tenerse en cuenta que este ejemplo muestra la combinación de dos conjuntos de distintos iniciadores y su utilización simultánea en la identificación y toma de huellas de las cepas de bacterias.

Ejemplo 17

30 *Ngrep*

En la Fig 12 se encuentran los resultados de la PCR utilizando los iniciadores Ngrep (SEC. ID. NOS. 48 y 52). Como puede apreciarse fácilmente, pueden distinguirse las distintas cepas de *Neisseria*. Las condiciones son las que se describieron en ejemplos anteriores, excepto en que las etapas de desnaturalización y enfriado tienen lugar a 94°C durante un minuto y a 38°C durante un minuto, respectivamente. El control negativo no posee matriz de ADN pero incluye iniciadores.

40 Todas las patentes y publicaciones que se mencionan en esta memoria de patente indican el nivel de los expertos en la materia a los que la invención pertenece.

Un experto en la materia apreciará fácilmente que la presente invención está bien adaptada para llevar a cabo los objetivos y obtener las finalidades y ventajas que se mencionan, así como aquellos inherentes a ellos. Los iniciadores dirigidos hacia el exterior, conjuntamente con los métodos y procedimientos descritos en la presente memoria, representan actualmente las formas de realización preferidas, son ejemplificativas y no pretenden limitar en el alcance de la invención tal como queda determinado por el contenido de las reivindicaciones.

### Listado de secuencias

50 (1) INFORMACION GENERAL:

(i) SOLICITANTE: Lupski, James R.

Versalovic, James

55

Koeuth, Thearith

(ii) TITULO DE LA INVENCION: Toma de huellas de las cepas bacterianas utilizando la ampli-  
60 ficación de las secuencias repetitivas del ADN.

60

(iii) NUMERO DE SECUENCIAS: 60

## ES 2 152 933 T3

(iv) DIRECCION PARA LA CORRESPONDENCIA:

- (A) DESTINATARIO: Fulbright & Jaworski
- (B) CALLE: 1301 McKinney, Suite 5100
- (C) CIUDAD: Houston
- (D) ESTADO: Texas
- (E) PAIS: Estados Unidos de América
- (F) CODIGO: 77010-3095

(v) FORMA LEGIBLE DEL ORDENADOR:

- (A) TIPO DE MEDIO: disco flexible
- (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: Patent In Release #1.0, Version #1.25

(vi) DATOS HABITUALES DE LA SOLICITUD:

- (A) NUMERO DE SOLICITUD: US
- (B) FECHA DE CLASIFICACION:
- (C) CLASIFICACION

(viii) INFORMACION DEL ABOGADO/AGENTE

- (A) NOMBRE: Paul, Thomas D.
- (B) NUMERO DE REGISTRO: 32.714
- (C) NUMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: D-5394

(ix) INFORMACION DE TELECOMUNICACIONES:

- (A) TELEFONO: 713/651-5325
- (B) TELEFAX: 713/651-5246
- (C) TELEX: 762829

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 1

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 38 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: bicatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

(ix) CARACTERISTICAS:

- (A) OTRA INFORMACION: /nota= "N=A, G, C o T"

## ES 2 152 933 T3

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 1:

GCCKGATGNC GRCGYNNNNN RCGYCTTATC MGGCCTAC

5 (2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 2:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 38 pares de bases

10 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

20 (ix) CARACTERISTICAS:

(A) OTRA INFORMACION: /nota= "N=inosina"

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 2:

25 GCCNGATGNC GNCGNNNNNN NCGNCTTATC NGGCCTAC

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 3:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

30 (A) LONGITUD: 38 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

35 (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

40 (iii) HIPOTETICA: si

(ix) CARACTERISTICAS:

(A) OTRA INFORMACION: /Nota= "N= Inosina"

45 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 3:

GCCKGATGNC GRCGYNNNNN RCGYCTTATC MGGCCTAC

50 (2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 4:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

55 (A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

60 (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

## ES 2 152 933 T3

(iii) HIPOTETICA: si

(ix) CARACTERISTICAS:

(A) OTRA INFORMACION: /nota= N= "inosina"

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 4:

NNNCGNCGN CATCGGC

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 5:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

(ix) CARACTERISTICAS:

(A) OTRA INFORMACION: /nota= "N = Inosina en posición #1-3; N=A, G, Co T en posición #10"

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 5:

NNNRGCGN CATCMGGC

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 6:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

(ix) CARACTERISTICAS:

(A) OTRA INFORMACION: /nota= "N= Inosina en posición #1-3; N=A, G, C o T en posición #4, 7, 10, 15"

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 6:

NNNCGNCGN CATCGGC

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 7:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

## ES 2 152 933 T3

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

10

(ix) CARACTERISTICAS:

(A) OTRA INFORMACION: /nota= "N = Inosina"

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 7:

15

NCGNCTTATC NGGCCTAC

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 8:

20

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucléico

25

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

30

(iii) HIPOTETICA: si

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 8:

35

RCGYCTTATC MGGCCTAC

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 9:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

40

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

45

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

50

(iii) HIPOTETICA: si

(ix) CARACTERISTICAS:

(A) OTRA INFORMACION: /nota= "N = A, G, C o T"

55

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 9:

NCGNCTTATC NGGCCTAC

60

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 10:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

## ES 2 152 933 T3

- (A) LONGITUD: 10 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

10

(ix) CARACTERISTICAS:

(A) OTRA INFORMACION: /nota= "N =Inosina"

15

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 10

**GNCATCNGGC**

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 11

20

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 10 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

25

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

30

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

(ix) CARACTERISTICAS:

35

(A) OTRA INFORMACION: /nota= "N=A,G, C o T"

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 11:

**GNCATCMGGC**

40

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 12:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 10 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

50

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

55

(ix) CARACTERISTICAS:

(A) OTRA INFORMACION: /nota= "N=A,G,C o T"

60

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 12:

**GNCATCNGGC**

## ES 2 152 933 T3

### (2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 13:

#### (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 12 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- 10 (D) TOPOLOGIA: lineal

#### (ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

#### (iii) HIPOTETICA: si

#### 15 (ix) CARACTERISTICAS:

- (A) OTRA INFORMACION: /nota= "N= Inosina"

#### 20 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 13:

NCGNCATCNG GC

### (2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 14:

#### 25 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 12 pares de bases
- 30 (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

#### 35 (ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

#### (iii) HIPOTETICA: si

#### (ix) CARACTERISTICAS:

- 40 (A) OTRA INFORMACION: /nota= "N= A, G, C, o T"

#### (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 14:

45 YCGNCATCMG GC

### (2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 15:

#### (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- 50 (A) LONGITUD: 12 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- 55 (D) TOPOLOGIA: lineal

#### (ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

#### (iii) HIPOTETICA: si

#### 60 (ix) CARACTERISTICAS:

## ES 2 152 933 T3

(A) OTRA INFORMACION: /nota= "N= A, G, C o T"

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 15:

5 NCGNCATCNG GC

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 16:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- 10 (A) LONGITUD: 24 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria  
15 (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

20 (iii) HIPOTETICA: si

(ix) CARACTERISTICAS:

(A) OTRA INFORMACION: /nota= "N= Inosina"

25 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 16:

30 NCGNNNNNNN CGNCGNCATC NGGC

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 17:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 24 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) TIPO DE CADENA: nonocatenaria  
(D) TOPOLOGIA: lineal

40 (ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

45 (ix) CARACTERISTICAS:

(A) OTRA INFORMACION: /nota= "N= Inosina"

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 17:

50 RCGYNNNNNR CGYCGNCATC MGGC

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 18:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- 55 (A) LONGITUD: 24 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria  
60 (D) TOPOLOGIA: lineal

## ES 2 152 933 T3

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

5 (ix) CARACTERISTICAS:

(A) OTRA INFORMACION: /nota= “= Inosina en posición #5-9; N= A,G, C o T en posición #1, 4, 10, 13, 16, 21”

10 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 18:

NCGNNNNNNN CGNCGNCATC NGGC

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 19:

15 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 29 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

20 (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

25 (ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

(ix) CARACTERISTICAS:

30 (A) OTRA INFORMACION: /nota= “N=Inosina”

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 19:

ATAAGNCGNN NNNNCGNCG NCATCNGGC

35 (2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 20:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 29 pares de bases

40 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

45 (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

50 (ix) CARACTERISTICAS:

(A) OTRA INFORMACION: /nota= “N= Inosina”

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 20:

55 ATAAGRCGYN NNNRRCGYCG NCATCMGGC

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 21:

60 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 29 pares de bases

## ES 2 152 933 T3

- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

5

- (ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)
- (iii) HIPOTETICA: si

10

- (ix) CARACTERISTICAS:

(A) OTRA INFORMACION: /nota= "N=Inosina en posición #10-14; N=A, G, C o T en posiciones #6, 9, 15, 18, 21, 16"

15

- (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 21:

**ATAAGNCGNN NNNNCGNCG NCATCNGGC**

- (2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 22:

20

- (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 10 pares de bases

25

- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

30

- (ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)
- (iii) HIPOTETICA: si
- (ix) CARACTERISTICAS:

35

(A) OTRA INFORMACION:nota= "N= Inosina"

- (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 22:

**TCNGGCCTAC**

40

- (2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 23:

- (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

45

- (A) LONGITUD: 10 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

50

(D) TOPOLOGIA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)
- (iii) HIPOTETICA: si

55

- (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 23:

**TCMGGCCTAC**

60

- (2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 24:

- (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

## ES 2 152 933 T3

- (A) LONGITUD: 10 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria  
5 (D) TOPOLOGIA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)  
10 (iii) HIPOTETICA: si
- (ix) CARACTERISTICAS:  
(A) OTRA INFORMACION: /nota= "N= A, G, C o T"  
15 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 24:

TCNGGCCTAC

- 20 (2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 25:
- (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:  
(A) LONGITUD: 12 pares de bases  
25 (B) TIPO: ácido nucleico  
(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria  
(D) TOPOLOGIA: lineal
- 30 (ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)  
(iii) HIPOTETICA: si
- 35 (ix) CARACTERISTICAS:  
(A) OTRA INFORMACION: /nota= "N = Inosina"  
(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 25:

40 TATCNGGCCT AC

- (2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 26:
- 45 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:  
(A) LONGITUD: 12 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
50 (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria  
(D) TOPOLOGIA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)  
55 (iii) HIPOTETICA: si
- (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 26:

60 TATCMGGCCT AC

- (2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 27:

## ES 2 152 933 T3

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 12 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

(ix) CARACTERISTICAS:

(A) OTRA INFORMACION: /nota= "N=A,G, C o T"

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 27:

TATCNGGCCT AC

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 28:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 24 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

(ix) CARACTERISTICAS:

(A) OTRA INFORMACION: /nota= "N=Inosina"

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 28:

NNNNNNCGN CTTATCNGGC CTAC

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 29:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 24 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

(ix) CARACTERISTICAS:

(A) OTRA INFORMACION: /nota= "N=Inosina"

## ES 2 152 933 T3

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 29:

YNNNNNRCGY CTTATCMGGC CTAC

5 (2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 30:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

10 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

(ix) CARACTERISTICAS:

20

(A) OTRA INFORMACION: /nota= "N=Inosina en posición #2-6; N=A,G, C o T en posición #1, 7, 10, 17"

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 30:

25

NNNNNNNCGN CTTATCNGGC CTAC

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 31:

30 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 29 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

35

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

40 (ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

(ix) CARACTERISTICAS:

45

(A) OTRA INFORMACION: /nota= "N=Inosina"

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 31:

CGNCGNNNNN NNCGNCTTAT CNGGCCTAC

50

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 32:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

55 (A) LONGITUD: 29 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

60

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

## ES 2 152 933 T3

(iii) HIPOTETICA: si

(ix) CARACTERISTICAS:

(A) OTRA INFORMACION: nota/= "N=Inosina"

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 32:

CGRCGYNNNN NRCGYCTTAT CMGGCCTAC

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 33:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 29 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

(ix) CARACTERISTICAS:

(A) OTRA INFORMACION: /nota= "N= Inosina en posición #7-11; N= A, G, C o T en posición #3, 6, 12, 15, 22"

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 33:

CGNCGNNNNN NNCGNCTTAT CNGGCCTAC

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 34:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómica)

(iii) HIPOTETICA: si

(ix) CARACTERISTICAS:

(A) OTRA INFORMACION: /nota= "N=Inosina"

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 34:

NNNNACGCCG CATCCGGC

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 35:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

## ES 2 152 933 T3

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

5 (ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 35:

10 TCGGCTTATC GGGCCTAC

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 36:

15 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 126 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

20 (C) TIPO DE CADENA: bicatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

25 (iii) HIPOTETICA: si

(ix) CARACTERISTICAS:

(A) OTRA INFORMACION: /nota= "N= A, G, C o T"

30 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 36:

TATACMCWAA ATMATTCGRG TTGCAKSAAG GCGGCAASNK AGTGAATYCC CRGGAGCWTA 60

35 SATAASTAWG TGACTGGGRT GARCRARCGM AGCCAACGCA SMTGCRRYYY GAARKAYGAM 120  
GRGKAT 126

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 37:

