



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 285 211**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03775414 .0**
86 Fecha de presentación : **19.11.2003**
87 Número de publicación de la solicitud: **1565573**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **24.08.2005**

54 Título: **Sondas de ácido nucleico y cebadores de amplio intervalo de regiones en los genes de la topoisomerasa, y métodos en los que se usan.**

30 Prioridad: **19.11.2002 FI 20022064**

73 Titular/es: **Mobidiag Oy**
Haartmanninkatu 8
00290 Helsinki, FI

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

72 Inventor/es: **Roth, Stina;**
Jalava, Jari y
Nikkari, Simo

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

74 Agente: **Ungría López, Javier**

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

DESCRIPCIÓN

Sondas de ácido nucleico y cebadores de amplio intervalo de regiones en los genes de la topoisomerasa, y métodos en los que se usan.

Campo de la invención

La invención se refiere a sondas de ácido nucleico y a cebadores de amplio intervalo que son útiles en la identificación de especies bacterianas y el diagnóstico de infecciones bacterianas. Especialmente, la invención se refiere a sondas de ácido nucleico específicas que se originan a partir de regiones hipervariables situadas cerca de las secuencias conservadas de los genes de la topoisomerasa de bacterias que causan infecciones. La invención también se refiere a cebadores de amplio intervalo que se originan a partir de las regiones conservadas de genes de la topoisomerasa. Además, la invención se refiere al uso de estas sondas de ácido nucleico y cebadores de amplio intervalo en el diagnóstico de infecciones bacterianas así como a métodos de diagnóstico en los que se usan estas sondas de ácido nucleico y cebadores de amplio intervalo.

Antecedentes de la invención

Las infecciones del tracto respiratorio son la causa más común de las visitas al médico. En Finlandia, se diagnostican anualmente aproximadamente 13 casos de neumonía por 1000 habitantes. La sinusitis maxilar aguda y la otitis se diagnostican incluso más frecuentemente. Por ejemplo, se estima que la otitis representa anualmente aproximadamente 200.000 casos en Finlandia (principalmente diagnosticado en niños). Las infecciones del tracto respiratorio cargan el sistema de asistencia sanitaria y causan gastos significativos a la sociedad. Los costes exactos atribuibles a infecciones del tracto respiratorio son difíciles de calcular, porque la mayoría de estos costes constan de los llamados costes indirectos, tales como ausencia del trabajo (Rautakorpi *et al.*, Scandinavian Journal of Infectious Diseases. 33 (12): 920-6, 2001, Infektiotaudit, ed. Eskola, Houvinen ja Valtonen 1998). En el mundo, las infecciones del tracto respiratorio son responsables de la muerte de millones de personas, principalmente niños.

Además de los virus, las infecciones del tracto respiratorio están causadas por una diversidad de especies bacterianas: *Streptococcus pyogenes* (estreptococos del grupo A) es un agente causante importante de la tonsilitis. El riesgo de complicaciones graves, tales como abscesos peritonsilares, está conectado a tonsilitis no tratada. Además, las secuencias de la tonsilitis causada por *S. pyogenes* incluyen fiebre reumática y glomerulonefritis que son enfermedades graves, incluso fatales. Los agentes causantes más importantes de la neumonía en pacientes externos son *Streptococcus pneumoniae* (neumococos), *Mycoplasma pneumoniae*, y *Chlamydia pneumoniae* de las que los neumococos es el patógeno más común y grave que causa neumonía. Especies bacterianas que causan neumonía menos frecuentes son *Legionella pneumophila* y *Coxiella burnetii*. *Mycobacterium tuberculosis*, por otro lado, causa tuberculosis pulmonar. Además, la neumonía causada por especies raras de *Mycobacterium* y *Nocardia* se diagnostica en pacientes inmunodeficientes. Además de neumococos, los agentes causantes de la sinusitis maxilar y la inflamación del oído medio (otitis media) incluyen *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*. *Alloicoccus otitidis* también causa otitis, aunque menos frecuentemente.

Actualmente el diagnóstico de infecciones bacterianas del tracto respiratorio se basa principalmente en el ensayo de cultivo bacteriano. El ensayo de cultivo bacteriano es, sin embargo, relativamente lento, y los métodos de diagnósticos basados en cultivo habitualmente dan resultados solamente días, a veces hasta semanas después del muestreo. Además, el cultivo de bacterias no siempre es satisfactorio en condiciones de laboratorio. Esto puede ser una consecuencia del hecho de que el método de cultivo usado no sea aplicable para la especie bacteriana en cuestión o el hecho de que el paciente haya recibido terapia antimicrobiana antes de que se haya tomado la muestra. En el diagnóstico de la faringitis, los métodos rápidos basados en la detección de antígenos son buenos métodos suplementarios al ensayo de cultivo bacteriano, pero funcionan solamente con una cantidad limitada de patógenos (estreptococos del grupo A). En el diagnóstico de algunas infecciones bacterianas (por ejemplo, *C. pneumoniae* y *M. pneumoniae*) también pueden usarse métodos serológicos, pero estos métodos dan resultados solamente después de varias semanas desde la aparición de la infección. Por tanto, no hay ayuda en el tratamiento agudo de un paciente.

Los métodos moleculares basados en la amplificación e hibridación de ácidos nucleicos intentan resolver los problemas mencionados anteriormente del ensayo de cultivo bacteriano. Con la ayuda de estos métodos el patógeno se detecta e identifica simultáneamente, produciendo un diagnóstico más rápido y obviando la necesidad de ensayos de cultivo adicionales. Además, los antibióticos no interfieren con los métodos moleculares a tal grado como con los ensayos de cultivo.

Un método molecular usado en el diagnóstico de bacterias es la llamada PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de amplio intervalo que se basa en el uso de cebadores de amplio intervalo. Actualmente los métodos de PCR de amplio intervalo más comunes se basan en el uso de cebadores que reconocen secuencias de ADN conservadas de genes cromosómicos bacterianos que codifican ARN ribosómico (ADNr/ARNr 16S o ADNr/ARNr 23S). En la identificación de bacterias basada en PCR de amplio intervalo la etapa de identificación real se realiza clonando y secuenciando el producto de PCR amplificado. (Véase por ejemplo, el documento EP-B1 613 502, la Patente de Estados Unidos N° 6.001.564 y la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 0020055101).

El método de PCR bacteriana de amplio intervalo se ha aplicado en algún grado al diagnóstico de bacterias clínicas, aunque es más adecuado para la identificación de especies bacterianas y fúngicas de aislados de cultivo, y para este propósito también se han desarrollado ensayos comerciales, tales como MicroSeq (Applied Biosystems). Sin embargo, estos ensayos no se usan ampliamente, porque la secuenciación de productos de PCR consume mucho tiempo y es muy laboriosa. Además, los propios ensayos y el equipo necesario, tales como instrumentos de secuenciación, son caros, y la realización de los ensayos requiere personal especialmente cualificado. Además, en infecciones polimicrobianas pueden necesitarse experimentos de clonación extensiva.

Otro método usado en algún grado en el diagnóstico de bacterias es PCR múltiple, que se basa en el uso de varios oligonucleótidos específicos combinados en una mezcla de reacción. Hendolin *et al.* (Journal of Clinical Microbiology, 35: 11, 1997) usaron el método de PCR múltiple cuando identificaban patógenos que causan otitis media.

Aunque el procedimiento de PCR múltiple es relativamente sensible y rápido, tiene algunas desventajas. Se sabe que fragmentos de ADN más cortos se amplifican de forma más eficaz que fragmentos de ADN más largos. Por lo tanto, si la misma muestra incluye dos especies bacterianas diferentes, el ADN bacteriano del fragmento más corto probablemente se amplificará de forma más eficaz, lo que afecta a la sensibilidad del procedimiento. Además, con PCR múltiple es posible identificar solamente unas pocas bacterias simultáneamente, porque es prácticamente imposible diseñar por ejemplo más de una docena de pares de cebadores específicos para que sean funcionales en las mismas condiciones de PCR. Por lo tanto, no es aplicable la PCR múltiple, por ejemplo, para el diagnóstico de, por ejemplo, infecciones del tracto respiratorio en las que se conocen más de diez patógenos clínicamente importantes.

Las bacterias de la llama flora normal también pueden causar problemas en el diagnóstico microbiano basado en PCR múltiple. Se ha mapeado completamente el genoma de solamente una docena de especies bacterianas y la mayoría de estas especies bacterianas son agentes causantes de enfermedad conocidos. Por tanto, hay muy poca información acerca de las bacterias de la flora normal y sus secuencias de ADN. Esto es por lo que es casi imposible el diseño de cebadores de PCR específicos de especie y el diagnóstico bacteriano basado solamente en amplificación por PCR.

El uso de ARN ribosómico también incluye algunos inconvenientes. Es difícil distinguir las especies bacterianas relacionadas entre sí con la ayuda de molécula de ARNr, porque las secuencias de estas moléculas no contienen suficientes regiones variables cuando se comparan entre sí. E incluso si pueden encontrarse diferencias entre diversas especies bacterianas, estos sitios variables generalmente están divididos en la molécula de ARNr completa (por ejemplo, la longitud del ARNr 16S es de aproximadamente 1500 nucleótidos), que limita el uso de métodos moleculares para el diagnóstico. En la práctica, las especies bacterianas relacionadas por tanto pueden distinguirse entre sí solamente secuenciando el gen codificante de ARNr completo. Sin embargo, incluso este enfoque no es siempre suficiente para distinguir especies bacterianas entre sí.

Breve descripción de la invención

El propósito de la presente invención es proporcionar herramientas y métodos, que sean útiles en el diagnóstico bacteriano de enfermedades infecciosas, especialmente las que causan infecciones del tracto respiratorio, pero que carecen de los inconvenientes de diagnóstico bacteriano descritos anteriormente. En particular, el propósito de la invención es proporcionar nuevas herramientas y métodos, que sean útiles en el diagnóstico bacteriano basado en métodos moleculares, siendo las herramientas y métodos sensibles, eficaces, y específicos de especie, y siendo capaces de identificar solamente la especie bacteriana deseada. Un propósito adicional de la invención es proporcionar métodos, por los que sea posible diagnosticar bacterias infecciosas, especialmente las que causan infecciones del tracto respiratorio, sustancialmente más rápido que lo previamente posible, por lo que puede prescribirse una terapia antimicrobiana correcta y eficaz al paciente en una fase más temprana de la infección de modo que se acorte la duración de la infección y el riesgo de complicaciones potencialmente dañinas, incluso amenazantes de la vida.

La presente invención proporciona sondas oligonucleotídicas específicas de especie bacteriana que se originan a partir de regiones hipervariables situadas cerca de regiones conservadas de genes que codifican las topoisomerasas, especialmente los genes *gyrB/parE*, difiriendo estas regiones hipervariables en las secuencias básicas significativamente en diversas especies bacterianas. Con estas sondas específicas de especie bacteriana puede detectarse e identificarse simultáneamente el genoma de múltiples bacterias que causan infección.

La invención también proporciona cebadores de amplio intervalo que se originan a partir de las regiones conservadas de genes que codifican las topoisomerasas, especialmente los genes *gyrB/parE*, y que amplifican de forma eficaz ADN de bacterias que causan infección incluso de muestras clínicas, que incluyen grandes cantidades de ADN extraño (no bacteriano).

Además, la presente invención proporciona métodos simples, rápidos, sensibles y específicos que superan los inconvenientes de la técnica anterior. Con estos métodos pueden identificarse y diagnosticarse de forma fiable especies bacterianas clínicamente importantes a partir de muestras clínicas o cultivos bacterianos.

La presente invención se refiere a secuencias de sondas oligonucleotídicas que hibridan en condiciones de hibridación normales con secuencias de regiones hipervariables situadas cerca de las secuencias conservadas de genes de la topoisomerasa de bacterias que causan infecciones, especialmente infecciones del tracto respiratorio, y comprenden una cualquiera de las secuencias identificadas con la SEC ID N° 1 a 69, y/o secuencias inversas o complementarias de las mismas, o fragmentos funcionales de las mismas.

ES 2 285 211 T3

Los ejemplos de especies bacterianas que causan infecciones, especialmente infecciones del tracto respiratorio, incluyen *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Escherichia coli*, *Moraxella catarrhalis*, *Legionella pneumophila*, y *Fusobacterium necrophorum*, y ejemplos de genes que codifican la topoisomerasa son el gen que codifica las proteínas *gyrB* y *parE*.

Preferiblemente, la longitud de la secuencia de sonda oligonucleotídica de la invención es de 15-30 nucleótidos, más preferiblemente de 20 a 30 y mucho más preferiblemente de 21 a 25 nucleótidos.

La presente invención también se refiere al uso de las secuencias de sonda oligonucleotídica mencionadas anteriormente en la detección, identificación, o clasificación de especies bacterianas.

La presente invención se refiere adicionalmente a una mezcla de sondas oligonucleotídicas, que comprende cualquier combinación, y preferiblemente todas las secuencias identificadas con la SEC ID N° 1 a 69, y/o sus secuencias inversas o complementarias, o fragmentos funcionales de las secuencias mencionadas anteriormente. En una realización preferida, la mezcla deseada de sondas se ha unido a un soporte sólido. Preferiblemente, se ha unido una mezcla de sondas oligonucleotídicas que comprende todas las secuencias identificadas con la SEC ID N° 1 a 69, y/o sus secuencias inversas o complementarias, en un soporte sólido.

