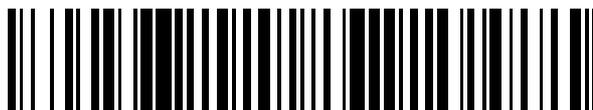


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 426 038**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/00** (2006.01)

**C12N 15/09** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2007 E 07714581 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2013 EP 1997886**

54 Título: **Procedimiento rápido para identificar el microorganismo causante de una enfermedad infecciosa**

30 Prioridad:

**21.02.2006 JP 2006043469**

**12.10.2006 JP 2006278371**

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

**18.10.2013**

73 Titular/es:

**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION  
UNIVERSITY OF TOYAMA (100.0%)  
3190, GOFUKU, TOYAMA-SHI  
TOYAMA 9308555, JP**

72 Inventor/es:

**NIIMI, HIDEKI y  
KITAJIMA, ISAO**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

**ES 2 426 038 T3**

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

**DESCRIPCION**

Procedimiento rápido para identificar el microorganismo causante de una enfermedad infecciosa.

**CAMPO TÉCNICO**

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la detección e identificación rápida de bacterias patógenas para tratar una infección (especialmente una septicemia) en fase temprana.

**ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA**

La septicemia es una infección sistémica grave. Es indispensable detectar e identificar la bacteria patógena en sangre para el diagnóstico definitivo de septicemia.

10 En los últimos años ha aumentado el número de pacientes graves que es probable que desarrollen septicemia con el avance de tratamientos médicos como la terapia para el cáncer y el trasplante de órganos.

15 Las bacterias multirresistentes como el *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) pueden causar septicemia desde el punto de vista de la infección nosocomial. Para seleccionar un fármaco antimicrobiano apropiado que salve la vida del paciente, es importante detectar e identificar la bacteria patógena en sangre tan pronto como sea posible en la práctica clínica.

Sin embargo, puesto que el procedimiento actual de detección microbiológica necesita al menos 18 horas para identificar la bacteria tras el envío de una botella de cultivo de sangre, es necesario realizar tratamiento provisional hasta obtener el resultado. Por tanto, el fármaco antimicrobiano se ha seleccionado necesariamente a ciegas.

20 Como resultado, pueden surgir bacterias multirresistentes debido al uso de un fármaco antimicrobiano de amplio espectro, o una situación en la que la vida del paciente séptico no pueda salvarse debido a que puede producirse una selección inadecuada del fármaco antimicrobiano.

25 Se ha descrito un procedimiento en el que se amplifica el ADN de la bacteria patógena responsable de la septicemia mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se hibrida el ADN amplificado de la bacteria patógena con una sonda nucleotídica específica de la especie bacteriana diana determinada provisionalmente para detectar e identificar la bacteria patógena (Documento de Patente 1).

También se ha desarrollado la tecnología de PCR en tiempo real para conseguir una detección e identificación inmediatas (Documento de no Patente 1).

[Documento de Patente 1] JP-A-6-90799

30 [Documento de no Patente 1) Journal of Analytical Bio-Science, Vol. 28, N.º 5 (2005), págs. 400 a 404

En el documento WO 01/48237 se describe un procedimiento para detectar rápidamente el ADN bacteriano en una muestra mediante la técnica de PCR. En el documento se menciona el uso del análisis de la temperatura de fusión para una clasificación previa aproximada, por ejemplo, en bacterias gram positivas y gram negativas.

35 **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

El principio básico de este procedimiento de exploración de la septicemia es la PCR en tiempo real usando una sonda de hibridación.

40 Sin embargo, es necesario preparar una sonda de hibridación específica para cada especie bacteriana cuando se utiliza este procedimiento. Por tanto, para identificar un gran número de bacterias patógenas es necesario preparar un gran número de sondas de hibridación.

Específicamente, puesto que el número de especies bacterianas que se detectan está determinado por el número de sondas que hay que preparar, es prácticamente imposible identificar una gama amplia de especies bacterianas.

45 Los inventores de la invención realizaron estudios exhaustivos sobre la aplicación de la diferencia en la temperatura de fusión (valor de T<sub>m</sub>, por sus siglas en inglés) entre las especies bacterianas para

identificar bacterias patógenas según el concepto teórico de que el valor de  $T_m$  viene determinado por la secuencia de bases en el método del vecino más cercano para completar la invención.