40 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 126 pares de bases

45 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: bicatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

50 (ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 37:

55 TATACCCAAA ATAATTCGAG TTGCAGCAAG GCGGCAAGTG AGTGAATCCC CAGGAGCTTA 60

CATAAGTAAG TGACTGGGGT GAGCGAACGC AGCCAACGCA GCTGCAGCTT GAAATATGAC 120  
60 GGGTAT 126

## ES 2 152 933 T3

### (2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 38:

#### (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 22 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenario
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 38:

ATGTAAGTC CTGGGGATTC AC

### (2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 39:

#### (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 22 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

(ix) CARACTERISTICAS:

- (A) OTRA INFORMACION:nota= "N= Inosina"

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 39:

ATNTANGCTC CNGGGNATTC AC

### (2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 40:

#### (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 22 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 40:

ATSTAWGCTC CYGGGRATTC AC

### (2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 41:

## ES 2 152 933 T3

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 22 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

(ix) CARACTERISTICAS:

(A) OTRA INFORMACION: /nota= "N= A, G, C o T"

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 41:

**ATNTANGCTC CNGGGNATTC AC**

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 42:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 22 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 42:

**AAGTAAGTGA CTGGGGTGAG CG**

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 43:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

(ix) CARACTERISTICAS:

(A) OTRA INFORMACION: /nota= "N=Inosina"

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 43:

**AANTANGTGA CTGGGNTGAN C**

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 44:

## ES 2 152 933 T3

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 44:

AASTAWGTGA CTGGGRTGAR C

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 45:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

(ix) CARACTERISTICAS:

(A) OTRA INFORMACION: /nota= "N= A, G, C o T"

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 45:

AANTANGTGA CTGGGNTGAN C

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 46:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 27 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: bicatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

(ix) CARACTERISTICAS:

(A) OTRA INFORMACION: /nota= "N= A, G, C o T en todas las localizaciones; y en el sitio 8 el N puede omitirse opara formar una secuencia de 26 unidades poliméricas"

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 46:

GTNCNGNNTT TTTGTTAATN CNCTATA

## ES 2 152 933 T3

### (2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 47:

#### (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 26 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenario
- 10 (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

15 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 47:

**GTACCGGTTT TTGTTAATTC ACTATA**

### 20 (2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 48:

#### (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 14 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

30 (ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

35 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 48:

**ACAAAAACCG GTAC**

### (2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 49:

#### 40 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 14 pares de bases
- 45 (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

50 (ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

(ix) CARACTERISTICAS:

55 (A) OTRA INFORMACION: /nota= "N= Inosina"

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 49:

60 **ACAAAAANCN GNAC**

### (2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 50:

## ES 2 152 933 T3

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 14 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 50:

ACAAAAAYCR GKAC

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 51:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 14 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

(ix) CARACTERISTICAS:

(A) OTRA INFORMACION: /nota= "N=A, G, C o T"

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 51:

ACAAAAANCN GNAC

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 52:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 14 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 52:

GTTAATTCAC TATA

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 53:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

## ES 2 152 933 T3

- (A) LONGITUD: 14 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria  
5 (D) TOPOLOGIA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)  
10 (iii) HIPOTETICA: si
- (ix) CARACTERISTICAS:  
(A) OTRA INFORMACION: /nota "N=Inosina"  
15 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 53:  
GTTAATNCNC TATA
- (2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 54:  
20 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:  
(A) LONGITUD: 14 pares de bases  
25 (B) TIPO: ácido nucleico  
(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria  
(D) TOPOLOGIA: lineal  
30 (ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)  
(iii) HIPOTETICA: si
- (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 54:  
35 GTTAATYCRC TATA
- (2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 55:  
40 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:  
(A) LONGITUD: 14 pares de bases  
45 (B) TIPO: ácido nucleico  
(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria  
(D) TOPOLOGIA: lineal  
50 (ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)  
(iii) HIPOTETICA: si  
(ix) CARACTERISTICAS:  
55 (A) OTRA INFORMACION: /nota= "N= A, G, C o T"  
(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 55:  
60 GTTAATNCNC TATA
- (2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 56:

## ES 2 152 933 T3

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 18 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 56:

CGAGCTGTCC CAGTCCGC

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 57:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 18 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 57:

GCGGACTGGG ACAGCTCG

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 58:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 22 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 58:

CAGCCATGAA CAACTGGTGG CG

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 59:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 22 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

## ES 2 152 933 T3

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

5 (iii) HIPOTETICA: si

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 59:

TGCTTTGCGC AGGGAAGATT CC

10 (2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 60:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

15 (A) LONGITUD: 90 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: bicatenaria

20 (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTETICA: si

25 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID NO 60:

YTAGAGYATT TGMCAAAAAG ACGCAACGTC TTTTGGCGR GCGGACTGGG ACAGCTCGMA 60

30 GAGRGCAGT GCAAAACACK GAGCAGGGCG 90

35

40

45

50

55

60

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para identificar una especie bacteriana, que comprende las etapas siguientes:

5       amplificación del ADN entre secuencias repetitivas, no codificantes y entremezcladas en una muestra que contiene tales bacterias, añadiendo a dicha muestra un par de iniciadores dirigidos al exterior, hibridándose dichos iniciadores a secuencias entremezcladas no codificantes repetitivas de ADN en el ADN bacteriano y prolongándose hacia el exterior desde una secuencia repetitiva hibridizable a otra secuencia repetitiva no codificante entremezclada;

10       separación de los productos de extensión generados en la etapa de amplificación mediante el tamaño;

      y determinación de la especie bacteriana específica midiendo el patrón de los productos de extensión clasificados por tamaño.

15       2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la secuencia repetitiva hibridizable se selecciona a partir del grupo formado por elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (REP), secuencia de consenso intergénica repetitiva de enterobacteriáceas (ERIC), elementos extragénicos repetitivos de *Neisseria* (Ngrep), elementos extragénicos repetitivos de *Deinococcus* (Drrep) y cualquier combinación de los mismos.

20       3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que los iniciadores están compuestos aproximadamente por entre 10 y 29 nucleótidos.

25       4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que los iniciadores están compuestos por entre 15 y 25 nucleótidos.

30       5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la secuencia repetitiva es REP y un miembro del par de iniciadores se selecciona a partir del grupo formado por SEC. ID. NOS. 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 y 34, y el otro miembro del par se selecciona a partir del grupo formado por SEC. ID. NO. 7, 8, 9, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 y 35.

35       6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la secuencia repetitiva es ERIC y un miembro del par de iniciadores se selecciona a partir del grupo formado por SEC. ID. NO. 38, 39, 40, y 41; y el otro miembro del par se selecciona a partir del grupo formado por SEC. ID. NOS. 42, 43, 44 y 45.

40       7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la secuencia repetitiva es Ngrep y un miembro del par de iniciadores se selecciona a partir del grupo formado por SEC. ID. NOS. 48, 49, 50 y 51; y el otro miembro del par se selecciona a partir del grupo formado por 52, 53, 54 y 55.

45       8. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que los iniciadores son SEC. ID. NO. 4 y SEC. ID. NO. 7.

      9. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la secuencia repetitiva es ERIC y los iniciadores son SEC. ID. NO. 38 y SEC. ID. NO. 42.

50       10. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la secuencia repetitiva es Ngrep y los iniciadores son SEC. ID. NO. 48 y SEC. ID. NO. 52.

55       11. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la secuencia repetitiva es Drrep y el iniciador es SEC. ID. NO. 56 o SEC. ID. NO. 57.

      12. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que se añaden diversos pares y en el que cada par se une a una secuencia repetitiva distinta.

60       13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que los iniciadores se unen a secuencias repetitivas seleccionadas a partir del grupo formado por REP, ERIC, Ngrep, Drrep y cualquier combinación de los mismos.

      14. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que los iniciadores son las SEC. ID. NOS. 4, 7, 38 y 42.

      15. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el ADN se extrae de las bacterias antes de añadir los iniciadores.

## ES 2 152 933 T3

16. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa de separación incluye la electroforesis en gel de los productos de extensión.

5 17. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que los productos de extensión se tiñen con bromuro de etidio.

18. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que los iniciadores son marcados y la fase de determinación incluye la medición del patrón de marcado.

10 19. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa de separación incluye la cromatografía de los productos de extensión.

20. Procedimiento según la reivindicación 19, en el que los iniciadores son marcados.

15 21. Procedimiento según la reivindicación 19, en el que el marcador es una sustancia fluorescente.

22. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la muestra contiene diversas bacterias y en el que cada cepa bacteriana específica se distingue por su único patrón de tamaño de los productos de extensión.

20 23. Procedimiento según la reivindicación 22, en el que la muestra se selecciona a partir del grupo formado por sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, tejidos, escobillón vaginal, heces, líquido amniótico o lavado bucal.

25 24. Procedimiento según la reivindicación 23, en el que la muestra es humana o de un animal.

25 25. Procedimiento según la reivindicación 22, en el que la muestra de ensayo es una muestra agrícola, de alimentos, del entorno u hortícola.

30 26. Procedimiento según la reivindicación 1 para el diagnóstico de una enfermedad bacteriana, en el que la muestra se recupera a partir de un individuo del que se sospecha que padece una enfermedad bacteriana.

35 27. Procedimiento según la reivindicación 26, en el que el sujeto es un hombre, un animal o una planta.

35 28. Procedimiento según la reivindicación 1 para supervisar la contaminación bacteriana en un entorno, en el que la muestra se recupera a partir de una fuente medioambiental de la que se sospecha que está contaminada.

40 29. Procedimiento según la reivindicación 28, en el que la fuente medioambiental es un líquido, barro, una planta de tratamiento o el suelo.

45 30. Procedimiento según la reivindicación 1 para supervisar la contaminación bacteriana de los alimentos, en el que la muestra se recupera a partir de los alimentos de los que se sospecha que están contaminados.

31. Procedimiento según la reivindicación 30, en el que el alimento es una fórmula infantil, pescado, productos recién preparados o alimentos procesados.

50 32. Procedimiento según la reivindicación 1 para la supervisión de una población bacteriana en un sitio de biorreparación, en el que la muestra se recoge de dicho sitio.

33. Procedimiento según la reivindicación 32, en el que la muestra es suelo, líquido, barro, o bien procede de bacterias que se han añadido al sitio.

55 34. Procedimiento según la reivindicación 1 para la supervisión de una muestra hortícola, en el que la muestra se recoge de una fuente hortícola que va a ensayarse.

35. Procedimiento según la reivindicación 1 para la monitorización de una muestra agrícola, en el que la muestra se recoge de una fuente agrícola que va a ensayarse.

60 36. Procedimiento según la reivindicación 1 para la supervisión de añadidos bacterianos a un entorno agrícola, en el que la muestra se recoge de una fuente agrícola que va a ensayarse.

## ES 2 152 933 T3

37. Procedimiento según la reivindicación 36, en el que la muestra es un líquido, suelo, procede de una planta o de un animal.

5 38. Procedimiento según la reivindicación 1 para supervisar los procedimientos de fabricación en cuanto a las bacterias, en el que la muestra se recupera a partir del procedimiento que va a ensayarse.

39. Procedimiento según la reivindicación 38, en el que la muestra se selecciona a partir del grupo formado por procedimientos de fabricación de medicamentos, procedimientos de fermentación, procedimientos de síntesis mediados por microorganismos, procedimientos químicos de fabricación, y procedimientos de fabricación de alimentos.

40. Procedimiento según la reivindicación 1 para asegurar la calidad/control de calidad de los ensayos de laboratorio que implican ensayos microbiológicos, en el que la muestra se recoge del stock bacteriano que va a ensayarse.

15 41. Procedimiento según la reivindicación 1 para rastrear el comienzo de infecciones bacterianas, en el que la muestra se recoge de un organismo que va a ensayarse.

42. Procedimiento para elaboración de mapas genómicos, que comprende las etapas siguientes:

20 fraccionamiento del genoma;

clonación del genoma fraccionado en un vector;

25 ensayo de vectores clonados mediante amplificación del ADN bacteriano en los clones añadiendo un par de iniciadores dirigidos exteriormente a la muestra de ensayo, siendo dichos iniciadores capaces de hibridizarse a las secuencias repetitivas, no codificantes y entremezcladas del ADN y propagarse hacia el exterior a partir de la secuencia repetitiva hibridizable a otra secuencia repetitiva hibridizable;

30 separación de los productos de extensión de la etapa de amplificación por el tamaño; y

medición del patrón de los productos de extensión; y

reconstrucción del genoma a partir de los patrones que se solapan.

35 43. Procedimiento para la identificación automática de una cepa bacteriana, que comprende las etapas siguientes:

añadir bacterias e iniciadores PCR dirigidos hacia el exterior, a una muestra de ensayo en un instrumento de auto-PCR, en el que dichos iniciadores son capaces de hibridizarse a la secuencia no codificante, repetitiva y entremezclada del ADN en el ADN bacteriano y de propagarse hacia el exterior a partir de la secuencia repetitiva hibridizable a otra secuencia repetitiva hibridizable;

transferir los productos de extensión a partir del ensayo PCR y separarlos;

45 medir el patrón del tamaño de dichos productos de extensión separados, con un medio de medición; y

reconocer e identificar el patrón de tamaño a través de medios informáticos.