La presente invención se refiere adicionalmente a una nueva mezcla de cebadores de ADN que comprende secuencias que hibridan con las secuencias de regiones conservadas de genes que codifican topoisomerasas, especialmente con los genes que codifican las proteínas *gyrB* y/o *parE* de bacterias que causan infecciones del tracto respiratorio, y que comprenden secuencias identificadas con la SEC ID N° 76 ó 77 o sus fragmentos funcionales. La presente invención también se refiere al uso de la mezcla de cebadores mencionada anteriormente en la amplificación de genes de topoisomerasa, especialmente genes que codifican las proteínas *gyrB* y *parE*.

Además, la presente invención se refiere a un método de diagnóstico para detectar e identificar bacterias que causan infecciones del tracto respiratorio en una muestra clínica, que comprende

- a) amplificar ADN aislado de la muestra clínica usando la mezcla de cebadores mencionada anteriormente,
- b) poner en contacto el ADN amplificado con una combinación deseada de las sondas mencionadas anteriormente en condiciones de hibridación, y
- c) detectar la formación de un posible complejo de hibridación.

Una realización preferida del método de la invención comprende amplificar el ADN aislado de la muestra clínica por reacción en cadena de la polimerasa, y poner en contacto el ADN amplificado con las sondas oligonucleotídicas específicas de especie bacteriana unidas al soporte sólido.

En una realización preferida del método de la invención, se usa un nucleótido marcado adecuadamente en la amplificación del ADN aislado de la muestra clínica para generar una cadena diana detectable.

En otra realización preferida del método de la invención, el ADN diana amplificado y posiblemente marcado se pone en contacto con un soporte sólido, preferiblemente con vidrio tratado en el que se han unido todas las sondas oligonucleotídicas específicas de especie de la invención que tienen secuencias identificadas con la SEC ID N° 1 a 69 y/o sus secuencias inversas o complementarias.

En una realización preferida adicional del método de la invención, el ADN diana amplificado y posiblemente marcado se pone en contacto con un soporte sólido, preferiblemente con vidrio tratado, en el que se han unido las sondas específicas de la invención de una bacteria especificada o unas pocas bacterias especificadas que causan infecciones del tracto respiratorio, teniendo dichas sondas oligonucleotídicas específicas secuencias correspondientes identificadas con la SEC ID N° 1 a 7, 8 a 14, 15 a 16, 17 a 20, 21 a 25, 26 a 29, 30 a 33, 34 a 38, 39 a 42, 43 a 47, 48 a 50, 51 a 55, 56 a 60, 61 a 65, y 66 a 69 de la Tabla 4A y 4B y/o sus secuencias inversas o complementarias de las mismas, o cualquier combinación adecuada de las mismas.

La presente invención se refiere adicionalmente a un kit de diagnóstico para su uso en el diagnóstico de bacterias causantes de infección, especialmente las que causan infecciones del tracto respiratorio, que comprende

- a) una mezcla de cebador de ADN de la invención como se ha definido anteriormente,
- b) una mezcla de secuencias de sonda oligonucleotídica específicas de especie bacteriana, opcionalmente unidas a un soporte sólido de la invención como se ha definido anteriormente,
- c) secuencias de sondas de control positivo y opcionalmente negativo, y opcionalmente
- d) reactivos necesarios en las etapas de amplificación, hibridación, purificación, lavado y/o detección.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra ejemplos de regiones del gen *gyrB* hipervariables que están limitadas por las secuencias conservadas (*Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*). Las regiones conservadas se han marcado con recuadros en gris, y funcionan como sitios de hibridación de cebadores *gyrB/parE* de amplio intervalo. La región hipervariable, a partir de la que se han diseñado sondas específicas de especie bacteriana, está entre estas secuencias conservadas (sitios subrayados).

La Figura 2 muestra un ejemplo de los resultados de una hibridación sobre la superficie de la microserie. El ADN amplificado del gen *gyrB* aislado de un aislado de cultivo de *S. aureus* se usó como cepa diana (producto de PCR marcado con Cy-5-dCTP asimétrico). El portaobjetos de vidrio contenía cuatro sondas oligonucleotídicas de *gyrB* específicas (Tabla 4A: sondas oligonucleotídicas 21 a 24) que se unían todas específicamente a la cepa diana, *S. aureus*. Además, los 5 oligonucleótidos de control positivo dieron una señal detectable. La cepa diana, *S. aureus* no se unió a otras sondas oligonucleotídicas en el portaobjetos de vidrio.

La Figura 3 muestra los resultados de amplificación por PCR del Ejemplo 7, en el que se compararon cebadores conocidos descritos como específicos para *Streptococcus pneumoniae* en el ensayo de especies bacterianas del género *Streptococcus* y se compararon cebadores conocidos descritos como específicos para *Moraxella catarrhalis* en el ensayo de especies bacterianas del género *Moraxella*. Los resultados muestran, sin embargo, que los cebadores en cuestión no son específicos de especie, sino que también amplifican las bacterias de la flora normal.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en estudios, que intentaron encontrar alternativas más específicas para el uso de ARN ribosómico en el diagnóstico de bacterias causantes de infección. El estudio se centró en otros genes que son vitales para las bacterias. Las proteínas topoisomerasas girasa B (*gyrB* o topoisomerasa II) y *parE* (la otra subunidad de la topoisomerasa IV) son moléculas importantes para las bacterias, porque son necesarias en el empaquetamiento del ADN. Ciertos fragmentos de la secuencia de ADN de estas moléculas han permanecido casi inalterables, es decir, conservados, durante la evolución. En este contexto las expresiones “una región conservada” o “regiones conservadas” se refieren a una región o regiones de genes o proteínas de topoisomerasa, cuya secuencia nucleotídica o equivalentemente la secuencia de aminoácidos ha permanecido casi inalterable entre diferentes especies bacterias que causan infecciones del tracto respiratorio. Habitualmente, estas regiones conservadas son las regiones más importantes para el funcionamiento de la proteína. Las moléculas *gyrB/parE* no están, sin embargo, tan conservadas como las moléculas de ARN ribosómico. Como las moléculas en cuestión son proteínas, los genes que codifican estas proteínas incluyen más diferencias a nivel de ácido nucleico, debido a la naturaleza de su código genético, que los genes que codifican moléculas de ARN estructural (por ejemplo, moléculas de ARNr 16S). Las moléculas *gyrB/parE* como conjunto no han permanecido tan inalterables como las moléculas de ARN estructural durante la evolución: pueden encontrarse fragmentos de ADN cortos en moléculas *gyrB/parE* donde las diferencias entre diversas especies bacterianas grandes (incluyendo especies bacterianas estrechamente relacionadas) son tan grandes que estas secuencias de ADN pueden considerarse específicas de especie. Estas secuencias son secuencias hipervariables, que en el contexto se refieren a secuencias de ADN de los genes de topoisomerasa que difieren en la secuencia de bases nucleotídicas entre diferentes bacterias a un grado que produce especificidad de especie bacteriana y que están situadas cerca de las secuencias conservadas de los genes de topoisomerasa y opcionalmente limitadas o marcadas por las secuencias conservadas.

Las características mencionadas anteriormente se utilizaron en el diseño de oligonucleótidos específicos de especie para las cepas bacterianas. En el diseño de sondas específicas de especie (oligonucleótidos) (Tablas 4A y 4B) se usó una estrategia de planificación basada en la alineación. Los genes *gyrB* y *parE* de especies bacterianas diana se alinearon con los genes correspondientes de las bacterias de referencia. Las secuencias se obtuvieron de la base de datos pública de secuencias EMBL o, en casos en los que dichas secuencias no estaban disponibles en bases de datos públicas, se produjeron por clonación de los fragmentos de la secuencia del gen *gyrB/parE* a partir de las especies bacterianas. Las secuencias se produjeron amplificando el fragmento de ADN de *gyrB/parE* deseado a partir de aislados de cultivo bacteriano. El fragmento de secuencia de ADN deseado después se clonó y se secuenció. En la Figura 1 se presenta un ejemplo de la región del gen *gyrB* hipervariable de dos especies bacterianas, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*, que está unida por regiones génicas conservadas. Se han marcado las regiones conservadas con recuadros en gris, y funcionan como sitios de hibridación de cebadores de *gyrB/parE* de amplio intervalo. La región hipervariable, para la que se han diseñado sondas específicas de especie, está entre estas secuencias conservadas (sitios subrayados).

La alineación de las secuencias se realizó con el programa BioEdit y el algoritmo de alineación ClustalW. La secuencia consenso de las alineaciones se calculó y se identificaron manualmente las regiones adecuadamente conservadas. Estas regiones se refieren a fragmentos de secuencia que están conservados en los genes de la especie bacteriana diana pero no se encuentran, al menos completamente, en los genes de las especies bacterianas de referencia. Las secuencias oligonucleotídicas con la longitud adecuada (por ejemplo, 21-25 nucleótidos) se seleccionaron entre estas áreas para análisis de comparación. Las secuencias oligonucleotídicas seleccionadas se compararon con la base de datos de secuencias procariotas EMBL usando el programa del algoritmo FastA. Las secuencias oligonucleotídicas que tienen al menos dos faltas de coincidencia cuando se comparan con las secuencias de *gyrB/parE* de especies bacterianas no diana se eligieron para análisis adicionales. Se calcularon las temperaturas de fusión (Tm) de los oligonucleótidos y se examinó la formación de estructuras de horquilla. Los oligonucleótidos sin estructuras secundarias

fuertes y con Tm mayores de 45°C se seleccionaron para el ensayo de especificidad. La especificidad de las sondas oligonucleotídicas se ensayó en condiciones de laboratorio tanto con muestras de ADN puro aisladas de diversas especies bacterianas (Ejemplo 3, Tabla 3) como con muestras clínicas de pacientes (Ejemplo 6, Tabla 5).

Las sondas oligonucleotídicas de la presente invención comprenden las secuencias identificadas con la SEC ID N° 1 a 69, o sus secuencias inversas o complementarias. Pueden ser de diferente longitud, y solamente la especificidad de especie deseada y la funcionalidad de estas sondas oligonucleotídicas determinan su longitud adecuada en reacciones de hibridación. La longitud de las sondas oligonucleotídicas es generalmente de 15 a 30, preferiblemente de 20 a 30 y más preferiblemente de 21 a 25 nucleótidos. Además, las sondas pueden modificarse de diferentes modos (por ejemplo, pueden incluirse nucleótidos modificados, tales como inosina). Además, pueden unirse diversos compuestos o grupos químicos (por ejemplo, grupos amino) u otras moléculas, tales como marcadores necesarios para la detección, a las sondas, o pueden estar completamente sin modificar. Las secuencias de las sondas específicas de especie bacteriana preferidas y sus especificidades se presentan en las Tablas 4A y 4B, y tienen secuencias identificadas con la SEC ID N° 1 a 69. Naturalmente, son igual de adecuadas secuencias inversas y complementarias de estas secuencias oligonucleotídicas, como es obvio para los especialistas en la técnica. Asimismo, son útiles fragmentos funcionales de las secuencias oligonucleotídicas mencionadas previamente como sondas con la condición de que la especificidad de especie permanezca inalterable.

Para diseñar los cebadores de PCR, se alinean secuencias de aminoácidos de proteínas *gyrB* de especies bacterianas seleccionadas entre diferentes grupos filogenéticos (Tabla 2) con el programa BioEdit usando el algoritmo de alineación ClustalW. En estudios de alineación se encontraron muchas regiones conservadas y se tomaron como punto de partida para el diseño de cebadores de amplio intervalo. La proteína *parE* está relacionada con la proteína *gyrB*, y las regiones conservadas mencionadas anteriormente pueden encontrarse en estos dos genes en ciertas especies bacterianas (bacterias gram-positivas). Las secuencias de aminoácidos conservadas se tradujeron de forma inversa a las secuencias de ácido nucleico correspondiente. Dependiendo de la naturaleza del código genético había varias regiones degeneradas en las secuencias cebadoras. En base a las secuencias conservadas se diseñaron varios pares de cebadores y se ensayaron en laboratorio (ensayo de especificidad y sensibilidad). En base a los ensayos de laboratorio se concluyó que la amplificación de ADN bacteriano puro es exitosa con algunos pares de cebadores, y que los genes *gyrB/parE* de todas las bacterias pueden amplificarse con estos cebadores. Los cebadores en cuestión actúan de este modo como cebadores universales o de amplio intervalo para las bacterias.

Uno de los pares de cebadores demostró tener sensibilidad superior en comparación con los otros, y se ensayaron muestras clínicas con este par de cebadores. Sin embargo, resultó que el ADN bacteriano no puede amplificarse con este par de cebadores a partir de muestras clínicas que contienen grandes cantidades de ADN humano. Por esta razón se volvió a diseñar el par de cebadores, y se buscaron nuevas alternativas de cebador, en términos de degeneración, que amplificarían por un lado el ADN de muestras clínicas, y por otro lado también retendrían una elevada especificidad de modo que pudieran amplificarse las proteínas *gyrB/parE* de todas las bacterias que causan infecciones del tracto respiratorio. Se presenta un par de cebadores funcional en la Tabla 1. Con este par de cebadores, pueden amplificarse todos los genes *gyrB/parE* de bacterias que están filogenéticamente distantes entre sí (Tabla 3) incluso en presencia de grandes cantidades de ADN humano.