5 La invención proporciona un procedimiento para la detección e identificación rápida de bacterias patógenas que comprende extraer el ADN de un microorganismo, someter el ADN como molde a amplificación génica mediante PCR o similar usando un conjunto de cebadores específico y analizar la combinación de las temperaturas de fusión (valores de  $T_m$ ) específicas para el microorganismo o la diferencia entre los valores de  $T_m$ .

Más específicamente, la invención es como se establece en las reivindicaciones adjuntas.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10 En la figura 1 se muestra una banda de un gel de electroforesis en agarosa.

#### MEJOR MODO DE REALIZAR LA INVENCIÓN

La invención se describe en detalle a continuación.

(1) Es sabido que el ARNr 16S de bacterias tiene siete u ocho regiones de secuencia de bases (20 a 40 bases) comunes a prácticamente todas las bacterias.

15 Se desarrollan, respectivamente, un cebador sentido y un cebador complementario para todas o algunas de estas regiones de secuencia de bases para preparar de una a siete regiones de amplificación génica, como se define en las reivindicaciones.

(2) La región de amplificación génica contiene aproximadamente de 150 a 200 bases. La secuencia de bases específica para cada bacteria permanece excluyendo las regiones de conservación comunes para las que se han desarrollado los cebadores.

20 Por tanto, se obtiene el valor de  $T_m$  específico para cada bacteria debido a la diferencia en la secuencia de bases. Se estima que cada bacteria tiene de uno a siete valores de  $T_m$  específicos.

Por tanto, se determinan de uno a siete valores de  $T_m$  correspondientes a cada tipo de bacteria y se almacenan en una base de datos.

25 Las bacterias desconocidas pueden identificarse utilizando la base de datos.

(3) Una infección bacteriana y su tipo (incluyendo SARM) o una infección fúngica y su tipo pueden identificarse usando de uno a seis cebadores específicos de hongos, cebadores spa y mecA para la identificación de SARM en combinación para bacterias patógenas desconocidas.

(4) Cuando se obtiene un producto génico inespecífico y muestra un valor de  $T_m$  próximo al valor de  $T_m$  deseado, puede obtenerse un resultado falso positivo.

30 En este caso, el producto obtenido mediante amplificación génica se coloca en un gel de agarosa y se determina la banda para realizar una doble comprobación del resultado.

Específicamente, la precisión de la exploración puede aumentarse empleando un sistema de doble comprobación utilizando un procedimiento de detección de amplificación génica conocido.

35 (5) Cuando se emplea la PCR en tiempo real como procedimiento de amplificación génica, la cantidad de bacterias puede determinarse relativamente antes y después del tratamiento utilizando la naturaleza cuantitativa de la PCR en tiempo real de modo que el efecto terapéutico puede monitorizarse de forma mejorada.

40 (6) Un aparato de PCR en tiempo real se clasifica como aparato para PCR en tiempo real con bloque calefactor que controla la temperatura usando un bloque calefactor y un aparato con baño de aire que controla la temperatura utilizando aire. Se produce un error en la medición del valor de  $T_m$  de  $\pm 0,1$  a  $0,3$  °C cuando se usa un aparato de PCR en tiempo real con bloque calefactor (dependiendo del fabricante) y se produce un error de  $\pm 0,4$  en la medición del valor de  $T_m$  cuando se usa un aparato de PCR en tiempo real con baño de aire que corresponde a cada ciclo de medición.

Es preferible emplear un procedimiento que utilice un patrón diferencial entre los valores de Tm obtenidos mediante el mismo ciclo de medición para la determinación, de modo que la identificación de la especie bacteriana no se vea dificultada debido al error en la medición.

Los cebadores utilizados en la invención son los siguientes.