44. Procedimiento según la reivindicación 43, en el que los medios de medición se seleccionan a partir del grupo formado por un lector de código de barras, un lector de láser, un digitalizador, un fotómetro y un lector de fluorescencia.

45. Procedimiento según la reivindicación 43, en el que los productos de extensión se separan mediante cromatografía o electroforesis en gel.

55 46. Procedimiento según la reivindicación 43, en el que una muestra de amplificación PCR se aplica a un gel y se realiza la electroforesis; el patrón de tamaño se lee mediante un medio de medición; y se compara a través de medios informáticos con los patrones bacterianos almacenados conocidos.

47. Procedimiento según la reivindicación 43, en el que los productos de extensión separados se tiñen mediante bromuro de etidio antes de proceder a la lectura.

48. Procedimiento según la reivindicación 43, en el que los iniciadores son marcados.

## ES 2 152 933 T3

49. Procedimiento según la reivindicación 43, en el que los iniciadores se marcan con una sustancia fluorescente.

50. Procedimiento para identificar una especie bacteriana en una muestra de ensayo, que comprende  
5 las etapas siguientes:

amplificación del ADN en dichas bacterias añadiendo a dicha muestra de ensayo diversos pares de  
iniciadores dirigidos al exterior, hibridándose cada par de dichos iniciadores a distintas secuencias en-  
tremezcladas no codificantes repetitivas del ADN en el ADN bacteriano y prolongándose cada par hacia  
10 el exterior desde una secuencia repetitiva entremezclada no codificante hibridizable, a otra secuencia re-  
petitiva entremezclada no codificante hibridizable y en el que cada par está marcado de forma distinta;

separación de los productos de extensión generados en la etapa de amplificación mediante el tamaño;

15 determinación de la especie bacteriana específica midiendo el patrón de los productos de extensión  
clasificados por tamaño, para cada par.

51. Procedimiento según la reivindicación 50, en el que los marcadores son sustancias fluorescentes.

52. Procedimiento según la reivindicación 50, en el que la separación se realiza mediante electroforesis  
20 en gel, electroforesis capilar, espectrometría de masas o cromatografía.

53. Procedimiento según la reivindicación 52, en el que los pares de iniciadores se seleccionan a partir  
del grupo formado por REP, ERIC, Ngrep, Drrep y cualquier combinación de los mismos.

25 54. Equipo para la determinación de la identidad de cepas bacterianas, que comprende un contenedor  
que incluye pares de iniciadores PCR dirigidos hacia el exterior para secuencias ADN repetitivas, no  
codificantes y entremezcladas en bacterias.

55. Equipo según la reivindicación 54, en el que los pares de iniciadores PCR se seleccionan del grupo  
30 formado por SEC. ID. NOS. 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, 31, 32, 33, 34, 35, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 y  
cualquier combinación de las mismas.

56. Oligonucleótidos de ADN seleccionados a partir del grupo formado por SEC. ID. NOS. 4, 5, 6, 7,  
35 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 y 33.

57. Oligonucleótidos de ADN seleccionados a partir del grupo formado por SEC. ID. NOS. 38, 39, 40,  
41, 42, 43, 44 y 45.

58. Oligonucleótidos de ADN seleccionados a partir del grupo formado por SEC. ID. NOS. 48, 49, 50,  
40 51, 52, 53, 54 y 55.

59. Oligonucleótidos de ADN seleccionados a partir del grupo formado por SEC. ID. NOS. 56 y 57.

60. Oligonucleótidos de ADN seleccionados a partir del grupo formado por SEC. ID. NOS. 4 y 7.  
45

61. Oligonucleótidos de ADN seleccionados a partir del grupo formado por SEC. ID. NOS. 38 y 42.

62. Oligonucleótidos de ADN seleccionados a partir del grupo formado por SEC. ID. NOS. 48 y 52.

50 63. Procedimiento para identificar una especie bacteriana que comprende las etapas siguientes:

amplificación del ADN entre secuencias repetitivas, no codificantes y entremezcladas en una muestra  
que contiene tales bacterias, añadiendo a dicha muestra un iniciador, en el que dicho iniciador hibridiza  
secuencias entremezcladas no codificantes repetitivas en cualquiera de las cadenas complementarias del  
55 ADN y en el que el iniciador hibridizado se prolonga desde una secuencia repetitiva no codificante y  
entremezclada, a través de ADN no repetitivo, a otra secuencia repetitiva no codificante entremezclada,  
y en el que dicho producto de extensión se hibridiza al iniciador para la generación de otros productos  
de extensión;

60 separación de los productos de extensión generados en la etapa de amplificación mediante el tamaño;  
y

## ES 2 152 933 T3

determinación de la cepa bacteriana específica midiendo el patrón de los productos de extensión clasificados por tamaño.

5 64. Procedimiento para diferenciar entre cepas de la misma especie de bacteria, que comprende las etapas siguientes:

10 amplificación del ADN entre secuencias repetitivas no codificantes y entremezcladas en una muestra que contenga dicha bacteria, añadiendo a dicha muestra un par de iniciadores dirigidos al exterior, siendo capaces dichos iniciadores de hibridizarse a secuencias repetitivas del ADN en el ADN bacteriano y de prolongarse hacia el exterior desde una secuencia repetitiva hibridizable a otra secuencia repetitiva hibridizable;

separación de los productos de extensión generados en la etapa de amplificación mediante el tamaño; y

15 determinación de la cepa bacteriana específica midiendo el patrón de los productos de extensión clasificados por tamaño.

20 65. Procedimiento según la reivindicación 64, en el que la secuencia repetitiva hibridizable se selecciona a partir del grupo formado por elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (REP), secuencia de consenso intergénica repetitiva de enterobacteriáceas (ERIC), elementos extragénicos repetitivos de *Neisseria* (Ngrep), elementos extragénicos repetitivos de *Deinococcus* (Drrep) y cualquier combinación de los mismos.

25 66. Procedimiento según la reivindicación 64, en el que los iniciadores están compuestos aproximadamente por entre 10 y 29 nucleótidos.

67. Procedimiento según la reivindicación 64, en el que los iniciadores están compuestos por entre 15 y 25 nucleótidos.

30 68. Procedimiento según la reivindicación 64, en el que la secuencia repetitiva es REP y un miembro del par de iniciadores se selecciona a partir del grupo formado por SEC. ID. NOS. 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 y 34, y el otro miembro del par se selecciona a partir del grupo formado por SEC. ID. NOS. 7, 8, 9, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 y 35.

35 69. Procedimiento según la reivindicación 64, en el que la secuencia repetitiva es ERIC y un miembro del par de iniciadores se selecciona a partir del grupo formado por SEC. ID. NOS. 38, 39, 40 y 41; y el otro miembro del par se selecciona a partir del grupo formado por SEC. ID. NOS. 42, 43, 44 y 45.

40 70. Procedimiento según la reivindicación 64, en el que la secuencia repetitiva es Ngrep y un miembro del par de iniciadores se selecciona a partir del grupo formado por SEC. ID. NOS. 48, 49, 50 y 51; y el otro miembro del par se selecciona a partir del grupo formado por 52, 53, 54 y 55.

71. Procedimiento según la reivindicación 64, en el que los iniciadores son SEC. ID. NO. 4 y SEC. ID. NO. 7.

45 72. Procedimiento según la reivindicación 64, en el que la secuencia repetitiva es ERIC y los iniciadores son SEC. ID. NO. 38 y SEC. ID. NO. 42.

50 73. Procedimiento según la reivindicación 64, en el que la secuencia repetitiva es Ngrep y los iniciadores son SEC. ID. NO. 48 y SEC. ID. NO. 52.

74. Procedimiento según la reivindicación 64, en el que la secuencia repetitiva es Drrep y el iniciador es SEC. ID. NO. 56 o SEC. ID. NO. 57.

55 75. Procedimiento según la reivindicación 64, en el que se añaden una pluralidad de pares y en el que cada par se une a una secuencia repetitiva distinta.

60 76. Procedimiento según la reivindicación 75, en el que los iniciadores se unen a secuencias repetitivas del ADN seleccionadas a partir del grupo formado por REP, ERIC, Ngrep, Drrep y cualquier combinación de los mismos.

77. Procedimiento según la reivindicación 75, en el que los iniciadores son las SEC. ID. NOS. 4, 7, 38 y 42.

## ES 2 152 933 T3

78. Procedimiento según la reivindicación 64, en el que el ADN se extrae de las bacterias antes de añadir los iniciadores.

5 79. Procedimiento según la reivindicación 64, en el que la etapa de separación incluye la electroforesis en gel de los productos de extensión.

80. Procedimiento según la reivindicación 79, en el que los productos de extensión se tiñen con bromuro de etidio.

10 81. Procedimiento según la reivindicación 64, en el que los iniciadores son marcados y la fase de determinación incluye la medición del patrón de marcado.

15 82. Procedimiento según la reivindicación 64, en el que la etapa de separación incluye la cromatografía de los productos de extensión.

83. Procedimiento según la reivindicación 82, en el que los iniciadores son marcados.

84. Procedimiento según la reivindicación 82, en el que el marcador es una sustancia fluorescente.

20 85. Procedimiento según la reivindicación 83, en el que la muestra contiene una pluralidad de bacterias y en el que cada cepa bacteriana específica se distingue por su único patrón de tamaño de los productos de extensión.

25 86. Procedimiento según la reivindicación 85, en el que la muestra se selecciona a partir del grupo formado por sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, tejidos, escobillón vaginal, heces, líquido amniótico o lavado bucal.

87. Procedimiento según la reivindicación 86, en el que la muestra es humana o de un animal.

30 88. Procedimiento según la reivindicación 85, en el que la muestra de ensayo es una muestra agrícola, de alimentos, del entorno u hortícola.

89. Procedimiento según la reivindicación 64 para el diagnóstico de una enfermedad bacteriana, en el que la muestra se recoge de un individuo del que se sospecha que padece una enfermedad bacteriana.

35 90. Procedimiento según la reivindicación 89, en el que el sujeto es un hombre, un animal o una planta.

40 91. Procedimiento según la reivindicación 64 para supervisar la contaminación bacteriana en un entorno, en el que la muestra se recoge de una fuente medioambiental de la que se sospecha que está contaminada.

92. Procedimiento según la reivindicación 91, en el que la fuente medioambiental es un líquido, barro, una planta de tratamiento o el suelo.

45 93. Procedimiento según la reivindicación 64 para supervisar la contaminación bacteriana de los alimentos, en el que la muestra se recoge de los alimentos de los que se sospecha que están contaminados.

50 94. Procedimiento según la reivindicación 93, en el que el alimento es una fórmula infantil, pescado, productos recién preparados o alimentos procesados.

95. Procedimiento según la reivindicación 64 para la supervisión de una población bacteriana en un sitio de biorreparación, en el que la muestra se recoge de dicho sitio.

55 96. Procedimiento según la reivindicación 95, en el que la muestra es suelo, líquido, barro o es de bacterias que se han añadido al sitio.

97. Procedimiento según la reivindicación 64 para la supervisión de una muestra hortícola, en el que la muestra se recoge de una fuente hortícola que va a ensayarse.

60 98. Procedimiento según la reivindicación 64 para la supervisión de una muestra agrícola, en el que la muestra se recoge de una fuente agrícola que va a ensayarse.

## ES 2 152 933 T3

99. Procedimiento según la reivindicación 64 para la supervisión de añadidos bacterianos a un entorno agrícola, en el que la muestra se recoge de una fuente agrícola que va a ensayarse.

100. Procedimiento según la reivindicación 99, en el que la muestra es un líquido, suelo, de una planta  
5 o de un animal.

101. Procedimiento según la reivindicación 64 para supervisar los procedimientos de fabricación en cuanto a las bacterias, en el que la muestra se recupera a partir del procedimiento que va a ensayarse.

102. Procedimiento según la reivindicación 101, en el que la muestra se selecciona a partir del grupo  
10 formado por procedimientos de fabricación de medicamentos, procedimientos de fermentación, procedimientos de síntesis mediados por microorganismos, procedimientos químicos de fabricación y procedimientos de fabricación de alimentos.

103. Procedimiento según la reivindicación 64 para asegurar la calidad/control de calidad de los ensayos de laboratorio que implican ensayos microbiológicos, en el que la muestra se recupera a partir del  
15 stock bacteriano que va a ensayarse.