TABLA 1

Cebadores de amplio intervalo de gyrB/parE

Nombre del cebador	Secuencia 5' → 3'
gB1F	CGTCCWGGKATGTAYATHGG
gB2R	CCHACRCCRTGWAAWCCDCC

En las secuencias de los cebadores:

W representa la base A o T,

K representa la base G o T,

Y representa la base C o T,

H representa la base A o C o T,

R representa la base A o G, y

D representa la base A o G o T.

Las mezclas de cebadores, que constan de varias alternativas de cebador diferentes, están de este modo afectadas. Por ejemplo, en el caso del cebador gB1F la mezcla incluye cebadores, en los que W representa A (adenina) o T (timina).

De acuerdo con la invención, pueden usarse sondas específicas para la identificación de patógenos causantes de infección, especialmente bacterias que causan infecciones del tracto respiratorio, en cualquier método adecuado, por el que pueda demostrarse la hibridación. Estos métodos son bien conocidos entre los especialistas en la técnica y pueden realizarse tanto en solución como en un soporte sólido que una ADN, tal como en membrana de nitrocelulosa o nylon, o en vidrio.

En una realización preferida del método de la invención, la identificación bacteriana se realiza usando la tecnología de microserie de ADN. En este contexto, una microserie de ADN o un chip de ADN se refiere a un pequeño sustrato en el que se han unido secuencias de ácido nucleico conocidas en un orden predeterminado. Si los fragmentos de ácido nucleico unidos a la microserie con más cortos de 100 pares de bases (generalmente aproximadamente 20-30 pares de bases), la microserie se llama una serie de oligonucleótidos.

En el método de la presente invención la muestra a analizar puede ser un cultivo bacteriano, un fragmento tisular, una muestra de secreción, tal como una muestra de esputo o cepillado, una muestra de sangre, u otra muestra adecuada, obtenida de un paciente que se sospecha que padece una enfermedad infecciosa. Especialmente la muestra a analizar es una muestra de secreción adecuada para aplicaciones de diagnóstico clínico.

El ADN se aísla de la muestra a analizar con cualquier método convencional, tal como con kits de aislamiento de ADN comerciales (por ejemplo, High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche; NucleoSpin, BD Biosciences Clontech; o QIAamp DNA Mini-kit, Qiagen) o con extracción tradicional con fenol-cloroformo o disolventes orgánicos equivalentes, de forma manual o con dispositivos especiales que son adecuados para realizar el aislamiento de ADN. Los kits comerciales se usan preferiblemente a causa de su disponibilidad general, rapidez, y repetibilidad.

En el método de la presente invención los reactivos usados en la amplificación de ADN pueden ser cualquier reactivo que se use convencionalmente para la amplificación de ADN, y son bien conocidos entre los especialistas en la técnica. Los reactivos adecuados y rentables, que están disponibles en el mercado, incluyen diferentes tipos de ADN polimerasas Taq y tampones para las mismas (por ejemplo, AmpliTaqGOLD, AmpliTaqLD, DyNAzyme, TaqPlus Precision, y HotStartTaq), nucleótidos o mezclas preparadas de nucleótidos (por ejemplo, Sigma, Applied Biosystems, Amersham Biosystems), $MgCl_2$ (por lo que generalmente se usa un producto del fabricante de la Taq polimerasa), y Cy5-dCTP (por ejemplo, NEN LifeSciences, Amersham Biosciences).

En el método de la presente invención puede realizarse la clonación con cualquier método conocido convencionalmente, por ejemplo usando kits de clonación disponibles en el mercado (por ejemplo, Qiagen PCR Cloning Kit, QIAGEN o TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen). La secuenciación de los productos de clonación puede realizarse con cualquier secuenciador adecuado para este propósito (por ejemplo, Applied Biosystems modelo 373A, 377, o 3100, o Bio-Rad Sequi-Gen GT), o los productos pueden secuenciarse manualmente. Las secuencias pueden analizarse manualmente o con programas de análisis de secuencia diseñados para este propósito (por ejemplo, Applied Biosystems Sequencer o Vector NTI Suite Versión 7, InforMax).

El equipo usado para la amplificación también puede ser cualquier dispositivo adecuado (por ejemplo, T1 Thermocycler, Biometra, o GenAmp PCR system 2700, Applied Biosystems). Pueden usarse prácticamente todos los dispositivos y equipos adecuados para la amplificación de ADN, y la amplificación también puede realizarse manualmente transfiriendo tubos de reacción de una temperatura a otra. Además, la amplificación puede realizarse directamente en una microserie de ADN.

La purificación del producto de PCR puede realizarse con cualquier método convencional (por ejemplo, High Pure PCR Product Purification Kit, Roche; MicroSpin S-400, o S-300 HR Columns, Amersham Biosciences; o QIAquick PCR-purification-Kit, Qiagen) o usando extracción con un disolvente orgánico. El producto de amplificación también puede usarse para la reacción de hibridación como tal sin ninguna etapa de purificación o extracción adicional.

Para formar una cadena diana monocatenaria puede usarse cualquier método de digestión conocido. Estos métodos incluyen, por ejemplo, PCR asimétrica, tratamiento con exonucleasa, o síntesis de una cadena diana monocatenaria directamente sobre la superficie de la microserie (por ejemplo, matriXarray, Roche Applied Science). La invención también comprende aplicaciones en las que puede usarse un producto de PCR bicatenario en la reacción de hibridación. En el contexto de la presente invención la PCR asimétrica es el método preferido para generar una cadena diana monocatenaria.

En el método de la presente invención puede usarse cualquier marcador adecuado para producir una cadena diana marcada. Los marcadores adecuados incluyen marcadores fluorescentes (por ejemplo, Cy5, Cy3, Cy2, TexasRed, FITC, Alexa 488, TMR, FluorX, ROX, TET, HEX), marcadores radiactivos (por ejemplo, ^{32}P , ^{33}P , ^{33}S), y marcadores quimioluminiscentes (por ejemplo, HiLight Single-Color Kit). En la presente invención se prefiere el marcador fluorescente Cy5-dCTP (Amersham Biosciences). La invención también comprende las aplicaciones en las que no se necesita marcador, tales como aquellas en las que la detección de ácidos nucleicos se basa en impulsos eléctricos (por ejemplo, el Motorola eSensor).

Quando la hibridación tiene lugar en un soporte sólido, las sondas usadas en hibridación pueden unirse sobre la superficie del soporte sólido por unión covalente o no covalente. Como alternativa, pueden usarse otros métodos químicos, electroquímicos o equivalentes de unión. El sustrato o soporte, en el que se unen las sondas, puede estar fabricado de vidrio, plástico, metal, nylon, nitrocelulosa, poliácridamida, sílice, o una combinación de estos materiales, y el tamaño del sustrato puede variar de un par de milímetros a unos pocos centímetros. La superficie del sustrato usado puede tratarse con aminosilano o cualquier otro tratamiento de superficie adecuado, tal como epoxisilano, o como alternativa un sustrato que no requiera ningún tratamiento de superficie diferente. Un sustrato preferido para las sondas oligonucleotídicas es un portaobjetos de vidrio de microscopio tratado con aminosilano (por ejemplo, Genorama, Asper Biotech Ltd., Estonia).

Las sondas pueden depositarse en la superficie del soporte de microserie con cualquier equipo de formación de series disponible en el mercado que sea adecuado para este propósito (por ejemplo, Qarray-mini arraying system, Lucidea Array Spotter, OmniGrid, o GeneMachines arrayer), o pueden pipetarse manualmente sobre la superficie. Como alternativa, las sondas pueden sintetizarse directamente sobre la superficie usando fotolitografía.

La mezcla de hibridación usada en hibridación puede ser diferente en su composición de la que se ha presentado posteriormente en los Ejemplos de prácticos, por ejemplo, la composición salina y/o la concentración pueden variar (por ejemplo, 2-4xSSC o SSPE), o pueden usarse soluciones de hibridación disponibles en el mercado (por ejemplo, ArrayHyb, Sigma). Además, pueden usarse aditivos desnaturizantes o estabilizantes (por ejemplo, formamida, DMSO, es decir dimetilsulfóxido) o sustancias que disminuyan la unión no específica (por ejemplo, BSA, es decir albúmina de suero bovino, o ssADN, es decir, ADN de esperma de salmón) en la mezcla de hibridación. La hibridación puede realizarse en diversas temperaturas de hibridación (generalmente entre 40-70°C), y el tiempo necesario para realizar la hibridación puede variar, dependiendo de la aplicación, de unos pocos minutos a un día. En lugar de un baño de agua, la hibridación puede realizarse, por ejemplo, en una incubadora o en un dispositivo de hibridación especial (por ejemplo, GeneTAC HybStation o Lucidea Slidepro Hybridizer). Las etapas de lavado después de la hibridación pueden variar en su duración, volumen, temperatura y en la composición de la solución de lavado, y por lo tanto pueden diferir del método ejemplificado. Las etapas de lavado de los portaobjetos de microserie también pueden realizarse con un dispositivo diferente. En algunos casos no es necesaria una etapa de lavado, porque el portaobjetos de microserie puede analizarse inmediatamente después de la hibridación. En un método preferido un baño de agua a +57°C es una condición de hibridación adecuada. Los portaobjetos de vidrio se hibridaron durante 12-16 horas en estas condiciones.

Pueden analizarse microseries o chips con cualquier equipo o lector aplicable para este propósito (por ejemplo, GeneTAC UC4, GenePix Personal 4100A, o Agilent DNA Microarray Scanner). Si la cadena diana se ha marcado con un marcador fluorescente, también puede realizarse el análisis, por ejemplo, con un microscopio de fluorescencia. Si se ha usado un marcador radiactivo, el chip o membrana puede analizarse con autorradiografía. Si se ha realizado hibridación en la superficie de una microserie electrónica y el análisis por tanto se basa en detección electrónica, la microserie puede analizarse con un equipo especial diseñado para este propósito.

Se ha mapeado completamente el genoma de solamente una docena de especies bacterianas, y la mayoría de estas especies bacterianas son patógenos conocidos. Por tanto, hay muy poca información acerca de la flora bacteriana normal y las secuencias de ADN de estas especies bacterianas. Por lo tanto, es casi imposible el diseño de cebadores de PCR específicos de especie bacteriana y el diagnóstico bacteriano basado solamente en la amplificación por PCR.

El método de la presente invención no sufre otros problemas de la técnica anterior. La etapa de amplificación del método de la presente invención es muy sensible y se amplificó de forma eficaz una cierta región génica (*gyrB/parE*) de especies bacterianas filogenéticamente diferentes con cebadores de amplio intervalo de la invención independientemente de si las especies bacterianas eran gram-negativas o gram-positivas (Tabla 3). Además, el producto de PCR es corto (aproximadamente 300 pares de bases), que mejoran la eficacia de la reacción de amplificación.

Las sondas específicas de especie bacteriana se han diseñado para la región del gen *gyrB/parE* que es considerablemente más variable que por ejemplo la región del gen de ARNr 16S, que se ha usado previamente en diagnóstico bacteriano. Aunque las especies bacterianas de la flora normal también se amplifican de forma eficaz con cebadores de amplio intervalo usados en el presente método, no suceden reacciones de falso positivo, porque las sondas de la invención son muy específicas de especie bacteriana e identifican solamente las bacterias para las que se han diseñado. Cuando se hibrida la cadena diana amplificada de los aislados de cultivo de *Streptococcus pneumoniae* en un portaobjetos de vidrio, la cadena diana hibridará solamente con sondas específicas para *Streptococcus pneumoniae* y con controles positivos. Por otro lado, cuando se hibrida la cadena diana amplificada de bacterias de flora normal, por ejemplo, *Streptococcus mitis*, el producto no se unirá a ninguna sonda del patógeno; en este caso solamente las sondas de control positivo emitirán una señal (Ejemplo 7, Tabla 6). Todas las sondas oligonucleotídicas específicas de la presente invención se ensayaron de forma cruzada con diversas especies bacterianas, incluyendo muchas especies bacterianas que pertenecen a la flora normal, y no se descubrió que tuvieran lugar reacciones cruzadas (Figura 2, Tabla 6). Por tanto, el método de la presente invención es considerablemente más sensible y específico que los métodos descritos previamente de tipo similar.

El kit de diagnóstico de la invención puede usarse en el diagnóstico de bacterias que causan infección, especialmente las que causan infecciones del tracto respiratorio. El kit comprende la mezcla de cebador de ADN de la invención definido anteriormente con detalle, cualquier mezcla adecuada y deseada de secuencias de sonda oligonucleotídica

específica de especie bacteriana, opcionalmente unidas en un soporte sólido de la invención como se ha definido anteriormente con detalle, secuencias de sonda de control positivo y opcionalmente negativo adecuadas, y opcionalmente reactivos necesarios en las etapas de amplificación, hibridación, purificación, lavado, y/o detección como se ha analizado con detalle anteriormente. Un kit de diagnóstico preferido de la invención contiene una mezcla de cebador de ADN que comprende secuencias identificadas con la SEC ID N° 76 y 77, un chip que contiene las secuencias apropiadas oligonucleotídicas identificadas con la SEC ID N° 1 a 69 unidas a los mismos, controles positivos y opcionalmente negativos, y opcionalmente los reactivos necesarios para realizar el método de la invención. A continuación, la invención se ilustra de forma más precisa con los Ejemplos. Cuando se describe el método, se ha hecho referencia a diferentes equipos, materiales, temperaturas, compuestos químicos o equivalentes usados en esta aplicación. Estos pueden variarse de forma natural de un modo adecuado en diferentes aplicaciones de la invención. Por lo tanto, la presente invención y sus realizaciones no se limitan a los ejemplos descritos a continuación.