- 5 Grupo de combinación 1
- Se seleccionan cinco sitios de secuencia entre los sitios de secuencia comunes a los genes del ARNr 16S de todas las bacterias y se prepararon un cebador sentido y un cebador complementario para cada sitio.
- 10 Específicamente, se usan cebadores que incluyen todas o algunas de las secuencias de bases siguientes.
- (B1) Conjunto de cebadores que amplifica ADN que contiene 97 bases correspondientes a las bases 809 a 905 del gen del ARNr 16S de *Escherichia coli* (*E. coli*) (Secuencia ID N.º 1). (cebador de bacterias 1: Bac.1)
- Secuencia ID N.º 2: GATTAGATACCCTGGTAGTCCACG (24 mer) sentido
- 15 Secuencia ID N.º 3: CCCGTCAATTCCTTTGAGTTT (21 mer) complementario
- (B2) Conjunto de cebadores que amplifica ADN que contiene 166 bases correspondientes a las bases 927 a 1092 del gen del ARNr 16S de *E. coli* (cebador de bacterias 2: Bac.2)
- Secuencia ID N.º 4: AAAC TCAAAGGAATTGACGGG (21 mer) sentido
- Secuencia ID N.º 5: CGCTCGTTGCGGGAC (15 mer) complementario
- 20 (B3) Conjunto de cebadores que amplifica ADN que contiene 111 bases correspondientes a las bases 1108 a 1218 del gen del ARNr 16S de *E. coli* (cebador de bacterias 3: Bac.3)
- Secuencia ID N.º 6: GTCCCGCAACGAGCG (15 mer) sentido
- Secuencia ID N.º 7: ATTGTAGCACGTGTGTAGCCC (21 mer) complementario
- (B4) Conjunto de cebadores que amplifica ADN que contiene 130 bases correspondientes a las bases 1240 a 1369 del gen del ARNr 16S de *E. coli* (cebador de bacterias 4: Bac. 4)
- 25 Secuencia ID N.º 8: GGGCTACACACGTGCTACAAT (21 mer) sentido
- Secuencia ID N.º 9: CCGGGAACGTATTCACC (17 mer) complementario
- Se selecciona una región de secuencia común a los genes del ARNr 18S de todos los hongos y se preparan un cebador sentido y un cebador complementario.
- 30 Específicamente, se usan cebadores que incluyen todas o algunas de las secuencias de bases siguientes.
- (F1) Conjunto de cebadores para el gen del ARNr 18S (cebador de hongos: Hongos)
- Secuencia ID N.º 10: GAATGAGTACAATGTAAATACCTTAACG (28 mer) sentido
- Secuencia ID N.º 11: TAACTGCAACAAC TTTAATATACGC (25 mer) complementario
- 35 Con respecto a los cebadores para el gen Spa y el gen mecA de SARM, se selecciona un cebador diseñado con la puntuación más alta usando el software LightCycler Probe Design2.
- (M1) Conjunto de cebadores para el gen Spa de SARM (cebador de spa: spa)
- Secuencia ID N.º 12: TGAACGAAGAACAACGCAAT (20 mer) sentido
- Secuencia ID N.º 13: TTTGCTCACTGAAGGATCGTC (21 mer) complementario
- 40 (M2) Conjunto de cebadores del gen mecA de SARM (cebador de mecA: mecA)

## ES 2 426 038 T3

Secuencia ID N.º 14: ATTATAAAGCAATCGCTAAAGAACTAAGTA (30 mer) sentido

Secuencia ID N.º 15: CCAATAACTGCATCATCTTTATAGCC (26 mer) complementario

Grupo de combinación 2

5 Se seleccionan diez sitios de secuencia de los sitios de secuencia comunes a los genes del ARNr 16S de todas las bacterias y se preparan un cebador sentido y un cebador complementario para cada sitio.

Específicamente, se usan cebadores que incluyen todas o algunas de las secuencias de bases siguientes.

10 (B5) Conjunto de cebadores que amplifica ADN que contiene 338 bases correspondientes a las bases 8 a 345 del gen del ARNr 16S de *E. coli* (cebador de bacterias 5: Bac.5)

Secuencia ID N.º 17: AGAGTTTGATCATGGCTCAG (20 mer) sentido

Secuencia ID N.º 18: CGTAGGAGTCTGGACCGT (18 mer) complementario

(B6) Conjunto de cebadores que amplifica ADN que contiene 199 bases correspondientes a las bases 336 a 534 del gen del ARNr 16S de *E. coli* (cebador de bacterias 6: Bac.6)