104. Procedimiento según la reivindicación 64 para rastrear el comienzo de infecciones bacterianas, en el que la muestra se recoge de un organismo que va a ensayarse.  
20

105. Procedimiento para diferenciar entre cepas de la misma especie de bacteria en una muestra de ensayo, que comprende las etapas siguientes:

25 amplificación del ADN en dicha bacteria añadiendo a dicha muestra de ensayo una pluralidad de pares de iniciadores dirigidos al exterior, hibridizándose cada par de dichos iniciadores a distintas secuencias entremezcladas no codificantes repetitivas del ADN en el ADN bacteriano y prolongándose cada par hacia el exterior desde una secuencia repetitiva hibridizable a otra secuencia repetitiva hibridizable y en el que cada par está marcado de forma distinta;

30 separación de los productos de extensión generados en la etapa de amplificación mediante el tamaño;  
y

35 determinación de la cepa bacteriana específica midiendo el patrón de los productos de extensión clasificados por tamaño, para cada par.

106. Procedimiento según la reivindicación 105, en el que los marcadores son sustancias fluorescentes.

107. Procedimiento según la reivindicación 105, en el que la separación se realiza mediante electroforesis en gel, electroforesis capilar, espectrometría de masas o cromatografía.

40 108. Procedimiento según la reivindicación 105, en el que los pares de iniciadores se unen a secuencias de ADN seleccionadas a partir del grupo formado por REP, ERIC, Ngrep, Drrep y cualquier combinación de los mismos.

45 109. Equipo para la determinación de la identidad de una cepa bacteriana, que comprende un contenedor que incluye pares de iniciadores PCR dirigidos hacia el exterior para secuencias ADN repetitivas, no codificantes y entremezcladas en bacterias.

50 110. Equipo según la reivindicación 109, en el que los pares de iniciadores PCR se seleccionan del grupo formado por SEC. ID. NOS. 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, 31, 32, 33, 34, 35, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56 y 57 y cualquier combinación de las mismas.

55 111. Procedimiento según la reivindicación 64 ó 105, en el que la muestra sanguínea se ensaya en cuanto a la contaminación bacteriana y la muestra es sangre almacenada o sangre utilizada para transfusiones.

112. Procedimiento según la reivindicación 111, en el que la muestra se ensaya en cuanto a la especie específica bacteriana *Yersinia enterocolitica*.

60 113. Procedimiento para identificar una cepa de la misma especie bacteriana, que comprende las etapas siguientes:

amplificación del ADN entre secuencias repetitivas, no codificantes y entremezcladas en una muestra que contiene tales bacterias, añadiendo a dicha muestra un iniciador, en el que dicho iniciador hibridiza a la secuencia repetitiva en cualquiera de las cadenas complementarias del ADN y en el que el iniciador hibridizado se prolonga desde una secuencia repetitiva a través de ADN no repetitivo a otra secuencia repetitiva, y en el que dicho producto de extensión se hibridiza al iniciador para la generación de otros productos de extensión;

separación de los productos de extensión mediante el tamaño; y  
 10 determinación de la cepa bacteriana específica midiendo el patrón de los productos de extensión clasificados por tamaño.

114. Procedimiento para la identificación automática de una especie bacteriana, que comprende las etapas siguientes:

15 añadir bacterias e iniciadores PCR dirigidos hacia el exterior, a una muestra de ensayo en un instrumento de auto-PCR, en el que dichos iniciadores son capaces de hibridizarse a la secuencia no codificante, repetitiva y entremezclada del ADN en el ADN bacteriano y de propagarse hacia el exterior a partir de la secuencia repetitiva hibridizable a otra secuencia repetitiva hibridizable;

20 transferir los productos de extensión a partir del ensayo PCR y separarlos;  
 medir el patrón del tamaño de dichos productos de extensión separados, con un medio de medición; y  
 25 reconocer e identificar el patrón de tamaño a través de medios informáticos.

115. Procedimiento según la reivindicación 114, en el que los elementos de medición se seleccionan a partir del grupo formado por un lector de código de barras, un lector de láser, un digitalizador, un fotómetro y un lector de fluorescencia.

30 116. Procedimiento según la reivindicación 114, en el que los productos de extensión se separan mediante cromatografía o electroforesis en gel.

117. Procedimiento según la reivindicación 114, en el que una muestra de amplificación PCR se aplica a un gel y se realiza la electroforesis; el patrón de tamaño se lee mediante un elemento de medición; y se compara a través de medios informáticos con los patrones bacterianos almacenados conocidos.

118. Procedimiento según la reivindicación 114, en el que los productos de extensión separados se tiñen mediante bromuro de etidio antes de proceder a la lectura.

40 119. Procedimiento según la reivindicación 114, en el que los iniciadores son marcados.