Ejemplo 1

El diseño de los cebadores de PCR de acuerdo con la invención

Para el diseño de cebadores de PCR, se alinearon secuencias de aminoácidos de las proteínas *gyrB* (GyrB) y su proteína par relacionada ParE de diversas especies bacterias de diferentes grupos filogenéticos (Tabla 2) con el programa BioEdit usando el algoritmo de alineación ClustalW. Se encontraron varias regiones génicas conservadas en la alineación de GyrB. También se encontraron las mismas regiones conservadas del gen *parE* de las especies bacterianas gen-positivas estudiadas.

Estas secuencias de aminoácidos conservadas se usaron como punto de partida en el diseño de cebadores de amplio intervalo. En primer lugar se tradujeron de forma inversa en las secuencias de ácido nucleico correspondientes. A causa de la naturaleza del código genético se observaron varios sitios degenerados en estas secuencias de ácido nucleico. Después de esto, en base a las secuencias conservadas, se sintetizaron diversos pares de cebadores (solicitados de Sigma-Genosys, Inglaterra, www.sigma-genosys.co.uk) y se ensayaron para la especificidad y sensibilidad. Se ensayó la especificidad amplificando ADN aislado de especies bacterianas presentadas en la Tabla 4 usando el método descrito a continuación en el Ejemplo 4. Se determinó la sensibilidad del par de cebadores analizando la concentración más pequeña de ADN aislado de un aislado de cultivo de *H. influenzae* que podría amplificarse y detectarse con diferentes pares de cebadores usando el método de amplificación e identificación descrito a continuación en el Ejemplo 4.

En base a estos resultados de ensayo, se observó que la amplificación de ADN bacteriano puro era exitosa para algunos pares de cebadores, y con estos cebadores podrían amplificarse los genes *gyrB/parE* de todas las especies bacterianas estudiadas. Estos cebadores funcionaban por lo tanto como cebadores de amplio intervalo para las bacterias. La sensibilidad de los cebadores varió, y el par de cebadores con la sensibilidad mayor se usó para estudiar las muestras clínicas (muestras de otitis media). Sin embargo, se descubrió que este par de cebadores no era suficientemente sensible, porque no era capaz de amplificar el ADN bacteriano de muestras clínicas que contenían grandes cantidades de ADN humano.

Por esta razón se sintetizaron nuevos pares de cebadores que variaban en términos de degeneración (solicitados de Sigma-Genosys, Inglaterra, www.sigma-genosys.co.uk). Se estudió la especificidad y sensibilidad por el método descrito previamente, tanto con ADN bacteriano puro como con ADN aislado de muestras clínicas (Tabla 5). Un par de cebadores de funcionamiento era la mezcla de cebadores, que contiene las secuencias

CGTCCWGGKATGTAYATHGG (SEC ID N° 76) y

CCHACRCCRTGWAAWCCDCC (SEC ID N° 77),

que llamaron gB1F (mezcla de cebador directo) y gB2R (mezcla de cebador inverso), respectivamente (Tabla 1), en los que

W representa la base A o T,

K representa la base G o T,

Y representa la base C o T,

H representa la base A o C o T,

R representa la base A o G, y

D representa la base A o G o T

Las secuencias conservadas de la primera parte de los genes *gyrB* y/o *parE* de todas las especies bacterianas estudiadas se identificaron con esta mezcla de cebadores. Ésta amplifica ADN de muestra clínicas, y tiene especificidad suficientemente amplia conservada, posibilitando de este modo la amplificación de los genes *gyrB/parE* de todas las

ES 2 285 211 T3

especies bacterianas que causan infecciones del tracto respiratorio (véanse los Ejemplos 6 y 7). En particular, esta mezcla de cebadores puede usarse para amplificar los genes *gyrB/parE* de bacterias (Tabla 3) que están filogenéticamente lejos entre sí incluso en una situación en la que la muestra incluye grandes cantidades de ADN humano.

TABLA 2

Bacterias cuyas secuencias de aminoácidos de las proteínas gyrB se usaron para la alineación

Género	Especie
<i>Bacteroides</i>	<i>fragilis</i>
<i>Mycobacterium</i>	<i>tuberculosis</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>pneumoniae</i>
<i>Thermotoga</i>	<i>maritima</i>
<i>Chlamydia</i>	<i>pneumoniae</i>
<i>Chlamydia</i>	<i>thracomatis</i>
<i>Borrelia</i>	<i>burgdorferi</i>
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>
<i>Neisseria</i>	<i>gonorrhoeae</i>
<i>Haemophilus</i>	<i>influenzae</i>
<i>Myxococcus</i>	<i>xanthus</i>
<i>Campylobacter</i>	<i>jejuni</i>
<i>Helicobacter</i>	<i>pylori</i>
<i>Bartonella</i>	<i>bacilliformis</i>
<i>Aquifex</i>	<i>aeolicus</i>

TABLA 3

Cepas bacterianas usadas en ensayo de sensibilidad y especificidad de cebadores y sondas

5	Especie bacteriana	Código del proveedor (tipo de muestra)
	<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 5190D (ADN)
10	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	ATCC 53420D (ADN)
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ATCC 15531 (ADN)
15	<i>Legionella pneumophila</i>	ATCC 33152D (ADN)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 47085D (ADN)
	<i>Moraxella catarrhalis</i>	DSM 9143 (especie bacteriana)
20	<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM 20231 (especie bacteriana)
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	DSM 20565 (especie bacteriana)
25	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	DSM 20566 (especie bacteriana)
	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	DSM 20698 (especie bacteriana)
30	<i>Escherichia coli</i>	DSM 30083 (especie bacteriana)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 50071 (especie bacteriana)
	<i>Streptococcus oralis</i>	DSM 20627 (especie bacteriana)
35	<i>Streptococcus mitis</i>	DSM 12643 (especie bacteriana)
	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	DSM 8978 (especie bacteriana)
40	<i>Haemophilus ducreyi</i>	DSM 8925 (especie bacteriana)
	<i>Moraxella caviae</i>	ATCC 14659 (especie bacteriana)
	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	ATCC 13669 (especie bacteriana)
45	<i>Moraxella cuniculi</i>	ATCC 14688 (especie bacteriana)
	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	ATCC VR 1355 (especie bacteriana)
50	ATCC = American Type Culture Collection	
	DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen	

Ejemplo 2

Producción de nuevas secuencias necesarias en el diseño de sondas oligonucleotídicas definidas por la invención por clonación

Se sintetizaron secuencias *gyrB* de las especies bacterianas *Moraxella catarrhalis*, *Fusobacterium necrophorum*, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, y *Haemophilus parainfluenzae* que no están disponibles en bases de datos de secuencias públicas de acuerdo con el método general descrito a continuación para diseñar sondas oligonucleotídicas de la invención.

Primero se aísla el ADN de aislados de cultivo bacteriano usando el QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Alemania). Cuando se ha aislado el ADN, se amplifica la cadena diana deseada para clonación usando reacción en cadena de la polimerasa (PCR) simétrica (convencional). En la primera etapa de amplificación, se prepara la mezcla de reacción

ES 2 285 211 T3

mezclando el ADN aislado de la muestra, los cebadores bacterianos de amplio intervalo (Ejemplo 1), y los demás componentes necesarios en la etapa de amplificación. Por tanto, la mezcla de reacción (25 μ l) usada en la PCR de clonación contiene 20 pmol de mezcla de cebador gB2R, 20 pmol de mezcla de cebador gB1F, 200 μ M de cada dATP, dGTP, dTTP y dCTP (Sigma USA), tampón de PCR Hot Start Taq 1 x (Qiagen, Alemania), que incluye $MgCl_2$ para conseguir una concentración final de 2,8 mM, DMSO al 7,5% (Amersham Pharmacia Biotech, USA), 2,5 U de ADN polimerasa Hot Start Taq (Qiagen, Alemania) y 2,5 μ l de ADN aislado.

La PCR de clonación se realiza en un termociclador GenAmp PCR system 2700 (Applied Biosystems) usando el siguiente programa: una etapa de desnaturalización de 15 minutos a 95°C, 40 ciclos de 1 minutos a 95°C, 1 minuto a 50°C, 1 minuto a 72°C, y finalmente una etapa de extensión de 10 minutos a 72°C. Después de que haya realizado la PCR, se verifica el éxito de la amplificación por electroforesis en gel usando un gel de agarosa el 2% que contiene bromuro de etidio.

La clonación se realiza inmediatamente después de PCR usando un kit de clonación TOPO TA (Invitrogen, USA). La mezcla de reacción para la clonación contiene 4 μ l del producto de PCR, 1 μ l de una solución salina (NaCl 1,2 M, $MgCl_2$ 0,06 M) y 1 μ l de vector TOPO (pCR-4-TOPO), que se mezclan juntos en un tubo eppendorf. La mezcla se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente, después de lo cual se transfiere la solución en hielo. Después de que se realice esta transformación química, en la que se transforman 2 μ l de mezcla de clonación enfriada en 50 μ l de células de *E. coli* TOPO10 competentes. Las células transformadas se incuban durante 10 minutos en hielo. En la siguiente fase, se realiza un tratamiento de choque por calor. El tubo que contiene las células se transfiere a un baño de agua a 42°C durante 30 segundos. Después de esto el tubo se transfiere inmediatamente en hielo y se añaden 250 μ l de medio SOC a temperatura ambiente (triptona al 2%, extracto de levadura al 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, $MgCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM, glucosa 20 mM). El tubo se agita horizontalmente (200 rpm) a 37°C durante 1 hora. Después de esto se extienden 20 μ l de mezcla de clonación en una placa LB selectiva precalentada (Luria-Bertani, triptona al 10%, extracto de levadura al 0,5%, NaCl al 1,0%, L-agar al 1,5% diluido en agua, pH 7), que contiene 5 g/ml de ampicilina. La placa se incuba durante una noche a 37°C. Al siguiente día, se eligen 10 colonias de la placa y se realiza la PCR de secuenciación.

La mezcla de reacción (50 μ l) para la PCR de secuenciación contiene 0,4 pmoles de cebador inverso M13 (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') y cebador directo M13 (5'-GTAAACGACGGCCAG) (proporcionados por el kit), 150 μ M de cada dATP, dGTP, dTTP y dCTP (Sigma, USA), tampón de PCR Hot Start Taq 1 x (Qiagen, Alemania), 1 U de ADN polimerasa Hot Start Taq (Qiagen, Alemania). Para la reacción de amplificación, se transfiere una pequeña parte de la colonia bacteriana con la ayuda de una varilla de muestra al tubo de reacción de PCR.

La PCR de secuenciación se realiza en un termociclador GenAmp PCR system 2700 (Applied Biosystems) usando el siguiente programa: una etapa de desnaturalización de 15 minutos a 95°C, 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C, 1 minuto a 72°C, y finalmente una etapa de extensión de 10 minutos a 72°C. Después de que se haya realizado la PCR, se verifica el éxito de la amplificación por electroforesis en gel usando un gel de agarosa al 2% que contiene bromuro de etidio. Después de esto, se purifica el producto de PCR retirando los cebadores, nucleótidos, tampón y enzima polimerasa adicionales con un kit de purificación QIAquick PCR (Qiagen, Alemania).

Después de la etapa de purificación se secuencia el fragmento insertado en el vector. Una mezcla de reacción de 12 μ l para la etapa de secuenciación contiene 100 ng de producto de PCR y 5 pmol de cada cebador inverso M13 o directo M13. La secuenciación se realiza por un kit BigDye Terminador Versión 3.0 y un ABIPRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Las secuencias se analizan con el programa Vector NTI Suite Versión 7 (InforMax, USA).

Con el método general descrito anteriormente se produjeron secuencias *gyrB* para las siguientes especies bacterianas: *Moraxella catarrhalis*, *Fusobacterium necrophorum*, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, y *Haemophilus parainfluenzae* (SEC ID N° 70 a 75).

Ejemplo 3

Diseño de sondas específicas de especie

En el diseño de oligonucleótidos específicos de especie bacteriana, es decir, sondas, se usó una estrategia de planificación basada en la alineación. Se alinearon los genes *gyrB* y *parE* de especies bacterianas diana con genes correspondientes de unas pocas bacterias de referencia (especies bacterianas estrechamente relacionadas). Por ejemplo, se alineó el gen *gyrB* de *Streptococcus pneumoniae* con los genes *gyrB* de *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Mycoplasma hominis*, *Staphylococcus aureus*, y *Fusobacterium necrophorum*. *S. oralis* y *S. mitis* están estrechamente relacionadas con *S. pneumoniae*. Por lo tanto, los oligonucleótidos diseñados para *S. pneumoniae* no deben reaccionar con estas bacterias de la flora normal. Se obtuvieron secuencias de la base de datos de secuencias pública EMBL o se produjeron por clonación como se ha descrito en el Ejemplo 2.