15 Secuencia ID N.º 19: GACTCCTACGGGAGGCA (17 mer) sentido

Secuencia ID N.º 20: TATTACCGCGGCTGCTG (17 mer) complementario

(B7) Conjunto de cebadores que amplifica ADN que contiene 287 bases correspondientes a las bases 519 a 805 del gen del ARNr 16S de *E. coli* (cebador de bacterias 7: Bac.7)

Secuencia ID N.º 21: AGCAGCCGCGTAATA (16 mer) sentido

20 Secuencia ID N.º 22: GGACTACCAGGTATCTAATCCT (23 mer) complementario

(B8) Conjunto de cebadores que amplifica ADN que contiene 181 bases correspondientes a las bases 780 a 960 del gen del ARNr 16S de *E. coli* (cebador de bacterias 8: Bac.8)

Secuencia ID N.º 23: AACAGGATTAGATACCCTGGTAG (23 mer) sentido

Secuencia ID N.º 24: AATTAACCACATGCTCCACC (21 mer) complementario

25 (B9) Conjunto de cebadores que amplifica ADN que contiene 120 bases correspondientes a las bases 951 a 1070 del gen del ARNr 16S de *E. coli* (cebador de bacterias 9: Bac.9)

Secuencia ID N.º 25: TGGTTTAATTCGATGCAACGC (21 mer) sentido

Secuencia ID N.º 26: GAGCTGACGACAGCCAT (17 mer) complementario

30 (B10) Conjunto de cebadores que amplifica ADN que contiene 109 bases correspondientes a las bases 1084 a 1192 del gen del ARNr 16S de *E. coli* (cebador de bacterias 10: Bac.10)

Secuencia ID N.º 27: TTGGGTTAAGTCCCGC (16 mer) sentido

Secuencia ID N.º 28: CGTCATCCCCACCTTC (16 mer) complementario

(B11) Conjunto de cebadores que amplifica ADN que contiene 166 bases correspondientes a las bases 1220 a 1385 del gen del ARNr 16S de *E. coli* (cebador de bacterias 11: Bac.11)

35 Secuencia ID N.º 29: GGCTACACACGTGCTACAAT (20 mer) sentido

Secuencia ID N.º 30: CCGGGAACGTATTCACC (17 mer) complementario

Se seleccionan siete sitios de secuencia entre los sitios de secuencia comunes a los genes del ARNr 18S de hongos y se preparan un cebador sentido y un cebador complementario para cada sitio.

Específicamente, se usan cebadores que incluyen todas o algunas de las secuencias de bases siguientes.

(F2) Conjunto de cebadores que amplifica ADN que contiene 259 bases correspondientes a las bases 149 a 407 del gen del ARNr 18S de *C. albicans* (secuencia ID N.º 16) (cebador de hongos 2: Hongos 2)

5 Secuencia ID N.º 31: GTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGC (26 mer) sentido

Secuencia ID N.º 32: GGTAGCCGTTTCTCAGG (17 mer) complementario

(F3) Conjunto de cebadores que amplifica ADN que contiene 162 bases correspondientes a las bases 390 a 551 del gen del ARNr 18S de *C. albicans* (cebador de hongos 3: Hongos 3)

Secuencia ID N.º 33: GCCTGAGAAACGGCTACCA (19 mer) sentido

10 Secuencia ID N.º 34: CCTCCAATTGTTCTCGTTAAG (22 mer) complementario

(F4) Conjunto de cebadores que amplifica ADN que contiene 232 bases correspondientes a las bases 531 a 762 del gen del ARNr 18S de *C. albicans* (cebador de hongos 4: Hongos 4)

Secuencia ID N.º 35: TTAACGAGGAACAATTGGAGGG (22 mer) sentido

Secuencia ID N.º 36: GCCTGCTTTGAACACTCTAATTT (23 mer) complementario

15 (F5) Conjunto de cebadores que amplifica ADN que contiene 146 bases correspondientes a las bases 989 a 1134 del gen del ARNr 18S de *C. albicans* (cebador de hongos 5: Hongos 5)

Secuencia ID N.º 37: ATACCGTCGTAGTCTTAACCA (21 mer) sentido

Secuencia ID N.º 38: GTCAATTCCTTTAAGTTTCAGCCT (24 mer) complementario

20 (F6) Conjunto de cebadores que amplifica ADN que contiene 169 bases correspondientes a las bases 1260 a 1428 del gen del ARNr 18S de *C. albicans* (cebador de hongos 6: Hongos 6)