120. Procedimiento según la reivindicación 114, en el que los iniciadores se marcan con una sustancia fluorescente.

45

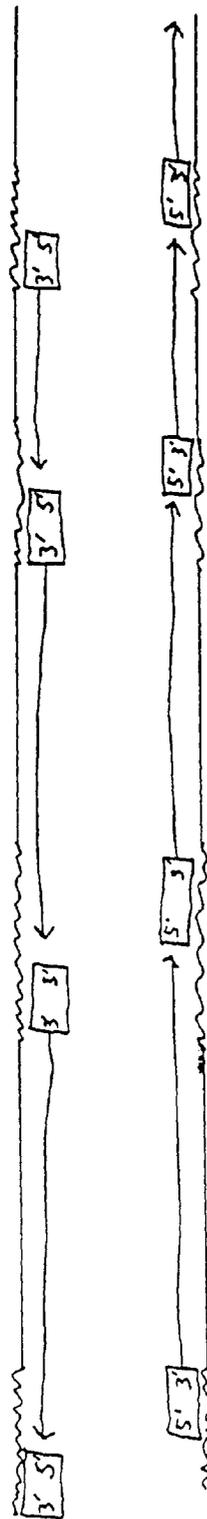
50

---

**NOTA INFORMATIVA:** Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

60 Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

---



———— = Secuencia no repetitiva

~~~~~ = Secuencia repetitiva

5' 3' = Iniciador

FIGURA 1



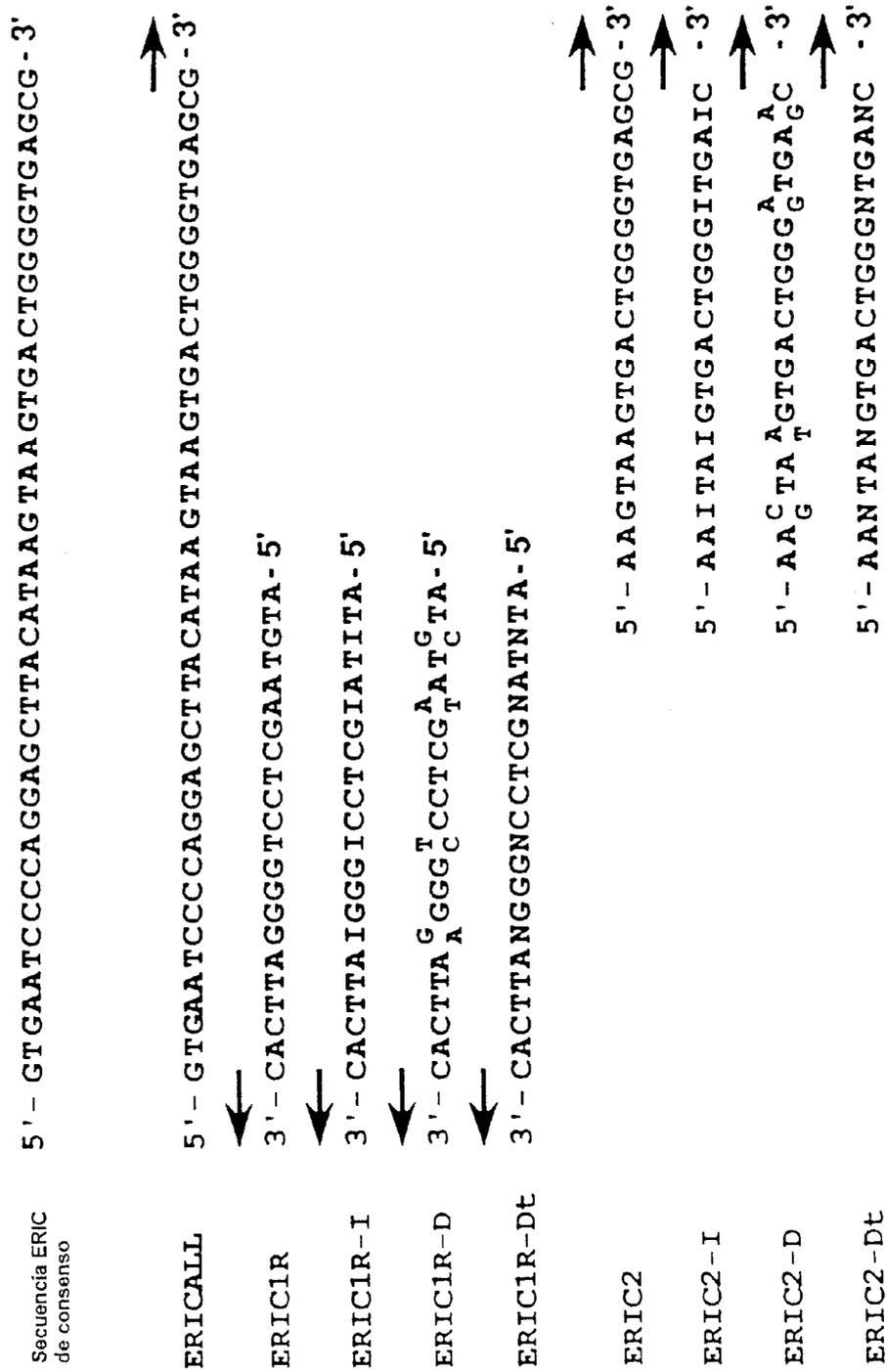


FIGURA 3

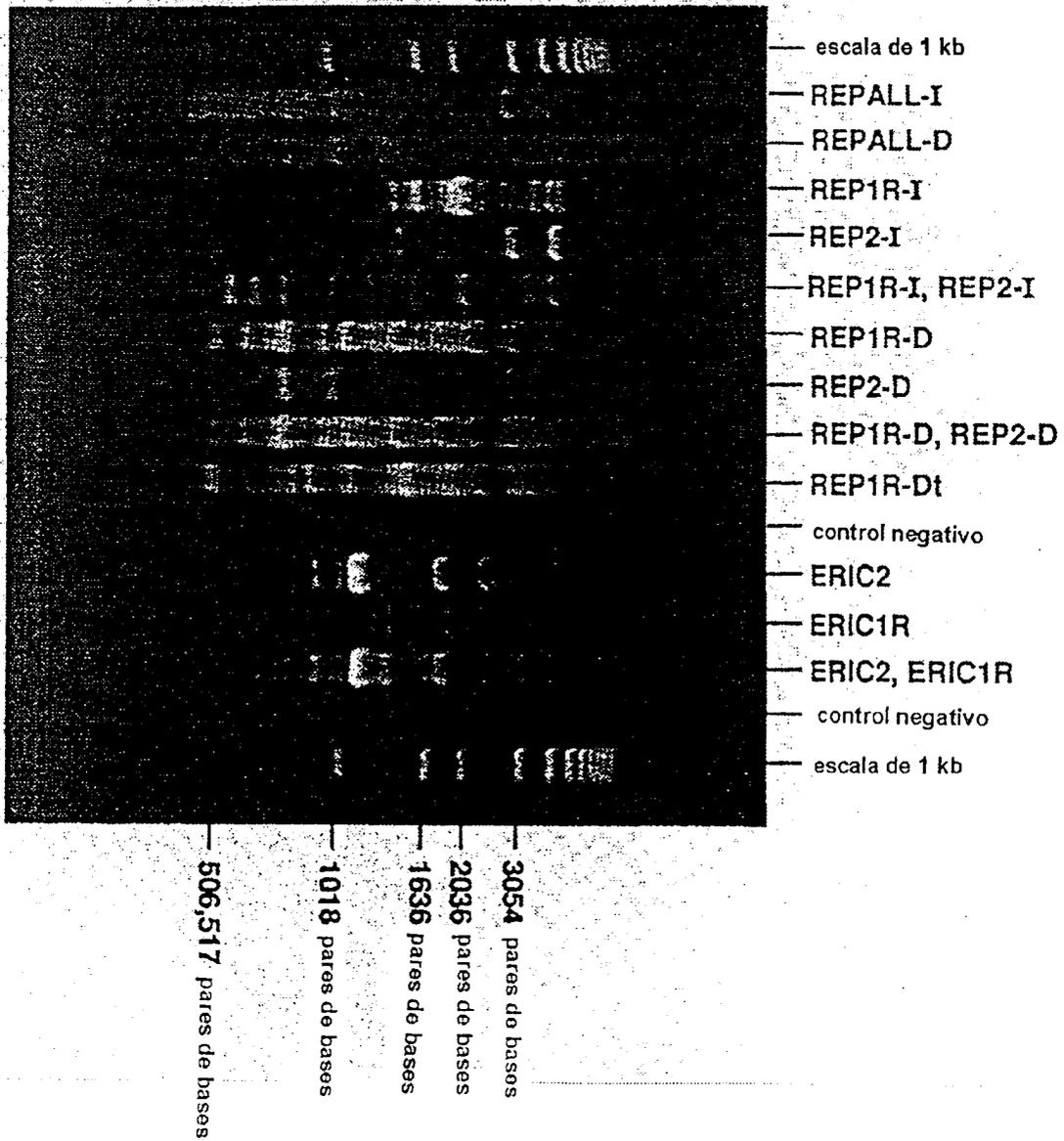


FIGURA 4

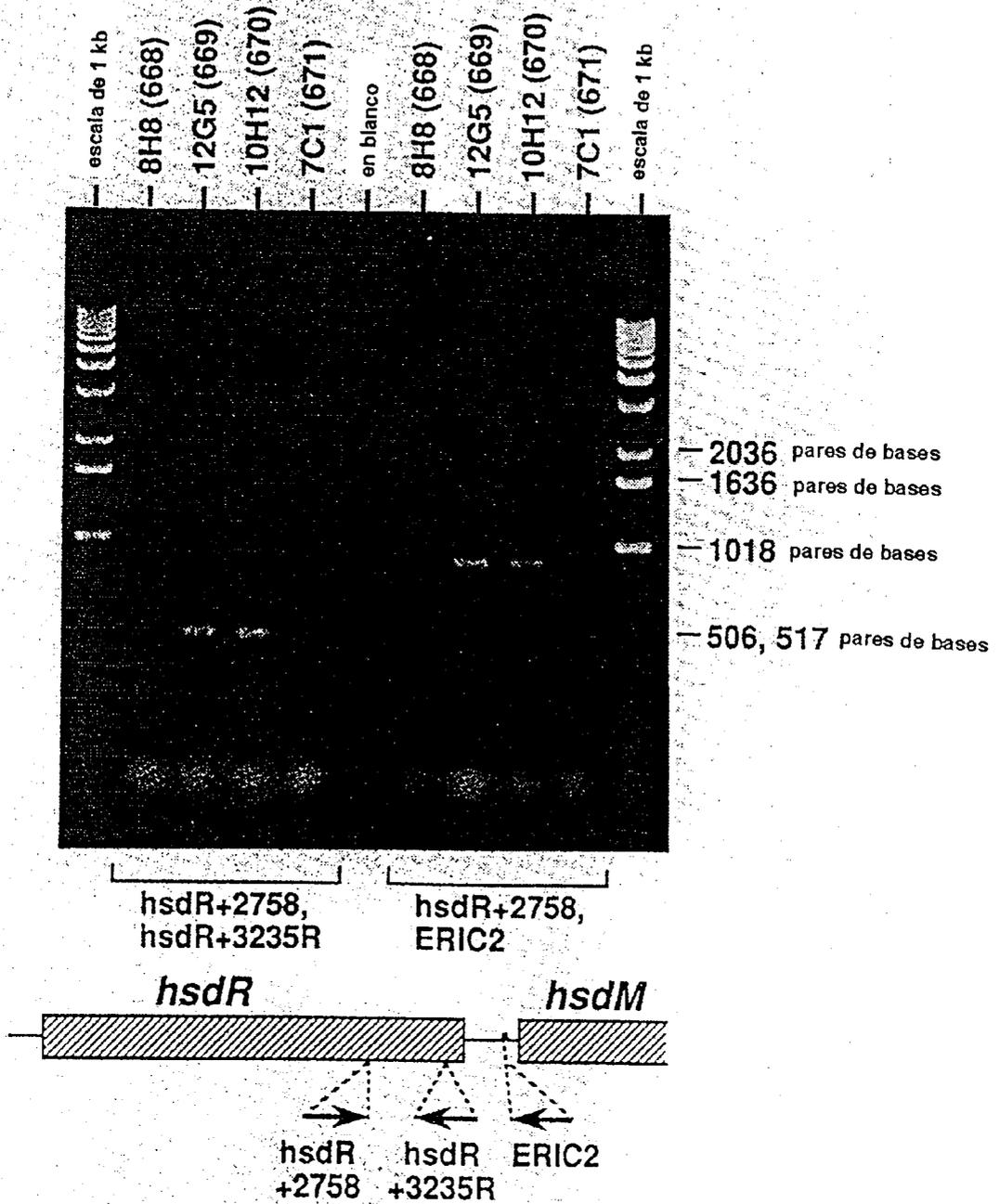


FIGURA 5

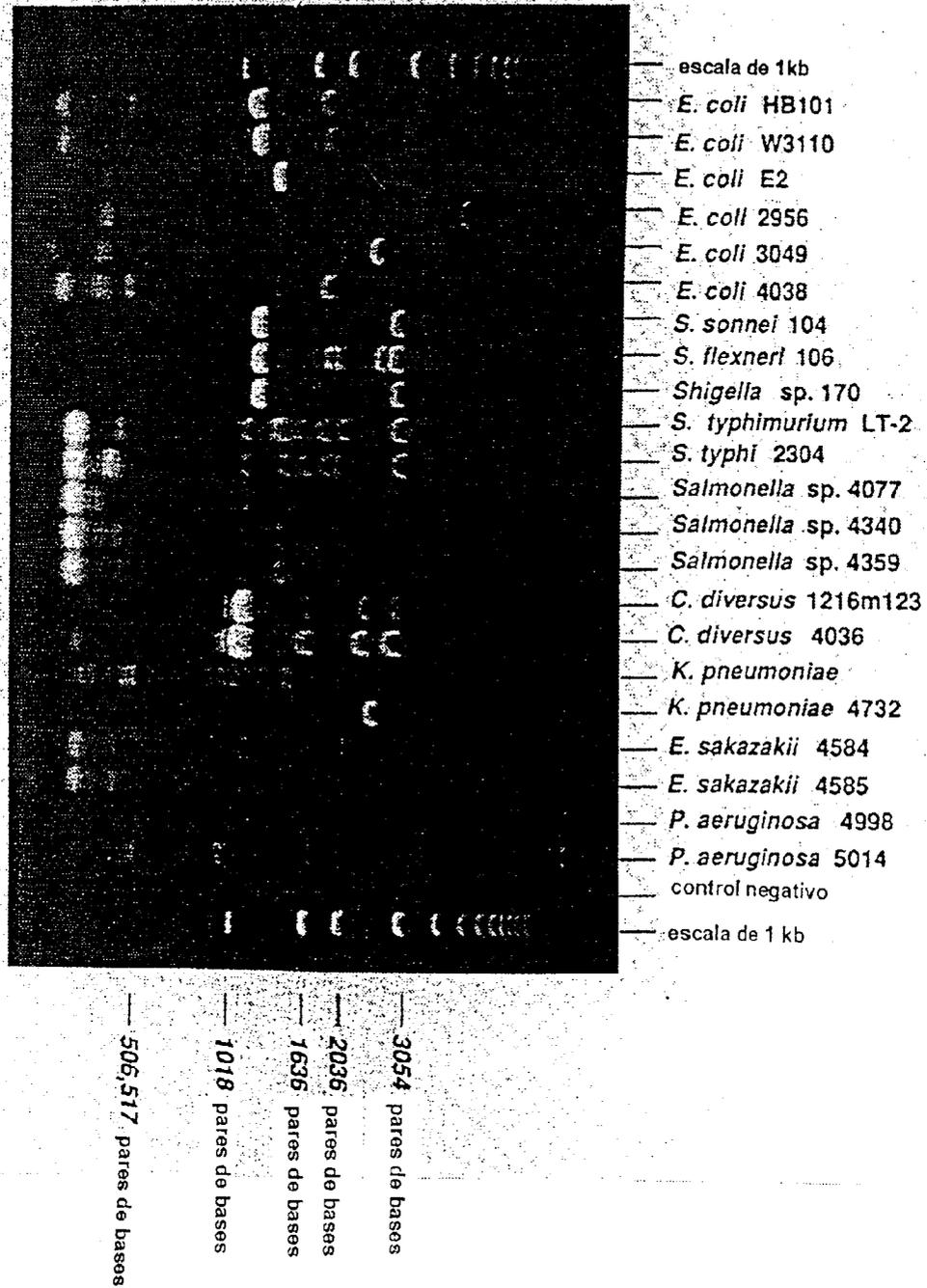


FIGURA 6

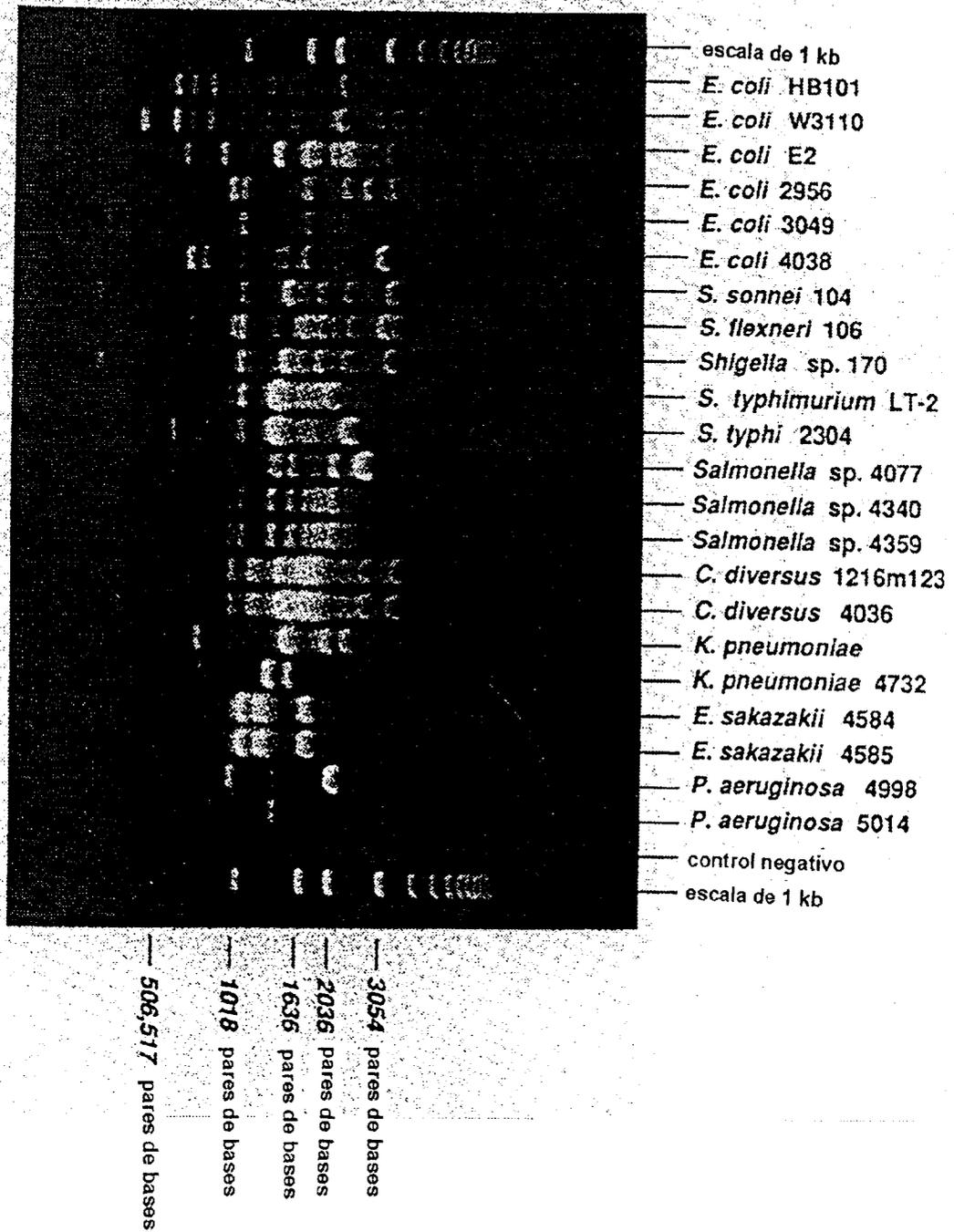


FIGURA 7

- |                                      |                                           |                                        |
|--------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------|
| 1. <i>Rhodobacter sphaeroides</i>    | 2. <i>Rhizobium meliloti</i>              | 3. <i>Neisseria gonorrhoeae</i>        |
| 4. <i>Neisseria meningitidis</i>     | 5. <i>Sphaerotilus</i> sp.                | 6. <i>E. coli</i> HB101                |
| 7. <i>E. coli</i> W3110              | 8. <i>Salmonella</i> sp.                  | 9. <i>Citrobacter diversus</i>         |
| 10. <i>Klebsiella pneumoniae</i>     | 11. <i>Enterobacter sakazakii</i>         | 12. <i>Serratia marcescens</i>         |