La alineación de las secuencias se realizó con el programa BioEdit usando el algoritmo de alineación ClustalW. Se calculó la secuencia consenso de las alineaciones y se identificaron manualmente las regiones adecuadamente conservadas. Estas regiones se refieren a fragmentos de secuencia que están conservadas en los genes de las especies bacterianas diana y que no se encuentran al menos completamente en los genes de las bacterias de referencia. Las secuencias oligonucleotídicas con la longitud adecuada (21 - 25 nucleótidos) se seleccionaron entre estas áreas para

ES 2 285 211 T3

análisis de comparación. Las secuencias oligonucleotídicas seleccionadas se compararon con la base de datos de secuencias procariotas EMBL usando el programa del algoritmo FastA. Las secuencias oligonucleotídicas que tienen al menos dos faltas de coincidencia cuando se comparan con secuencias *gyrB/parE* de bacterias no diana se eligieron para análisis adicionales. Se determinó la temperatura de fusión teórica (T_m) para los oligonucleótidos y se estudió la formación de estructuras secundarias. Se calculó la T_m (°C) con la ecuación

$$81,5 + 16,6 \log [\text{Na}] + 0,41(\%GC) - 0,61 (\%for) 500/N$$

en la que Na es la concentración de cationes monovalentes (se usa 50 M en los cálculos), %GC es la proporción de guanina y citosina, %for es la concentración de formamida (se usa 0% en los cálculos) y N es la longitud del oligonucleótido. Se estudió la formación de estructuras secundarias usando un programa proporcionado por Sigma-Genosys. El programa puede usarse con la ayuda de un navegador de red en la dirección de Internet <http://www.sigma-genosys.co.uk/oligos/grameset.html> (calculadora/calculadora básica). Los oligonucleótidos que no formaron fuertes estructuras secundarias y cuya temperatura T_m era al menos 45°C se eligieron para el ensayo de especificidad experimental.

Se sintetizaron sondas oligonucleotídicas y se modificaron simultáneamente desde el extremo 5' (oligos modificados en NH_2) (Sigma-Genosys, Inglaterra). Se ensayó la especificidad de las sondas en el laboratorio con muestras de ADN aisladas de diferentes especies bacterianas (Tabla 3) y de muestras de pacientes (Tabla 5) como se describe en los Ejemplos 4 y 5. De las sondas ensayadas, se seleccionaron las que funcionaron mejor y tuvieron la mayor especificidad. Se presentan las secuencias y especificidad de las sondas específicas de especie bacteriana en las Tabla 4A y 4B.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 285 211 T3

TABLA 4A

Secuencias oligonucleotídicas de gyrB

	Oligonucleótido/ SEC ID N°	Especificidad (gen <i>gyrB</i>)	Secuencia (5'-3')
5			
10	1/1	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	CTCAAAGAAGGTCTTCACCATC
15	2/2	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	GCCATATTCAAGTTTTTATTGAG
20	3/3	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	AGCCAGATGATTGATTACTGTT
25	4/4	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	TTGAGACCGTCTTTACAGTCCTT
30	5/5	<i>Streptococcus pyogenes</i>	GTTTTGCCTCATATTAAAGTC
35	6/6	<i>Streptococcus pyogenes</i>	TCTTTATTGAAGCAGATAATTCC
40	7/7	<i>Streptococcus pyogenes</i>	CGTTGAAACAGTTTTTACAGTCT
45	8/8	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	GGTCTTCATCATCTAGTCTATGA
50	9/9	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	GGTTGTAGACWACAGCATTGACG
55	10/10	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	AGCCATGGCAGSTTATTGCTCTA
60	11/11	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	GGATTGATGTTSGCATTTTAGAG
65	12/12	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	GGGTATTGTCWTCGTAGATAATG

ES 2 285 211 T3

5	13/13	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	TTATTGCTCTAGGATTGATGTT
10	14/14	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	GCATTTTAGAGSACGGGGGTATT
15	15/15	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	TCAAACCTAACCCTTAAAGACAAC
20	16/16	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	TGAAACAGTGTTTACGGTACTCC
25	17/17	<i>Haemophilus influenzae</i>	ATGATAATTCTGTATCGGTGCAA
30	18/18	<i>Haemophilus influenzae</i>	AGCAGAAGTTATTATGACTGTGC
35	19/19	<i>Haemophilus influenzae</i>	GACGATAACTCTTATAAAGTATC
40	20/20	<i>Haemophilus influenzae</i>	GATACCGATGACGGTACTGGTTTG
45	21/21	<i>Staphylococcus aureus</i>	AGTGTGGGAAATTGTCGATAATA
50	22/22	<i>Staphylococcus aureus</i>	TGAAGTTGTTATTGAAAAAGATAAC
55	23/23	<i>Staphylococcus aureus</i>	GGATTAAAGTAACGGATAACGGGA
60	24/24	<i>Staphylococcus aureus</i>	CTGTCGAAGTTATTTTAACTGTTT
65	25/25	<i>Staphylococcus aureus</i>	CGACTTCAGAGAGAGGTTTGCAC
	26/26	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	GAAATCAGCATCACCATCCATAC
	27/27	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATACGGATGAGTCGATCACTGTC
	28/28	<i>Pseudomonas</i>	GACGACAACACCTACAAGGTGTC

ES 2 285 211 T3

		<i>aeruginosa</i>	
5	29/29	<i>Pseudomonas</i>	GACACCGACGATGGCACCGGTCTG
		<i>aeruginosa</i>	
10	30/30	<i>Neisseria</i>	TTCGACAACAACAGCTACAAAAT
		<i>gonorrhoeae</i>	
15	31/31	<i>Neisseria</i>	ATATGGTGTTTGAAGTATTGGAC
		<i>gonorrhoeae</i>	
20	32/32	<i>Neisseria</i>	GACAAAATCACGGTAACGATACA
		<i>gonorrhoeae</i>	
25	33/33	<i>Neisseria</i>	GACAACAACAGCTACAAAATCTC
		<i>gonorrhoeae</i>	
30	34/34	<i>Escherichia coli</i>	TATTCGAGGTGGTAGATAACGCT
	35/35	<i>Escherichia coli</i>	TTCACGCCGATAACTCTGTCTCT
	36/36	<i>Escherichia coli</i>	CGCCGATAACTCTGTCTCTGTAC
	37/37	<i>Escherichia coli</i>	GACGATAACTCCTATAAAGTGTC
	38/38	<i>Escherichia coli</i>	GACACGGATGACGGCACCGGTCTG
35	39/39	<i>Moraxella</i>	AGCTGCCGAGGTTATTATGACGG
		<i>catarrhalis</i>	
40	40/40	<i>Moraxella</i>	GATGATAATTCATACAAAGTATC
		<i>catarrhalis</i>	
45	41/41	<i>Moraxella</i>	TGTGGATATCCACCCTGAAGAAG
		<i>catarrhalis</i>	
50	42/42	<i>Moraxella</i>	ATACCGATGATGGTACAGGCTTG
		<i>catarrhalis</i>	
55	43/43	<i>Legionella</i>	GATGATAATTCCTACAAGGTATC
		<i>pneumophila</i>	
	44/44	<i>Legionella</i>	AGCAGCCGAAGTCATCATGACAG
		<i>pneumophila</i>	
60	45/45	<i>Legionella</i>	TGTAGATATTCATAAAGAAGAAG
		<i>pneumophila</i>	
65	46/46	<i>Legionella</i>	ATACAGATGATGGAACCGGTTTG

	<i>pneumophila</i>	
47/47	<i>Legionella</i>	CAGATGATGGAACCGGTTTGCAT
	<i>pneumophila</i>	
48/48	<i>Fusobacterium</i>	CAACATCAGCCAGGGGATTACAT
	<i>necrophorum</i>	
49/49	<i>Fusobacterium</i>	GGAATTCCAGTAGACATACATCC
	<i>necrophorum</i>	
50/50	<i>Fusobacterium</i>	TGAAAATGATAACTATAAAGTGTC
	<i>necrophorum</i>	

TABLA 4B

Secuencias oligonucleotídicas de parE

Oligonucleótido/ SEC ID N°	Especificidad (gen <i>parE</i>)	Secuencia (5'-3')
1/51	<i>Staphylococcus aureus</i>	CGGTAACGAAATAGATGTAACAA
2/52	<i>Staphylococcus aureus</i>	AGAAGATAATGGACGTGGTATGC
3/53	<i>Staphylococcus aureus</i>	GTAAACCGACAGTCGAAGTTATC
4/54	<i>Staphylococcus aureus</i>	CAACTGATAAACGGGGATTACATC
5/55	<i>Staphylococcus aureus</i>	GGACAAGGCGGCTATAAACTTC
6/56	<i>Streptococcus pyogenes</i>	TGGAGATGATATTAAGGTTGTTA
7/57	<i>Streptococcus pyogenes</i>	GTCAGTGTGGCAGATAGCGGACG
8/58	<i>Streptococcus pyogenes</i>	GGATTCCCACCGTTCAAGTTATT
9/59	<i>Streptococcus pyogenes</i>	CAACAGATGCTACGGGATTGCAC
10/60	<i>Streptococcus</i>	GGTCAGGGTGGCTACAAAACGTC

		<i>pyogenes</i>	
	11/61	<i>Streptococcus</i>	TGGTGATCGTATTGATGTA ACTA
5		<i>pneumoniae</i>	
	12/62	<i>Streptococcus</i>	CTAACGGTTCAAGACCATGGACG
		<i>pneumoniae</i>	
10	13/63	<i>Streptococcus</i>	GAATTCCA ACTGTTGAGGTTATC
		<i>pneumoniae</i>	
15	14/64	<i>Streptococcus</i>	CGACCGATGGCGCTGGTCTTCAT
		<i>pneumoniae</i>	
20	15/65	<i>Streptococcus</i>	GGTCAAGGTGGCTATAAGACATC
		<i>pneumoniae</i>	
25	16/66	<i>Mycoplasma</i>	TGCTAATACTATTGCCGTTGTTT
		<i>pneumoniae</i>	
	17/67	<i>Mycoplasma</i>	ATAACTGTTAGTGACAACGGTCG
30		<i>pneumoniae</i>	
	18/68	<i>Mycoplasma</i>	AGATTTCTACGATTGACACCGTC
		<i>pneumoniae</i>	
35	19/69	<i>Mycoplasma</i>	GATAACGATTCTTATAAGATTGC
		<i>pneumoniae</i>	

40

Ejemplo 4

Amplificación de ADN aislado de muestras de pacientes

45

Se amplificaron los ADN aislados de cultivo bacteriano o muestras clínicas de pacientes usando el método convencional descrito a continuación.

50

Se aísla el ADN de la muestra a analizar (un cultivo bacteriano o una muestra clínica de paciente) usando el QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Alemania). Cuando se ha aislado el ADN, se amplifica la cadena diana deseada usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) asimétrica. En la primera fase de la amplificación, se prepara una solución de reacción mezclando junto el ADN aislado de muestras, mezclas de cebadores gB1F y gB2R de amplio intervalo (Ejemplo 1), y otros componentes necesarios en la amplificación.

55

La mezcla de reacción de PCR contiene 32 pmol de mezcla de cebador gB2R, 8 pmol de mezcla de cebador gB1F, 200 μ M de cada dATP, dGTP y dTTP así como dCTP 140 μ M (Sigma, USA), tampón de PCR Hot Start Taq 1 x (Qiagen, Alemania), en el que se ha añadido $MgCl_2$ de modo que la concentración final sea 2,8 mM, 25 nmol de Cy5-AP3-dCTP (Amersham Pharmacia Biotech, USA), DMSO al 7,5% (Amersham Pharmacia Biotech, USA), 2,5 U de ADN polimerasa Hot Start Taq (Qiagen, Alemania), y 2,5 μ l de ADN aislado en un volumen total de 25 μ l.

60

La PCR se realiza usando el termociclador GenAmp PCR system 2700 (Applied Biosystems, USA). Se usa el siguiente programa de PCR: una etapa de desnaturalización de 15 minutos a 95°C, 40 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 50°C, 1 minuto 72°C, y finalmente una etapa de extensión de 10 minutos a 72°C. Después de que se haya realizado la PCR, se verifica el éxito de la amplificación por electroforesis en gel usando un gel de agarosa al 2% que contiene bromuro de etidio. Después de esto se purifica el producto de PCR marcado con Cy5 retirando los cebadores, nucleótidos, tampón y enzima polimerasa adicionales con un kit de purificación QIAquick (Qiagen, Alemania).

65

Ejemplo 5

El diseño y funcionamiento de las microseries de muestras

- 5 Se disolvieron sondas oligonucleotídicas aminadas en el extremo 5' (diseñadas de acuerdo con el Ejemplo 3) en tampón carbonato sódico 400 mM (pH 9,0) a una concentración final de 50 μ M. Las sondas se unieron covalentemente en los portaobjetos de microscopio recubiertos con aminosilano (Genorama, Asper Biotech Ltd., Estonia). Se realizó la transferencia de las sondas a los portaobjetos de vidrio con un robot desarrollado para este propósito (OmniGrid, GeneMachines, USA) y pins (Telechem SMP3, USA). El tamaño medio del área de sonda aplicada era 120 μ m.
- 10 Además, se aplicaron cebadores de control positivo aminados en el extremo 5' en los portaobjetos de vidrio. Después de la aplicación los portaobjetos de microserie se mantuvieron en vapor de amoníaco durante 1 hora para unir las sondas a los portaobjetos. Después del tratamiento con amoníaco se lavaron tres veces con agua estéril y se secaron.