Secuencia ID N.º 39: CATGGCCGTTCTTAGTTGG (19 mer) sentido

Secuencia ID N.º 40: GGGCATCACAGACCTGTT (18 mer) complementario

(F7) Conjunto de cebadores que amplifica ADN que contiene 217 bases correspondientes a las bases 1414 a 1630 del gen del ARNr 18S de *C. albicans* (cebador de hongos 7: Hongos 7)

25 Secuencia ID N.º 41: AGGTCTGTGATGCCCTTAG (19 mer) sentido

Secuencia ID N.º 42: CGGGCGGTGTGTACAAA (17 mer) complementario

Con respecto a los cebadores para el gen Spa y el gen mecA de SARM, se selecciona un cebador diseñado con la puntuación más alta usando el software LightCycler Probe Design2.

(M3) Conjunto de cebadores para el gen Spa de SARM (cebador de spa 2: spa2)

30 Secuencia ID N.º 43: TAAACGATGCTCAAGCACCAA (21 mer) sentido

Secuencia ID N.º 44: GGTTTAACGACATGTACTION (21 mer) complementario

(M4) Conjunto de cebadores para el gen mecA de SARM (cebador de mecA 2: mecA2)

Secuencia ID N.º 45: CAAACTACGGTAACATTGATCGC (23 mer) sentido

Secuencia ID N.º 46: ATGTATGCTTTGGTCTTTCTGC (22 mer) complementario

35 Como procedimiento de amplificación génica según la invención se prefiere la PCR, siendo más preferible la PCR en tiempo real.

La PCR en tiempo real utilizada en la invención es un procedimiento intercalador que añade un intercalador que emite fluorescencia tras unirse a un ADN de cadena doble al sistema de reacción de PCR.

Entre los ejemplos de intercaladores se incluyen bromuro de etidio, SYBR Green I y similares.

Se prefiere el SYBR Green I como intercalador.

5 Puesto que el cebador utilizado en la invención reacciona con el ADN de todas las bacterias, es necesario utilizar SYBR Green I de alta pureza en el que se minimiza la mezcla de ADN de bacteria originado a partir del huésped recombinante.

En la invención, el término «valor de T<sub>m</sub>» se refiere a la temperatura a la cual el 50% del producto de PCR está disociado de la cadena complementaria.

10 La diferencia en la secuencia de bases entre especies bacterianas puede aplicarse para identificar las bacterias patógenas ya que la diferencia en el valor de T<sub>m</sub> entre especies bacterianas en base al concepto teórico de que el valor de T<sub>m</sub> se determina mediante la secuencia de bases en el método del vecino más cercano (fórmula del valor de T<sub>m</sub>).

Por tanto, es muy importante eliminar el efecto de un error de medición del valor de T<sub>m</sub> para conseguir una identificación exacta. El efecto del error de medición se elimina mediante el siguiente procedimiento.

15 Específicamente, puesto que el valor de T<sub>m</sub> cambia bajo condiciones experimentales que difieren en la composición de un tampón y similares, un error en la medición debido a la composición del líquido de reacción se previene utilizando SYBR Green I con una concentración de cloruro de magnesio específico como la del tampón de reacción.

20 Puesto que el aparato de PCR en tiempo real produce un error de medición correspondiente a cada ciclo de medición, se establece como control un valor de T<sub>m</sub> de referencia y se utiliza el patrón diferencial entre los valores de T<sub>m</sub> obtenidos en el mismo ciclo de medición para la determinación.

En la invención, el valor de T<sub>m</sub> de referencia puede usarse para corregir un error ciclo a ciclo del aparato de medición.

25 Específicamente, se utiliza el ADN de una cepa estándar de *E. coli* con una concentración constante como molde. El valor de T<sub>m</sub> se mide usando un conjunto de cebadores que amplifica una región del gen del ARNr 16S de las bacterias y se corrige el error en el valor de T<sub>m</sub> correspondiente a cada ciclo de medición.

Específicamente, cuando se usan un molde idéntico y un cebador idéntico, se obtiene teóricamente un valor de T<sub>m</sub> idéntico en cada ciclo de medición.