| 13. <i>Proteus vulgaris</i>          | 14. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>         | 15. <i>Xanthomonas manihoti</i>        |
| 16. <i>Vibro vulnificus</i>          | 17. <i>Myxococcus xanthus</i>             | 18. <i>Arthrobacter luteus</i>         |
| 19. <i>Nocardia otitidiscaviarum</i> | 20. <i>Streptomyces albus</i> G           | 21. <i>Mycobacterium aurum</i>         |
| 22. <i>Bacillus subtilis</i>         | 23. <i>Listeria monocytogenes</i>         | 24. <i>Staphylococcus aureus</i>       |
| 25. <i>Streptococcus pneumoniae</i>  | 26. Group B <i>Streptococcus</i>          | 27. <i>Caryophanon latum</i>           |
| 28. <i>Mycoplasma pneumoniae</i>     | 29. <i>Anabaena</i> sp.                   | 30. <i>Borrelia burgdorferi</i>        |
| 31. <i>Treponema pallidum</i>        | 32. <i>Treponema phagedenis</i>           | 33. <i>Bacteroides fragilis</i>        |
| 34. <i>Fusobacterium nucleatum</i>   | 35. <i>Flavobacterium meningosepticum</i> | 36. <i>Flavobacterium okeanokoltes</i> |
| 37. <i>Deinococcus radiophilus</i>   | 38. <i>Thermus aquaticus</i>              | 39. <i>Thermus thermophilus</i>        |
| 40. <i>Herpetosiphon giganteus</i>   | 41. <i>Halobacterium halobium</i>         | 42. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>    |
| 43. <i>Schizosaccharomyces pombe</i> | 44. <i>Candida parapsilosis</i>           | 45. <i>Homo sapiens</i>                |