- 15 A continuación, se hibridó la cadena diana marcada con Cy5 (fabricada de acuerdo con el Ejemplo 4) al portaobjetos de microscopio donde se habían unido las sondas. La mezcla de reacción de hibridación contenía aproximadamente 200-300 ng de cadena diana, 20 x SSC (1 μ l de 20 x SSC contiene 175,3 g de NaCl y 88,2 g de citrato sódico, el pH está ajustado a 7,0 con HCl; la concentración final es 3,4x), dodecil sulfato sódico al 20% (SDS) (una concentración final del 0,3%), y agua estéril para que el volumen de la mezcla de reacción fuera 37 μ l. Primero se desnaturalizó la mezcla a 95°C durante 3 minutos. Después de esto se transfirieron inmediatamente los tubos a hielo. Después de que
- 20 se hubiera enfriado la mezcla, se pipeteó en el cubreobjetos que se había colocado contra el portaobjetos de vidrio en el que se habían unido las sondas. El portaobjetos de microserie se colocó en el interior de la cámara de hibridación (Arraylt, TeleChem International, USA) y se cerró herméticamente la cámara. Finalmente, se sumergió la cámara de hibridación en un baño agua. Los portaobjetos de microserie se hibridaron a 57°C durante 12 - 16 horas.

- 25 Después de la hibridación se lavaron los portaobjetos de microserie en tres soluciones de lavado diferentes para retirar el ADN no hibridado. Las etapas de lavado se realizaron del siguiente modo: solución de SDS al 0,1% durante 5 minutos a 57°C, en SDS al 0,1%, solución de lavado 0,5xSSC durante 5 minutos a temperatura ambiente, y en 0,06xSSC durante 5 minutos a temperatura ambiente.

- 30 Después de que se hubieran secado los portaobjetos de vidrio, se analizaron con un escáner de microserie (Agilent DNA Microarray Scanner, Agilent, USA). Si la cadena diana marcada con Cy5 se había unido a una o varias sondas, estas manchas emitían una señal fluorescente. Además, las sondas de control positivo también daban una señal fluorescente.

- 35 Se presenta un ejemplo de un resultado de hibridación en la Figura 2. Se usó un fragmento de ADN de *gyrB* (un producto de PCR marcado con Cy5 asimétrico) aislado de un aislado de cultivo de *Staphylococcus aureus* como cadena diana. Este portaobjetos de ejemplo incluía cuatro oligonucleótidos *gyrB* que son específicos para *Staphylococcus aureus* (Tabla 4B: oligonucleótidos 22 - 25). Todos ellos se unieron específicamente a la cadena diana de *Staphylococcus aureus* y dieron una señal fluorescente. Además, los cinco oligonucleótidos de control positivo dieron una señal fluorescente.
- 40

Ejemplo 6

Análisis de muestras de pacientes

- 45 Se aisló el ADN de muestras clínicas obtenidas de pacientes que padecen infecciones del tracto respiratorio y se amplificaron usando el método descrito en el Ejemplo 4. Se ensayaron las muestras usando el portaobjetos de microserie (descrito en el Ejemplo 5) en el que se unieron las sondas y los oligonucleótidos de control positivo (enumerados en la Tabla 4A y 4B). Las mismas muestras también se analizaron con el método basado en PCR de amplio intervalo, como se ha descrito anteriormente en Nikkari *et al.* (Emerging Infectious Disease, vol. 8, n° 2, 2002, s. 188 - 194) y Kotilainen *et al.* (Journal of Clinical Microbiology, vol. 36, n° 8, 1998, s. 2205 - 2209).
- 50

- Se usaron cebadores de amplio intervalo que se originan a partir del área del gen de ARNr 16S en el método de PCR bacteriana de amplio intervalo. Se llamaron cebadores fD1 mod y 16S1RR-B en publicaciones anteriores. El producto de PCR se clonó y secuenció. La secuencia de ADN se comparó con bases de datos de secuencia públicas (GenBank) y de este modo se identificó la especie bacteriana. Los resultados se presentan en la Tabla 5.
- 55

- Como puede observarse a partir de la Tabla 5, los resultados obtenidos con el método de la invención son completamente idénticos cuando se comparan con el método de PCR de amplio intervalo convencional. El método definido por la presente invención es sustancialmente más rápido de realizar, ya que los resultados están disponibles en aproximadamente un día. Por otro lado, lleva aproximadamente una semana de media realizar la PCR bacteriana de amplio intervalo incluyendo las etapas de clonación y secuenciación que consumen mucho tiempo. En comparación con el ensayo de cultivo, tanto el método de la presente invención como la PCR bacteriana de amplio intervalo resultaron ser tan sensibles como el cultivo e incluso más sensibles en algunos casos.
- 60

65

TABLA 5

Comparación entre los diferentes métodos usando muestras de paciente

Cuadro clínico	Muestra	Resultado de cultivo	PCR de amplio intervalo	El método de la invención
Tonsilitis	Tejido	sin información	F.N.	F.N
Neumonía 1)	Espuito	no cultivado	sin información	S.P.
Otitis media	Pus	H.I	H.I. y M.C.	H.I. y M.C.
Otitis media	Pus	S.P	S.P.	S.P.
Otitis media	Pus	negativo	H.I.	H.I.
Otitis media	Pus	H.I.	H.I.	H.I.
Otitis media	Pus	H.I., S.P.	H.I., M.C. y S.P.	H.I., M.C. y S.P.
Sinusitis maxilar	Pus	H.I.	H.I.	H.I.
Sinusitis maxilar	Pus	negativo	H.I.	H.I.
<p>F. N. = <i>Fusobacterium necrophorum</i></p> <p>S.P. = <i>Streptococcus pneumoniae</i></p> <p>H.I. = <i>Haemophilus influenzae</i></p> <p>M.C. = <i>Moraxella catarrhalis</i></p> <p>1) El cultivo bacteriano y la PCR de amplio intervalo no se realizaron de la muestra aislada del paciente que padece neumonía, solamente se realizó el método de la presente invención. Con este método se encontró <i>Streptococcus pneumoniae</i> de la muestra. Este resultado es compatible con el cuadro clínico, ya que esta especie bacteriana es uno de los agentes causantes más habituales de neumonía.</p>				

Ejemplo 7

Comparación entre el método de la presente invención y un método conocido que se basa en oligonucleótidos específicos

La identificación de múltiples patógenos bacterianos se altera por las bacterias de la flora normal. La presencia de estas bacterias es necesaria para la salud de un organismo humano, y se ha estimado que cientos de bacterias diferentes pertenecen a la flora normal humana. Por tanto, las bacterias de la flora normal pueden en muchos casos alterar los diagnósticos bacterianos.

La especificidad del método de la presente invención, en el que se usan sondas oligonucleotídicas *gyrB/parE* específicas, se estudió con respecto a la flora normal. Simultáneamente, se comparó el método con un método de PCR múltiple donde se usa una mezcla de cebadores de amplio intervalo y específicos de especie para la amplificación.

Se aisló el ADN de aislado de cultivo de las bacterias de la flora normal *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Moraxella caviae*, y *Moraxella cuniculi*. Después de esto, se amplificó el ADN aislado usando el método descrito en el Ejemplo 4 y se ensayó usando el portaobjetos de microserie (descrito en el Ejemplo 5), en el que se habían unido sondas específicas (presentadas en la Tabla 4A y 4B). Para comparación, se sintetizaron cebadores de PCR específicos descritos en la publicación de Hendolin *et al.* (Journal of Clinical Microbiology, 35: 11, 1997) y se realizó una variante de la PCR múltiple usando el método descrito en esta publicación. En esta variante del método de PCR múltiple convencional se usa el cebador de amplio intervalo que se origina a partir de la región génica conservada de ARNr 16S como un cebador de PCR y se usa la mezcla de cebadores que consta de cuatro cebadores específicos de especie diferentes como otro cebador de PCR. Las especies bacterianas a diagnosticar con este cebador fueron *Alloio-*
coccus otitis, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, y *Streptococcus pneumoniae*. Se diseñaron cebadores específicos de especie de modo que el producto de PCR amplificado difiera en longitud dependiendo de qué especie bacteriana se haya aislado. Los resultados se presentan en la Tabla 6.

Los resultados demuestran que con el método de la presente invención en el que se usan sondas oligonucleotídicas específicas, sólo se identifican específicamente las especies bacterianas deseadas. En su lugar, los cebadores específicos definidos por el método conocido y el método de PCR múltiple no pueden distinguir las bacterias deseadas de las bacterias estudios de la flora normal, y por tanto no son suficientemente específicos (Figura 3).

TABLA 6

Comparación entre el método de la presente invención y el método de PCR múltiple

Especie bacteriana	*) Sondas en las que se unieron (especificidad)	Resultado de PCR múltiple
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4B: 10 - 14 (Strep. pneu)	Se amplificó <i>Strep. pneu.</i> con cebadores específicos
<i>Streptococcus pyogenes</i>	4A: 1 - 4 (Strep. pneu) 4B: 5 - 9 (Strep. Pyo) 4A: 5 - 7 (Strep. Pyo)	No se amplificó <i>Strep. pneu.</i> con cebadores específicos
<i>Streptococcus oralis</i>	Sin unión	Se amplificó <i>Strep. pneu.</i> con cebadores específicos
<i>Streptococcus mitis</i>	Sin unión	Se amplificó <i>Strep. pneu.</i> con cebadores específicos
<i>Moraxella catarrhalis</i>	4A: 39 - 42 (Morax. Catarr)	Se amplificó <i>Morax. cat.</i> con cebadores específicos
<i>Moraxella cuniculi</i>	Sin unión	Se amplificó <i>Morax. cat.</i> con cebadores específicos
<i>Moraxella caviae</i>	Sin unión	Se amplificó <i>Morax. cat.</i> con cebadores específicos
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	4A: 30 - 33 (<i>Neisseria gon.</i>)	No se amplificó <i>Morax. cat.</i> con cebadores específicos
*) 4A significa Tabla 4A y 4B Tabla 4B. Los números (por ejemplo 10 a 14) se refieren a las cantidades de oligonucleótidos en las Tablas mencionadas previamente. La especificidad indica para qué especie bacteriana se han diseñado las sondas oligonucleotídicas.		

REIVINDICACIONES

1. Un método de diagnóstico para detectar e identificar especies bacterianas que causan infecciones a partir de una muestra clínica, **caracterizado** porque

a) amplifica un ADN aislado de dicha muestra clínica usando una mezcla de cebadores de ADN que comprende secuencias que hibridan con las secuencias que se originan a partir de regiones conservadas de genes que codifican topoisomerasas, especialmente *gyrB/parE*, de especies bacterianas que causan dichas infecciones, comprendiendo dichas secuencias las SEC ID N° 76 y 77 o con secuencias complementarias de las mismas.

b) pone en contacto el ADN amplificado con una combinación deseada de secuencias de sonda oligonucleotídica que hibrida en condiciones de hibridación normal con regiones hipervariables situadas cerca de dichas regiones conservadas de genes que codifican topoisomerasas, especialmente *gyrB/parE*, de especies bacterianas que causan dichas infecciones, siendo dichas secuencias específicas de especie bacteriana en dichas condiciones de hibridación, y

c) detecta la formación de un posible complejo de hibridación.

2. El método de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque dichas especies bacterianas que causan infecciones son especies bacterianas que causan infecciones del tracto respiratorio.

3. El método de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque dicha región hipervariable es la región hipervariable del gen que codifica la proteína *gyrB* y/o *parE* de una especie bacteriana seleccionada entre *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Escherichia coli*, *Moraxella catarrhalis*, *Legionella pneumophila*, y *Fusobacterium necrophorum*.

4. El método de diagnóstico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque la longitud de la secuencias de sonda oligonucleotídica usadas en la etapa b) es de 15 - 30, más preferiblemente 20 - 30, y mucho más preferiblemente de 21 - 25 nucleótidos.

5. El método de diagnóstico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque dicha combinación de secuencias de sonda oligonucleotídica comprende todo o parte de las SEC ID N° 1 a 69, y/o secuencias complementarias de las mismas.

6. El método de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado** porque dicha combinación de secuencias de sonda oligonucleotídica comprende todas las SEC ID N° 1 a 69.

7. El método de diagnóstico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque dicha combinación de secuencias de sonda oligonucleotídica está unida en un soporte sólido.

8. El método de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque el ADN aislado de la muestra clínica en la etapa a) se amplifica usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el ADN amplificado en la etapa b) se pone en contacto con sondas oligonucleotídicas específicas de especie bacteriana unidas en un soporte sólido.

9. El método de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, **caracterizado** porque dicho soporte sólido es vidrio tratado.

10. El método de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque se usan nucleótidos marcados adecuadamente en la amplificación de ADN aislado de una muestra clínica en la etapa a) para generar una cadena diana detectable.

11. El método de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado** porque el ADN diana amplificado y opcionalmente marcado en la etapa b) se pone en contacto con un soporte sólido, en el que se han unido todas las sondas oligonucleotídicas específicas de especie bacteriana SEC ID N° 1 a 69 y/o secuencias complementarias de las mismas.

12. El método de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado** porque el ADN diana amplificado y opcionalmente marcado en la etapa b) se pone en contacto con un soporte sólido en el que se han unido las secuencias de sonda oligonucleotídica que detectan una especie bacteriana específica o unas pocas especies bacterianas especificadas que causan infecciones, seleccionándose dichas secuencias entre las SEC ID N° 1 a 4 y 61 a 65 de *Streptococcus pneumoniae*, 5 a 7 y 56 a 60 de *Streptococcus pyogenes*, 8 a 14 de *Chlamydia pneumoniae*, 15 a 16 y 66 a 69 de *Mycoplasma pneumoniae*, 17 a 20 de *Haemophilus influenzae*, 21 a 25 y 51 a 55 de *Staphylococcus aureus*, 26 a 29 de *Pseudomonas aeruginosa*, 30 y 33 de *Neisseria gonorrhoeae*, 34 a 38 de *Escherichia coli*, 39 a 42 de *Moraxella catarrhalis*, 43 a 47 de *Legionella pneumophila* y 48 y 50 de *Fusobacterium necrophorum*, y/o secuencias complementarias de las mismas.