30 Si el valor de T<sub>m</sub> medido ha cambiado (error ciclo a ciclo), el valor de T<sub>m</sub> se corrige según el error correspondiente.

El proceso del procedimiento según la invención es el siguiente.

(1) Se extrae el ADN de un microorganismo.  
(2) El ADN extraído del microorganismo desconocido se somete a amplificación génica usando el conjunto de cebadores para bacterias, SARM y hongos. A continuación, se miden los valores de T<sub>m</sub> en un punto temporal para obtener la combinación de los valores de T<sub>m</sub> para bacterias, SARM y hongos.  
35

(3) Se determina si el microorganismo es o no un hongo.

40 Específicamente, si el microorganismo es un hongo o no o el tipo de hongo se determina analizando el valor de T<sub>m</sub> específico para hongos obtenido usando el conjunto de cebadores que puede amplificar una región de diversas regiones de los genes del ARNr 18S de todos los hongos entre los valores de T<sub>m</sub> obtenidos en (2).

(4) Se determina si el microorganismo es o no SARM.

45 Específicamente, si el microorganismo es o no SARM se determina analizando la amplificación génica específica de SARM obtenida usando el conjunto de cebadores que amplifica específicamente el gen Spa y el gen mecA de SARM entre los valores de T<sub>m</sub> obtenidos en (2).

(5) Se reduce la gama de especies bacterianas.

La especie bacteriana se determina analizando el valor de Tm específico de la bacteria obtenido usando el conjunto de cebadores que pueden amplificar diversas regiones de los genes del ARNr 16S de todas las bacterias entre los valores de Tm obtenidos en (2).

5 Específicamente, se selecciona uno de los valores de Tm específicos de bacterias (el valor de Tm puede corregirse usando el valor de Tm de referencia). La gama de especies bacterianas se reduce a especies bacterianas que tienen un valor próximo al valor de Tm. La diferencia en el valor de Tm se calcula de forma secuencial para reducir la gama, o se calcula directamente la diferencia en el valor de Tm incluyendo el valor de Tm de referencia y la especie bacteriana se identifica usando la combinación de las diferencias como una huella dactilar.

10 Como procedimiento que determina rápida y convenientemente si las bacterias patógenas son bacterias, hongos o SARM, puede usarse un procedimiento en el que se extraiga el ADN de un microorganismo desconocido, se someta a PCR el ADN extraído como molde usando (1) un cebador común a los genes del ARNr 18S de todos los hongos y se detectan específicamente los hongos, (2) dos cebadores que detectan específicamente el gen Spa y el gen mecA de SARM, respectivamente y (3) un  
15 cebador que es común a los genes del ARNr 16S de todas las bacterias y detecta específicamente bacterias, y se realice una electroforesis en gel de agarosa para determinar la banda con el tamaño deseado.

(1) La especie bacteriana de bacteria patógena necesaria para la selección del fármaco antimicrobiano puede identificarse realizando una amplificación génica, tal como una PCR en tiempo real basada en 4 a 18 y, preferiblemente, 4 a 16 conjuntos de cebadores y comparando los valores de Tm resultantes con la base de datos.  
20

(2) Cuando la muestra es sangre, el tiempo requerido para la extracción del ADN, análisis del valor de Tm e identificación es de aproximadamente dos horas. Por tanto, esto permite un diagnóstico rápido.

(3) Cuando la cantidad de muestra de sangre a partir de la cual se extrae el ADN es constante, puede determinarse la cantidad relativa de bacterias. Esto hace posible monitorizar los efectos terapéuticos tras la administración del fármaco antimicrobiano.  
25

La invención se describe a continuación más detalladamente mediante ejemplos y ejemplos de pruebas. Tenga en cuenta que la invención no se limita a los ejemplos siguientes.

30 En los ejemplos siguientes, se usaron siete cebadores de bacterias (cebadores de bacterias 5 a 11), un cebador de Spa y un cebador de mecA para SARM (cebador spa 2 y cebador mecA 2), un cebador de hongos (cebador de hongos 5) y un cebador de medición de valor del Tm de referencia (cebador de bacteria 3) (once cebadores en total).