FIGURA 8A

ES 2 152 933 T3

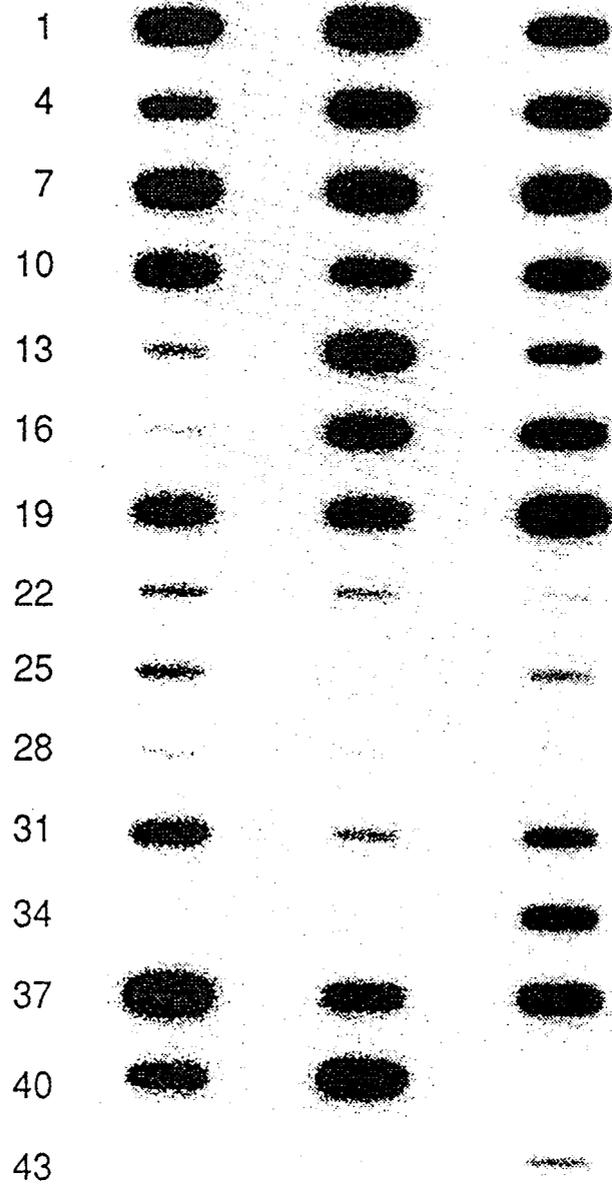


FIGURA 8B

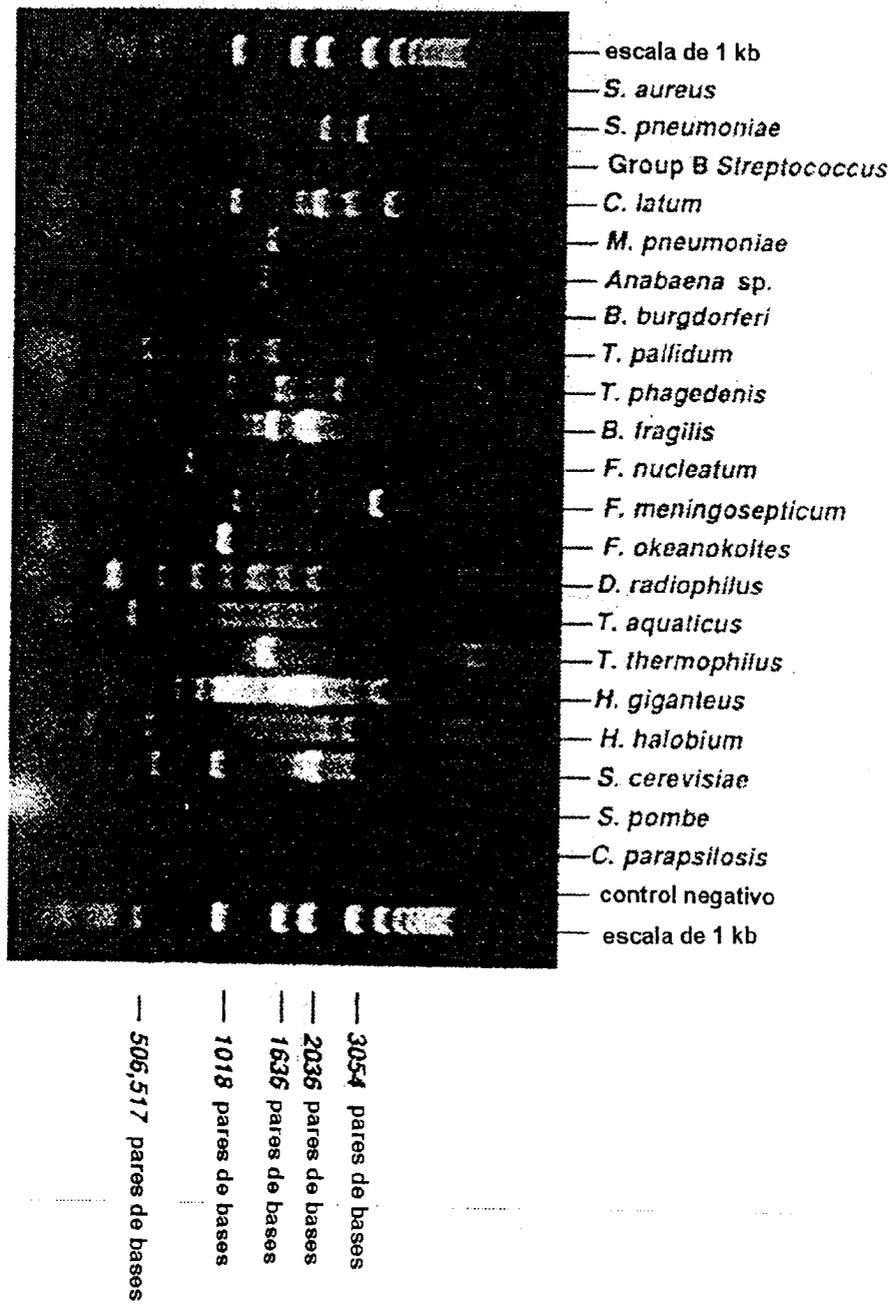


FIGURA 9A

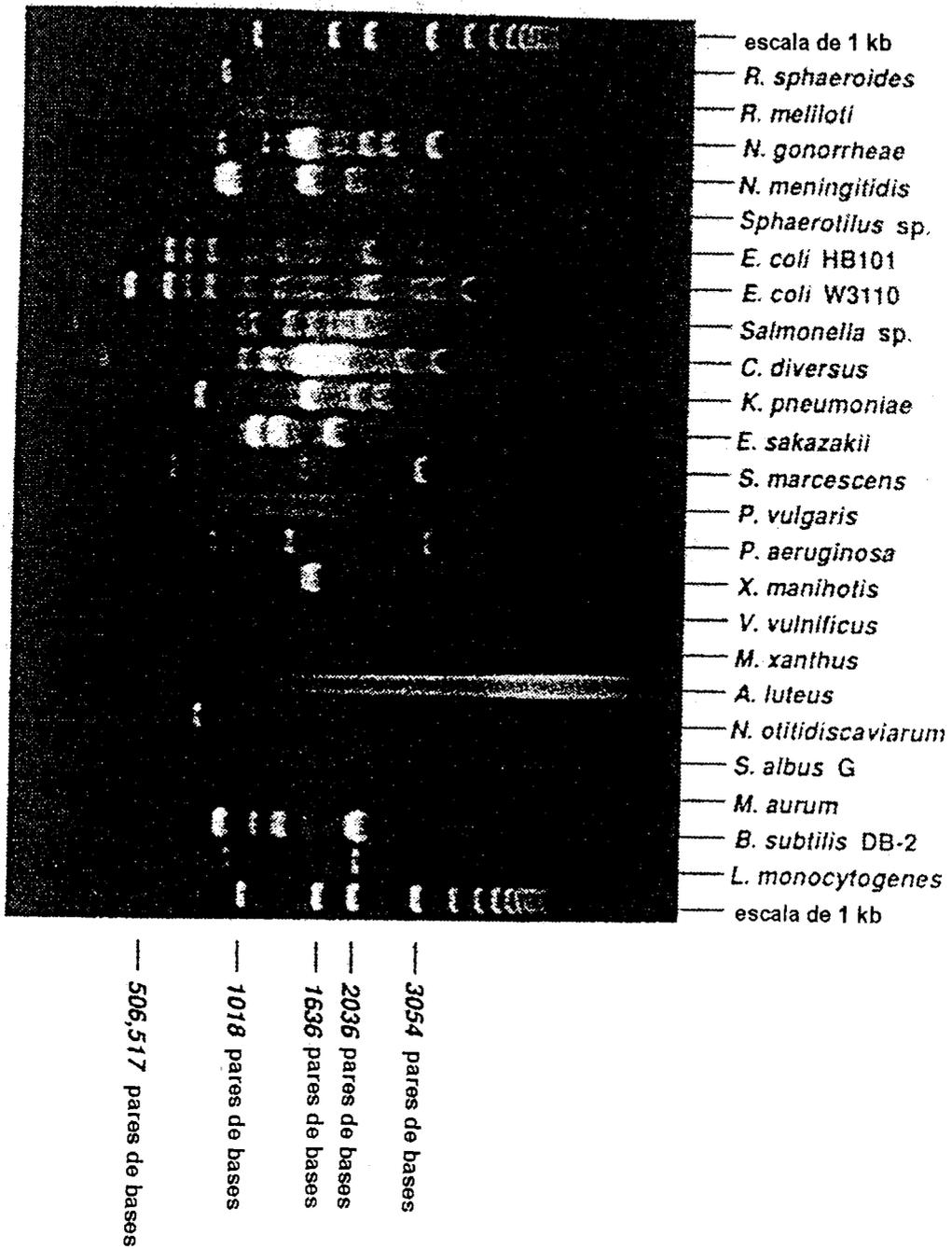


FIGURA 9B

- |                                      |                                           |                                        |
|--------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------|
| 1. <i>Rhodobacter sphaeroides</i>    | 2. <i>Rhizobium melloti</i>               | 3. <i>Neisseria gonorrhoeae</i>        |
| 4. <i>Neisseria meningitidis</i>     | 5. <i>Sphaerotilus</i> sp.                | 6. <i>E. coli</i> HB101                |
| 7. <i>E. coli</i> W3110              | 8. <i>Salmonella</i> sp.                  | 9. <i>Citrobacter diversus</i>         |
| 10. <i>Klebsiella pneumoniae</i>     | 11. <i>Enterobacter sakazakii</i>         | 12. <i>Serratia marcescens</i>         |
| 13. <i>Proteus vulgaris</i>          | 14. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>         | 15. <i>Xanthomonas manihoti</i>        |
| 16. <i>Vibro vulnificus</i>          | 17. <i>Myxococcus xanthus</i>             | 18. <i>Arthrobacter luteus</i>         |
| 19. <i>Nocardia otitidiscaviarum</i> | 20. <i>Streptomyces albus</i> G           | 21. <i>Mycobacterium aurum</i>         |