13. El método de diagnóstico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, **caracterizado** porque se usa la tecnología de microserie en la etapa c).

14. Una mezcla de cebador de ADN, **caracterizado** porque comprende secuencias que hibridan con secuencias de las regiones conservadas de genes que codifican topoisomerasas, especialmente las proteínas *gyrB* y/o *parE* de especies bacterianas que causan infecciones, especialmente especies bacterianas que causan infecciones del tracto respiratorio, comprendiendo dicha mezcla las SEC ID N° 76 y 77 y/o secuencias invertidas o complementarias de las mismas.

15. Una secuencia oligonucleotídica útil en el diagnóstico de especies bacterianas que causan infección, **caracterizada** porque hibrida en condiciones de hibridación normales con una secuencia de una región hipervariable que es específica de especie bacteriana y está situada cerca de las regiones conservadas de genes que codifican topoisomerasas, especialmente las proteínas *gyrB* y/o *parE*, siendo dicha secuencia oligonucleotídica una de las SEC ID N° 1 a 69 y/o secuencias complementarias de las mismas.

16. La combinación de secuencias de sonda oligonucleotídica útil en el diagnóstico de especies bacterianas que causan infección, **caracterizada** porque comprende cualquier combinación de las SEC ID N° 1 a 69 y/o secuencias complementarias de las mismas.

17. La combinación de sondas oligonucleotídicas de acuerdo con la reivindicación 16, **caracterizada** porque comprende todas las SEC ID N° 1 a 69.

18. El uso de la combinación de sondas oligonucleotídicas de acuerdo con la reivindicación 16 ó 18 para la detección, identificación o clasificación de especies bacterianas que causan infección.

19. Un kit de diagnóstico para su uso en el diagnóstico de bacterias que causan infección, especialmente las causan infecciones del tracto respiratorio, **caracterizado** porque comprende

a) una mezcla de cebadores de ADN que comprende secuencias que hibridan con secuencias de las regiones conservadas de genes que codifican topoisomerasa, especialmente las proteínas *gyrB* y/o *parE* de especies bacterianas que causan infecciones, especialmente especies bacterianas que causan infecciones del tracto respiratorio, comprendiendo dicha mezcla las SEC ID N° 76 y 77 y/o secuencias complementarias de las mismas de la invención como se ha definido anteriormente,

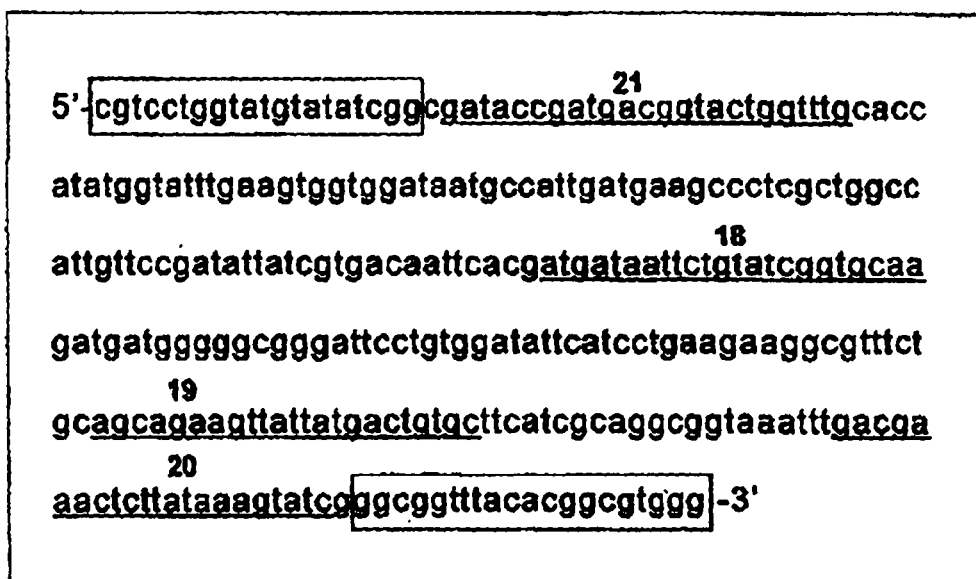
b) una combinación de secuencias de sonda oligonucleotídica específicas de especie bacteriana, opcionalmente unidas en un soporte sólido, que comprende cualquier combinación de las SEC ID N° 1 a 69 y/o secuencias inversas o complementarias de las mismas,

c) secuencias de sonda de control positivo y opcionalmente negativo, y opcionalmente

d) reactivos necesarios en las etapas de amplificación, hibridación, purificación, lavado y/o detección.

Fig. 1.

A. Producto de amplificación de *gyrB* de *Haemophilus influenzae*
y la localización de las sondas



B. El producto de amplificación de *gyrB* de *Moraxella catarrhalis*
y la localización de las sondas

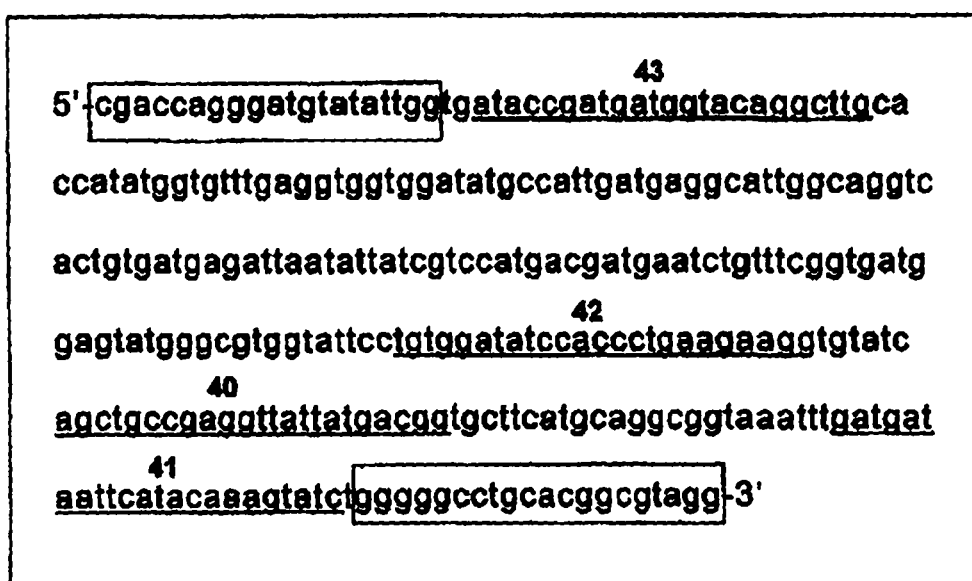
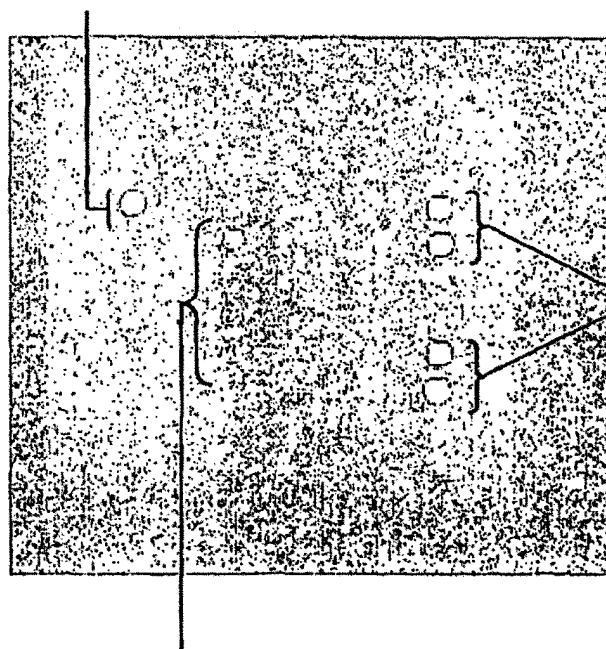


Fig. 2

Control positivo



Controles positivos

Oligonucleótidos de *gyrB* positivos a *Staphylococcus aureus*
(4 pcs., Tabla 4B: oligonucleótidos 21 - 24)

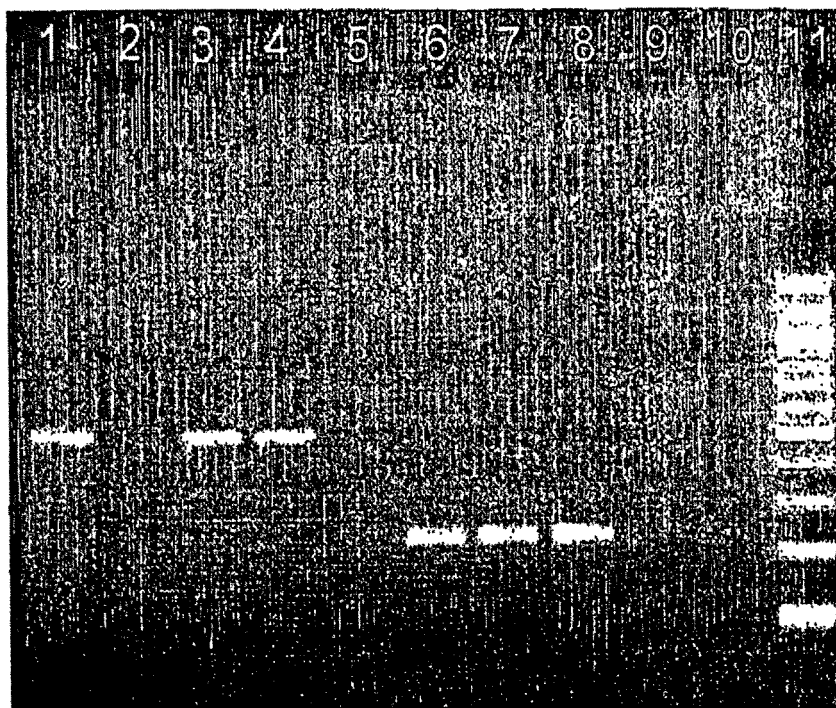


Fig. 3

1. *Streptococcus pneumoniae*
2. *Streptococcus pyogenes*
3. *Streptococcus oralis*
4. *Streptococcus mitis*
5. Negative control
6. *Moraxella catarrhalis*
7. *Moraxella cuniculi*
8. *Moraxella caviae*
9. *Neisseria gonorrhoeae*
10. Control negativo
11. Marcador de tamaño

ES 2 285 211 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> MoBiDiag Oy	
5	<120> Sondas de ácido nucleico, cebadores de amplio espectro y métodos en los que se usan	
	<130> 2022264FI	
10	<160> 77	
	<170> PatentIn versión 3.1	
15	<210> 1	
	<211> 23	
	<212> ADN	
20	<213> <i>Streptococcus pneumoniae</i>	
	<400> 1	
25	ctcaaaagaa ggtcttcacc atc	23
	<210> 2	
	<211> 23	
	<212> ADN	
30	<213> <i>Streptococcus pneumoniae</i>	
	<400> 2	
35	gccatattca agtttttatt gag	23
	<210> 3	
	<211> 23	
40	<212> ADN	
	<213> <i>Streptococcus pneumoniae</i>	
	<400> 3	
45	agccagatga ttcgattact gtt	23
	<210> 4	
50	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> <i>Streptococcus pneumoniae</i>	
55	<400> 4	
	ttgagaccgt ctttacagtc ctt	23
60	<210> 5	
	<211> 23	
	<212> ADN	
65	<213> <i>Streptococcus pyogenes</i>	

ES 2 285 211 T3

	<400> 5		
	gtttgcctc tcatattaaa gtc	23	
5	<210> 6		
	<211> 23		
	<212> ADN		
10	<213> <i>Streptococcus pyogenes</i>		
	<400> 6		
15	tctttattga agcagataat tcc	23	
	<210> 7		
	<211> 23		
20	<212> ADN		
	<213> <i>Streptococcus pyogenes</i>		
	<400> 7		
25	cgttgaaaca gttttacag tct	23	
	<210> 8		
30	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> <i>Chlamydia pneumoniae</i>		
35	<400> 8		
	ggtcttcac atctagtcta tga	23	
40	<210> 9		
	<211> 23		
	<212> ADN		
45	<213> <i>Chlamydia pneumoniae</i>		
	<400> 9		
	ggttgtagac wacagcattg acg	23	
50	<210> 10		
	<211> 23		
	<212> ADN		
55	<213> <i>Chlamydia pneumoniae</i>		
	<400> 10		
60	agccatggca gsttattgct cta	23	
	<210> 11		
	<211> 23		
65	<212> ADN		
	<213> <i>Chlamydia pneumoniae</i>		