| 22. <i>Bacillus subtilis</i>         | 23. <i>Listeria monocytogenes</i>         | 24. <i>Staphylococcus aureus</i>       |
| 25. <i>Streptococcus pneumoniae</i>  | 26. Group B <i>Streptococcus</i>          | 27. <i>Caryophanon latum</i>           |
| 28. <i>Mycoplasma pneumoniae</i>     | 29. <i>Anabaena</i> sp.                   | 30. <i>Borrelia burgdorferi</i>        |
| 31. <i>Treponema pallidum</i>        | 32. <i>Treponema phagedenis</i>           | 33. <i>Bacteroides fragilis</i>        |
| 34. <i>Fusobacterium nucleatum</i>   | 35. <i>Flavobacterium meningosepticum</i> | 36. <i>Flavobacterium okeanokoites</i> |
| 37. <i>Deinococcus radiophilus</i>   | 38. <i>Thermus aquaticus</i>              | 39. <i>Thermus thermophilus</i>        |
| 40. <i>Herpetosiphon giganteus</i>   | 41. <i>Halobacterium halobium</i>         | 42. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>    |
| 43. <i>Schizosaccharomyces pombe</i> | 44. <i>Candida parapsilosis</i>           | 45. <i>Homo sapiens</i>                |

FIGURA 10A

ES 2 152 933 T3

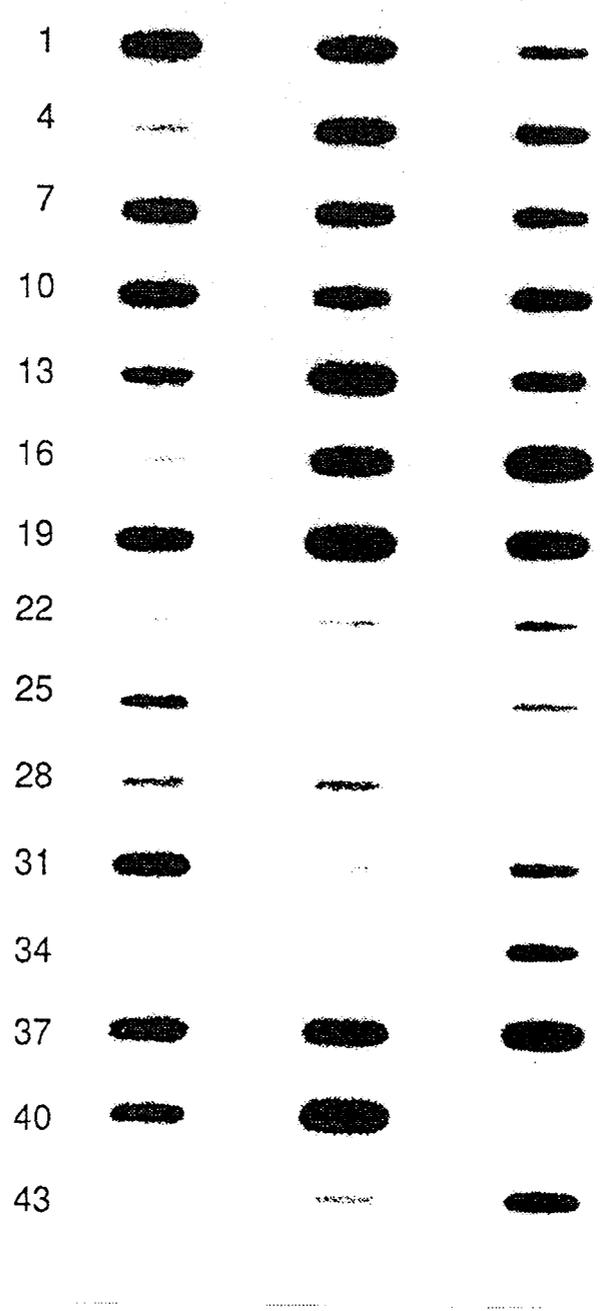


FIGURA 10B

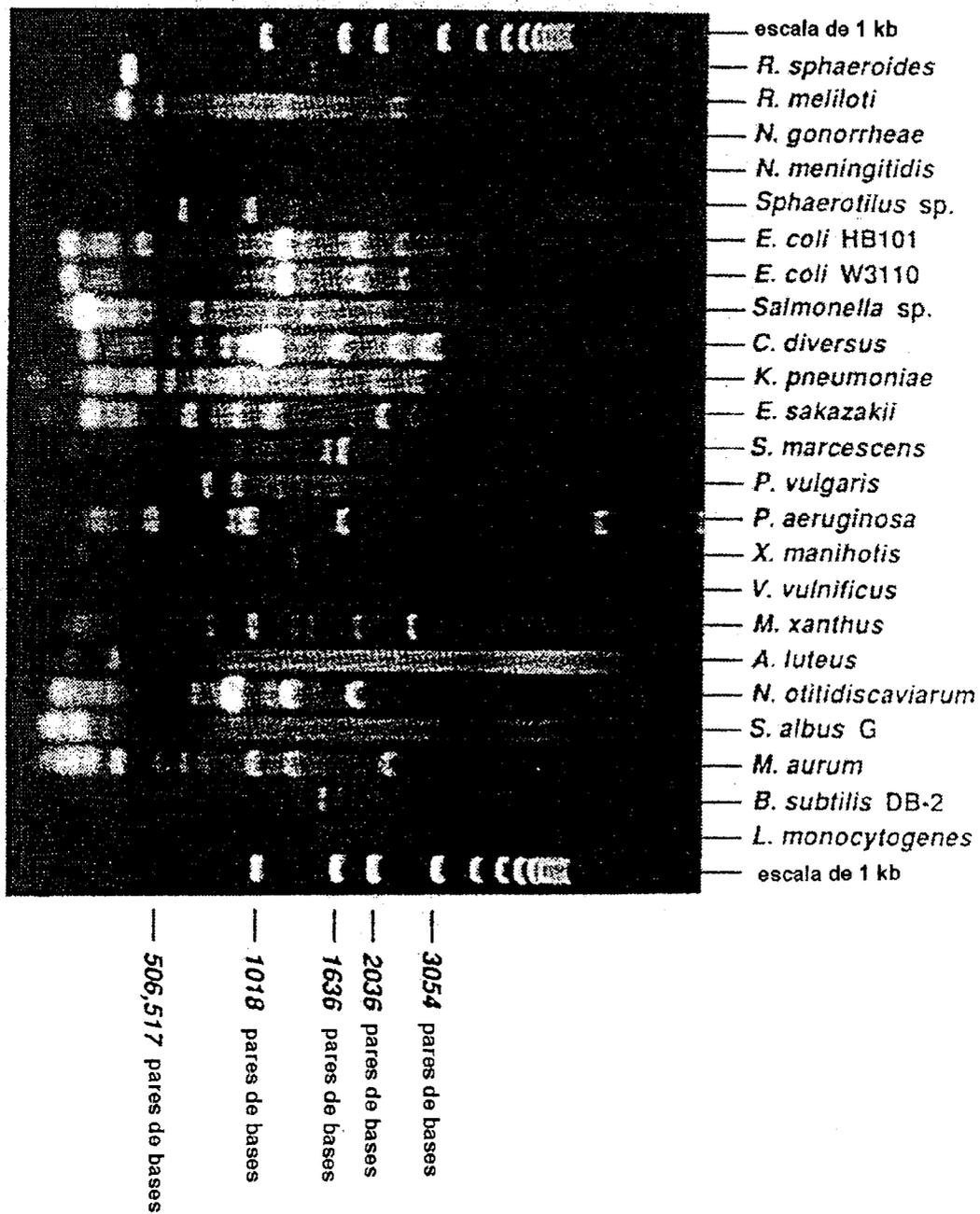


FIGURA 11A

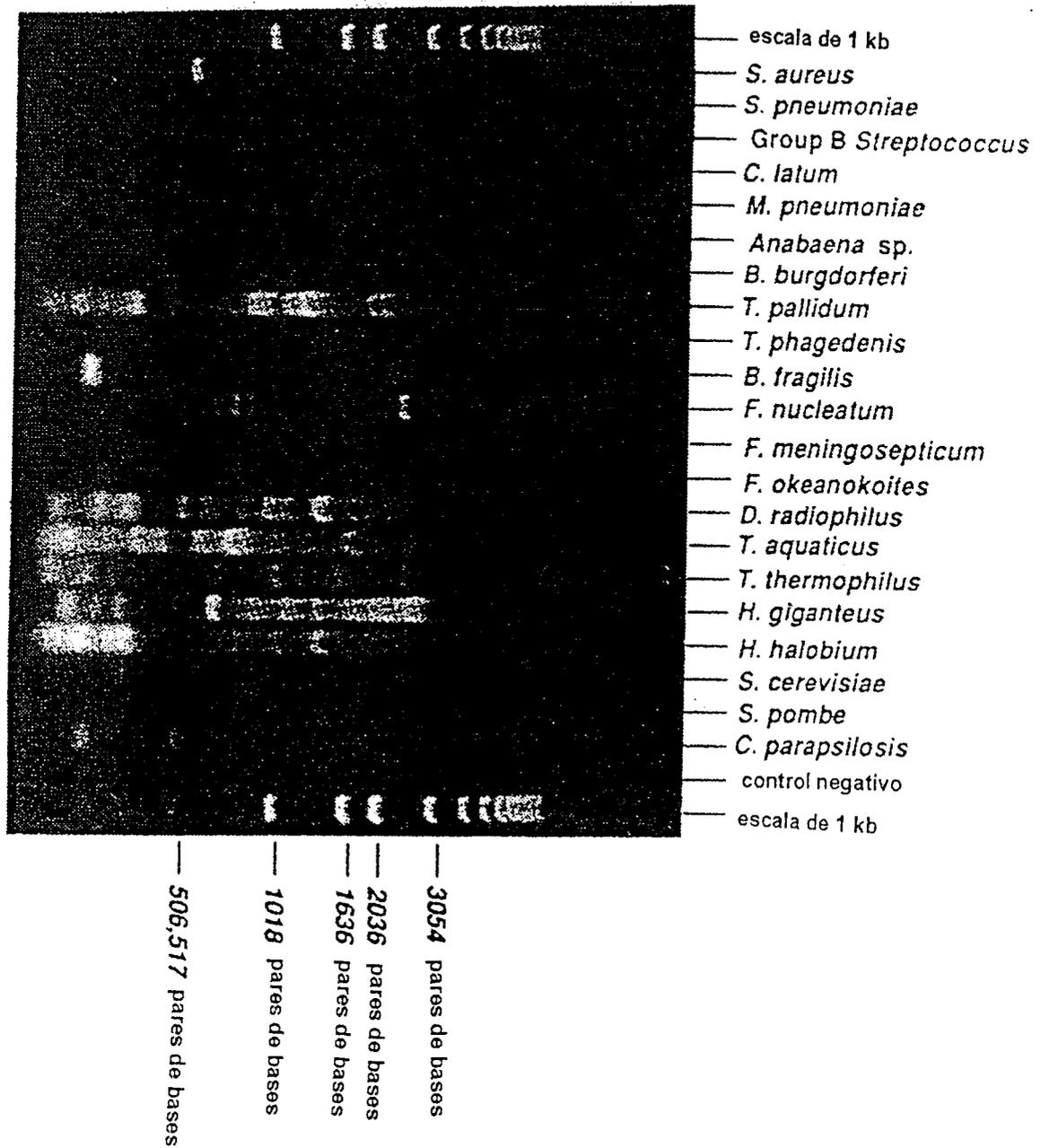


FIGURA 11B

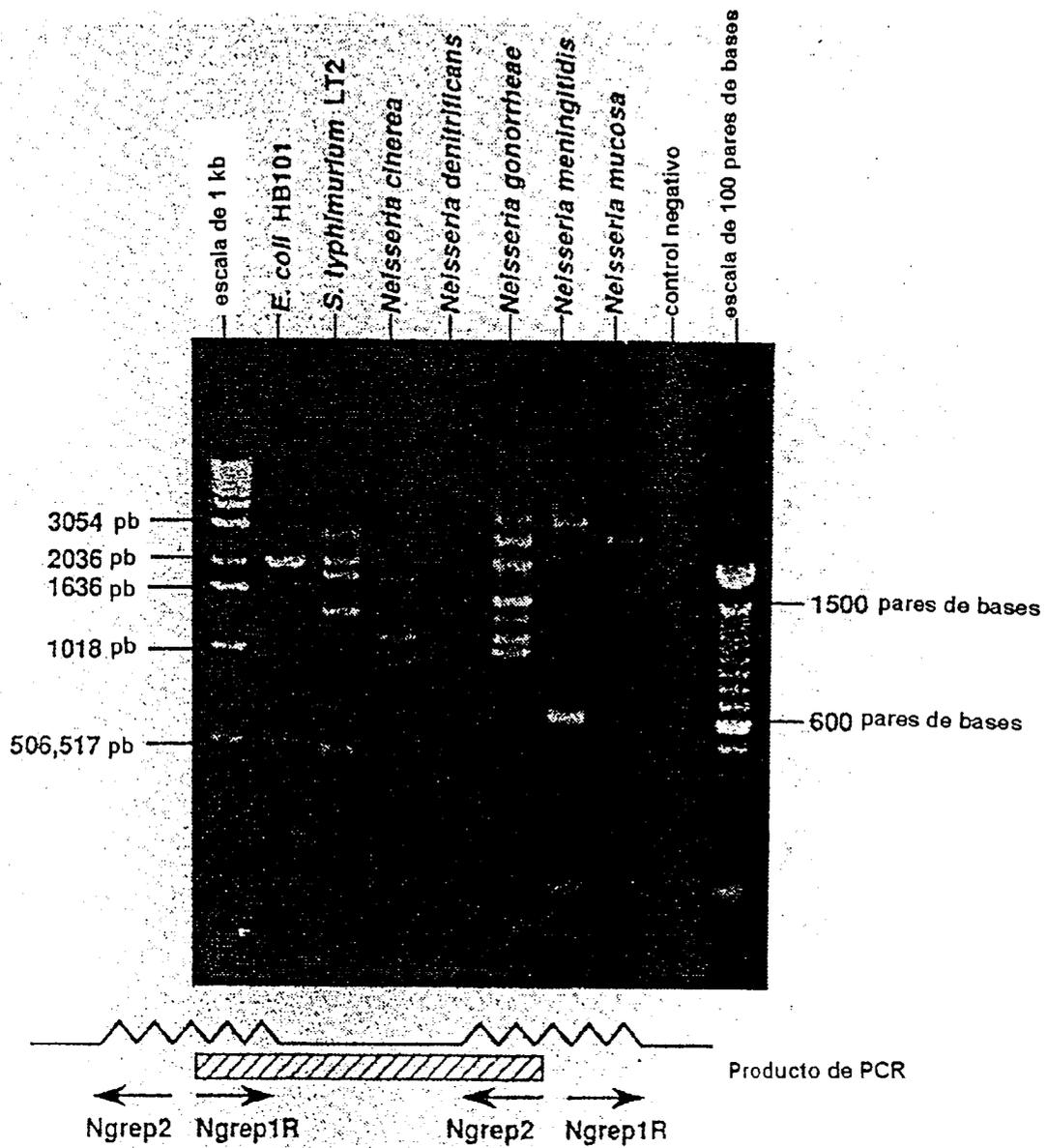


FIGURA 12

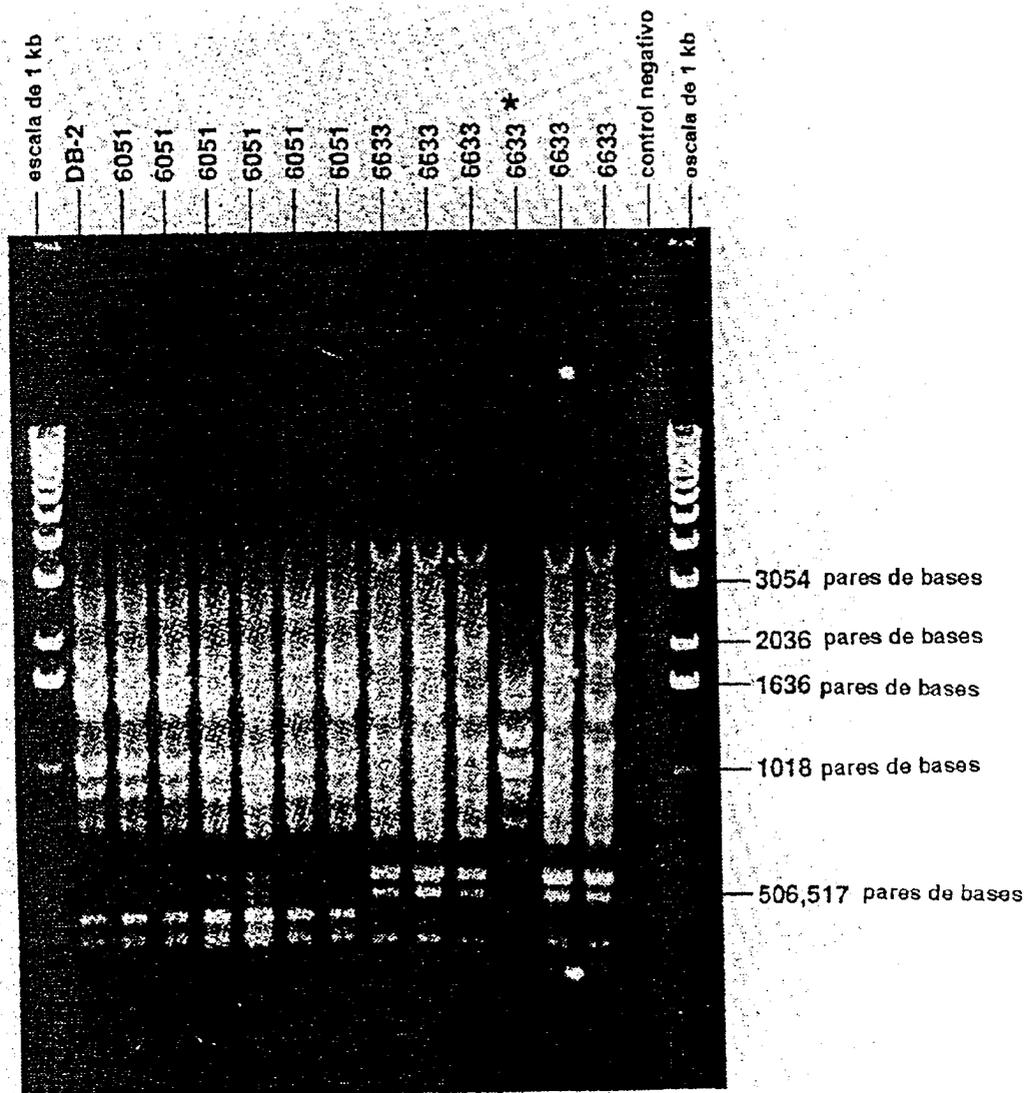


FIGURA 13

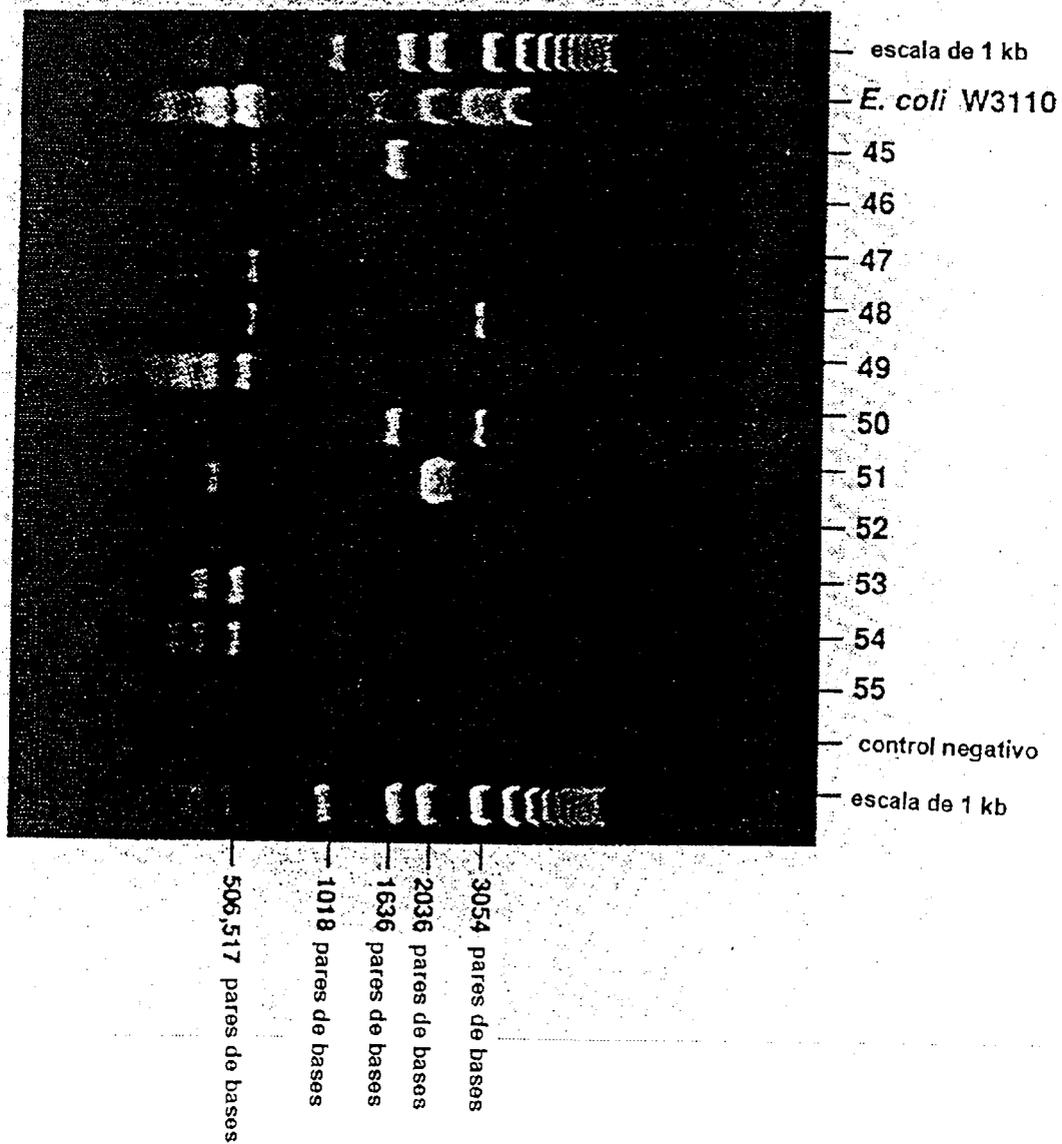


FIGURA 14

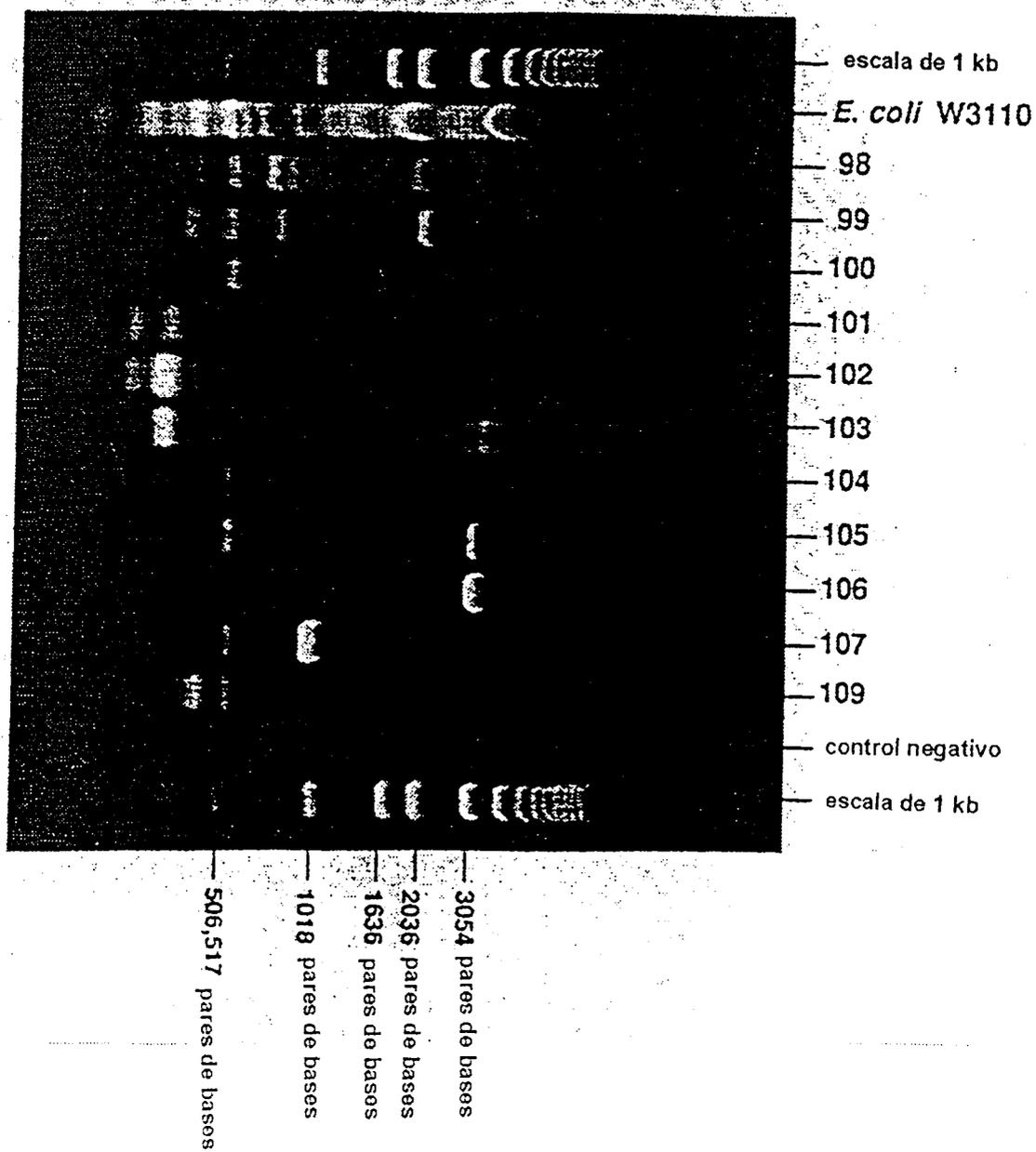


FIGURA 15