ES 2 285 211 T3

	<400> 11	
	ggattgatgt tsgcatttta gag	23
5	<210> 12	
	<211> 23	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Chlamydia pneumoniae</i>	
	<400> 12	
15	gggtattgtc wtcgtagata atg	23
	<210> 13	
	<211> 22	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Chlamydia pneumoniae</i>	
	<400> 13	
25	ttattgctct aggattgatg tt	22
	<210> 14	
30	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> <i>Chlamydia pneumoniae</i>	
35	<400> 14	
	gcattttaga gsacgggggt att	23
40	<210> 15	
	<211> 24	
	<212> ADN	
45	<213> <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	
	<400> 15	
50	tcaaactaac ccttaaagac aact	24
	<210> 16	
	<211> 23	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	
	<400> 16	
60	tgaaacagtg ttacgggtac tcc	23
	<210> 17	
	<211> 23	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Haemophilus influenzae</i>	

ES 2 285 211 T3

	<400> 17	
	atgataattc tgtatcggtg caa	23
5	<210> 18	
	<211> 23	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Haemophilus influenzae</i>	
	<400> 18	
15	agcagaagtt attatgactg tgc	23
	<210> 19	
	<211> 23	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Haemophilus influenzae</i>	
	<400> 19	
25	gacgataact cttataaagt atc	23
	<210> 20	
30	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> <i>Haemophilus influenzae</i>	
35	<400> 20	
	gataccgatg aeggtactgg ttg	24
40	<210> 21	
	<211> 23	
	<212> ADN	
45	<213> <i>Staphylococcus aureus</i>	
	<400> 21	
50	agtggtgggaa attgtcgata ata	23
	<210> 22	
	<211> 25	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Staphylococcus aureus</i>	
	<400> 22	
60	tgaagttgtt attgaaaaag ataac	25
	<210> 23	
	<211> 23	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Staphylococcus aureus</i>	

ES 2 285 211 T3

	<400> 23	
	ggattaaagt aacggataac gga	23
5	<210> 24	
	<211> 24	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Staphylococcus aureus</i>	
	<400> 24	
15	ctgtcgaagt tattttaact gttt	24
	<210> 25	
	<211> 23	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Staphylococcus aureus</i>	
	<400> 25	
25	cgacttcaga gagaggttg cac	23
	<210> 26	
30	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
35	<400> 26	
	gaaatcagca tcaccatcca tac	23
40	<210> 27	
	<211> 23	
	<212> ADN	
45	<213> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	<400> 27	
50	atacggatga gtcgatcact gtc	23
	<210> 28	
	<211> 23	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	<400> 28	
60	gacgacaaca cctacaaggt gtc	23
	<210> 29	
	<211> 24	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	

ES 2 285 211 T3

	<400> 29	
	gacaccgacg atggcaccgg tctg	24
5	<210> 30	
	<211> 23	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	
	<400> 30	
15	ttcgacaaca acagctacaa aat	23
	<210> 31	
	<211> 23	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	
	<400> 31	
25	atatggtgtt tgaagtattg gac	23
	<210> 32	
30	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	
35	<400> 32	
	gacaaaatca cggtaacgat aca	23
40	<210> 33	
	<211> 23	
	<212> ADN	
45	<213> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	
	<400> 33	
	gacaacaaca gctacaaaat etc	23
50	<210> 34	
	<211> 23	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Escherichia coli</i>	
	<400> 34	
60	tattcgaggt ggtagataac gct	23
	<210> 35	
	<211> 23	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Escherichia coli</i>	

ES 2 285 211 T3

	<400> 35	
	ttcacgccga taactctgtc tct	23
5	<210> 36	
	<211> 23	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Escherichia coli</i>	
	<400> 36	
15	cgccgataac tctgtctctg tac	23
	<210> 37	
	<211> 23	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Escherichia coli</i>	
	<400> 37	
25	gacgataact cctataaagt gtc	23
	<210> 38	
30	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> <i>Escherichia coli</i>	
35	<400> 38	
	gacacggatg acggcaccgg tctg	24
40	<210> 39	
	<211> 23	
	<212> ADN	
45	<213> <i>Moraxella catarrhalis</i>	
	<400> 39	
50	agctgccgag gttattatga cgg	23
	<210> 40	
	<211> 23	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Moraxella catarrhalis</i>	
	<400> 40	
60	gatgataatt catacaaagt atc	23
	<210> 41	
	<211> 23	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Moraxella catarrhalis</i>	

ES 2 285 211 T3

	<400> 41	
	tgtggatgc caccctgaag aag	23
5	<210> 42	
	<211> 23	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Moraxella catarrhalis</i>	
	<400> 42	
15	ataccgatga tggtagcggc ttg	23
	<210> 43	
	<211> 23	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Legionella pneumophila</i>	
	<400> 43	
25	gatgataatt cctacaaggt atc	23
	<210> 44	
30	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> <i>Legionella pneumophila</i>	
35	<400> 44	
	agcagccgaa gtcacatga cag	23
40	<210> 45	
	<211> 23	
	<212> ADN	
45	<213> <i>Legionella pneumophila</i>	
	<400> 45	
50	tgtagatatt cataaagaag aag	23
	<210> 46	
	<211> 23	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Legionella pneumophila</i>	
	<400> 46	
60	atacagatga tggaaccggt ttg	23
	<210> 47	
65	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> <i>Legionella pneumophila</i>	

ES 2 285 211 T3

	<400> 47	
	cagatgatgg aaccggttg cat	23
5	<210> 48	
	<211> 23	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Fusobacterium necrophorum</i>	
	<400> 48	
15	caacatcagc caggggatta cat	23
	<210> 49	
	<211> 23	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Fusobacterium necrophorum</i>	
	<400> 49	
25	ggaattccag tagacataca tcc	23
	<210> 50	
30	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> <i>Fusobacterium necrophorum</i>	
35	<400> 50	
	tgaaaatgat aactataag tgc	24
40	<210> 51	
	<211> 23	
	<212> ADN	
45	<213> <i>Staphylococcus aureus</i>	
	<400> 51	
50	cggtaacgaa atagatgtaa caa	23
	<210> 52	
	<211> 23	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Staphylococcus aureus</i>	
	<400> 52	
60	agaagataat ggacgtggta tgc	23
	<210> 53	
	<211> 23	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Staphylococcus aureus</i>	

ES 2 285 211 T3

	<400> 53	
	gtaaaccgac agtcgaagtt atc	23
5	<210> 54	
	<211> 24	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Staphylococcus aureus</i>	
	<400> 54	
15	caactgataa acggggatta catc	24
	<210> 55	
	<211> 23	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Staphylococcus aureus</i>	
	<400> 55	
25	ggacaaggcg gctataaaac ttc	23
	<210> 56	
30	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> <i>Streptococcus pyogenes</i>	
35	<400> 56	
	tggagatgat attaaggttg tta	23
40	<210> 57	
	<211> 23	
	<212> ADN	
45	<213> <i>Streptococcus pyogenes</i>	
	<400> 57	
50	gtcagtggtg cagatagcgg acg	23
	<210> 58	
	<211> 23	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Streptococcus pyogenes</i>	
	<400> 58	
60	ggattccac cgtcaagtt att	23
	<210> 59	
	<211> 23	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Streptococcus pyogenes</i>	

ES 2 285 211 T3

	<400> 59	
	caacagatgc tacgggattg cac	23
5	<210> 60	
	<211> 23	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Streptococcus pyogenes</i>	
	<400> 60	
15	ggtcagggtg gctacaaaac gtc	23
	<210> 61	
	<211> 23	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Streptococcus pneumoniae</i>	
	<400> 61	
25	tggtgatcgt attgatgtaa cta	23
	<210> 62	
30	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> <i>Streptococcus pneumoniae</i>	
35	<400> 62	
	ctaacggte aagaccatgg acg	23
40	<210> 63	
	<211> 23	
	<212> ADN	
45	<213> <i>Streptococcus pneumoniae</i>	
	<400> 63	
50	gaattccaac tgttgaggtt atc	23
	<210> 64	
	<211> 23	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Streptococcus pneumoniae</i>	
	<400> 64	
60	cgaccgatgg cgctgggtctt cat	23
	<210> 65	
	<211> 23	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Streptococcus pneumoniae</i>	

ES 2 285 211 T3

	<400> 65	
	ggccaaggtg gctataagac atc	23
5	<210> 66	
	<211> 23	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	
	<400> 66	
15	tgctaatact attgccgttg ttt	23
	<210> 67	
	<211> 23	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	
	<400> 67	
25	ataactgtta gtgacaacgg tcg	23
	<210> 68	
30	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	
35	<400> 68	
	agatttctac gattgacacc gtc	23
40	<210> 69	
	<211> 23	
	<212> ADN	
45	<213> <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	
	<400> 69	
50	gataacgatt cttataagat tgc	23
	<210> 70	
	<211> 294	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Moraxella catarrhalis</i>	
60		
65		

ES 2 285 211 T3

<400> 70

```

5      cgaccagggg tgtatattgg tgataccgat gatggtacag gcttgcacca tatggtgttt      60
      gaggtggtgg ataatgccat tgatgaggca ttggcaggtc actgtgatga gattaatatt      120
      atcgtocatg acgatgaatc tgtttcgggtg atggaotatg ggcgtgggtat tcctgtggat      180
10     atccaccctg aagaagggtgt atcagctgcc gaggttatta tgacggtgct tcatgcagga      240
      ggtaaatttg atgataattc atacaaagta tctggggggcc tgcacggcgt agga      294

```

15 <210> 71

<211> 257

<212> ADN

<213> *Legionella pneumophila*

20

<400> 71

```

25     ggggatacag atgatggaac cggtttgcac cacatggttt ttgaggttgt agataattca      60
      atagatgagt ctctggcagg atattgcaag gaaatttttg ttaccatcca tagcgatgag      120
      tcaattacag ttaaggacga tggccgtggg attcctgtag atattcataa agaagaaggc      180
30     aaatcagcag ccgaagtcac catgacagtc ctacatgctg gaggtaaatt tgatgataat      240
      tcctacaagg tatctggg                        257

```

35 <210> 72

<211> 290

<212> ADN

<213> *Fusobacterium necrophorum*

40

<400> 72

```

45     cgcccagggg tgtacatcgg aacaacatca gccaggggat tacatcattt agtatgggaa      60
      gtggtagata attctgtgga tgaagcattt gctgggtatt gtaataggat tactgtaagt      120
      attttgcctg ataacattat tcaagtagag gataatggaa gaggaattcc agtagacata      180
50     catccaaaat atggaaaatc cgctttggaa attgtattga cggattaca tgctggggga      240
      aaatttgaaa atgataacta taaagtgtca ggtggactgc acggagttgg      290

```

55

<210> 73

<211> 291

<212> ADN

60

<213> *Streptococcus mitis*

<220>

<221> misc_feature

65

<222> (18)..(18)

<223> n es a, t, c, o g

ES 2 285 211 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (288).. (288)
 5 <223> n es a, t, c, o g

 <400> 73
 10 agtcccgagg tgtacatngg gtcaacttca aaagaaggtc ttcaccatct agtctgggaa 60
 attggtgata actcaattga cgaggccttg gcaggatttg ctagccatat tcaagtcttt 120
 attgagccag ataattogat tacagttgtt gatgatggac gtggtatccc agtcgatatt 180
 15 caggaaaaaa caggtcgacc tgcggttgag actgtcttta ctgttcttca cgtcggagga 240
 aagtttggcg gtggcgagata taaggctctca gacggctctc atggcgtnng a 291

 20 <210> 74
 <211> 288
 <212> ADN
 25 <213> *Streptococcus oralis*

 <400> 74
 30 agaccgggga tgtatatagg atcgaccgac ggtgctggtc tccatcatct agtctgggaa 60
 atcgtggata atgagggtga cgaagccttg totggatttg gtgatogcat cgatgtgacg 120
 attaataagg acgggagttt aacgggttcaa gaccacggac gtgggatgac aacgggaatg 180
 35 caogcoatgg gaattccaac tgttgaagtt atctttacca ttctccacgc tggaggga 240
 ttccgtcaag gtggctataa gacatctggt ggtctgcatg gggttgga 288

 40 <210> 75
 <211> 294
 <212> ADN
 <213> *Haemophilus parainfluenzae*
 45 <400> 75
 agaccgggga tgtatatcgg ggataccgat gatggaacag gcctacacca tatggtgttt 60
 50 gaggtggtgg ataacgctat cgatgaagcg ottgctggct attgttcga tattatcgtc 120
 actattcatg atgataattc tgtttccgta caagatgacg gccgcggtat tccggtagat 180
 attcaccocag aagaaggggt ttctgoggca gaagcaatca tgacagtaet tcacgoaggt 240
 55 ggtaaattcg atgataactc ttataaagta tcagggggac tacacggcgt tgga 294

 <210> 76
 60 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 65 <220>
 <223> cebador

ES 2 285 211 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6) .. (6)
 5 <223> w es a o t

 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (9)..(9)
 <223> k es g o t

 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> y es c o t

 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 25 <223> h es a, c o t

 <400> 76

 30 cgtccwggka tgtayathgg

 <210> 77
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 40 <223> cebador

 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (3) .. (3)
 <223> h es a, c o t

 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> r es a o g

 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 60 <223> r es a o, g

 <220>
 <221> misc_feature
 65 <222> (12)..(12)
 <223> w es a o t

20

ES 2 285 211 T3

	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (15)..(15)	
5	<223> w es a o t	
	<220>	
	<221> misc_feature	
10	<222> (18)..(18)	
	<223> d es a, g o t	
	<400> 77	
15	cchacrcert gwaawccdcc	20
20		
25		
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		