#### Material experimental y extracción de ADN

35 Se usaron 160 cepas (cepas conservadas) determinadas como positivas entre 1323 especies recogidas por el Laboratorio Clínico del Hospital Universitario de Toyama desde el 1 de abril de 2004 hasta el 31 de marzo de 2005.

Se usó para el cultivo un sistema de detección microbiana automático («Bact/Alert» fabricado por bioMerieux Japan Ltd).

40 Se usaron de forma combinada una botella de cultivo SA (para bacterias aerobias), una botella de cultivo SN (para bacterias anaerobias) y una botella de cultivo PF (para detectar bacterias patógenas de enfermedades infantiles graves). El aislamiento e identificación se realizaron según los procedimientos habituales.

45 El ADN se extrajo de la siguiente forma. Las cepas conservadas se cultivaron en agar Mueller-Hinton (fabricado por Nippon Becton Dickinson Company, Ltd.), agar sangre de cordero (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) y agar de Sabouraud (fabricado por Nippon Becton Dickinson Company, Ltd.). Tras suspender una colonia en un microtubo que contenía 1 ml de solución salina esterilizada, la mezcla se centrifugó a 12 000 rpm durante dos minutos. Tras eliminar el líquido sobrenadante, se añadieron 200 µl de Insta Gene Matrix (fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc.) a los sedimentos bacterianos. La mezcla se calentó a 56 °C durante 15 a 30 minutos.

50 A continuación, el microtubo se agitó de forma intensa y se hirvió durante ocho minutos usando un calefactor en bloque a 100 °C.

Después la mezcla se centrifugó a 12 000 rpm durante dos minutos. El líquido sobrenadante se utilizó como extracto de ADN.

PCR en tiempo real

5 Se usó un aparato de PCR en tiempo real «LightCycler 1.5» (fabricado por Roche Diagnostics K.K.).

Se usó un intercalador «Power SYBR Green PCR Master Mix» (fabricado por Applied Biosystems) como intercalador de PCR en tiempo real.

10 El sistema de PCR (20 µl) contenía 2 µl del molde de ADN genómico, 2 µl del cebador de PCR concentrado 10 veces (concentración final: 250 nM), 10 µl del intercalador de PCR en tiempo real concentrado 10 veces, 2 µl de BSA (500 µg/ml) y 4 µl de agua ultrapura.

En la tabla 1 se muestra la configuración del programa de PCR en tiempo real.

El tiempo de elongación se estableció en 12 segundos, que era el tiempo mínimo que permitía la amplificación de hasta una longitud de 300 bases.

En la tabla 1 se muestra la configuración del programa de PCR en tiempo real.

15

TABLA 1

Programa	Modo de análisis	Número de ciclos	Clasificación	Temperatura preestablecida	Tiempo	Recogida de fluorescencia
Preincubación	Ninguno	1	1	95 °C	10 min	Ninguna
Amplificación	Análisis cuantitativo	35	Desnaturalización	95 °C	10 s	-
			Hibridación	55 °C	10 s	-
			Expansión	72 °C	12 s	Sencilla
Análisis de la curva de fusión	Curva de fusión	1	Desnaturalización	95 °C	0 s	-
			Hibridación	65 °C	15 s	-
			Fusión	95 °C 0,1° C/s	0 s	Sucesiva
Refrigeración	Ninguno	1	1	40 °C	30 s	-

Análisis de los datos del valor de Tm mediante análisis de las curvas de fusión

El valor de Tm tras la PCR en tiempo real se analizó como sigue. Específicamente, se comprobó la curva cuantitativa para determinar cuantitativamente cada cebador.

20

Cuando el número de ciclos de crecimiento de un cebador específico era significativamente menor que el de otros cebadores, se determinó que el cebador no era eficaz.

A continuación se comprobó la forma de la curva de fusión.

Cuando no se observaba un punto de caída en el que el producto de PCR se disociaba rápidamente en dos cadenas sencillas (un descenso rápido del valor de F1) no se empleó el valor de Tm.

Tras comprobar por encima de dos elementos, se calculó el valor de Tm a partir del pico de la curva del pico de fusión.

Sensibilidad de detección del cebador

- 5 La sensibilidad de detección de cada cebador se midió por adelantado. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2

Cebador	Límite de detección (ADN genómico)
cebador de bacterias 5	1 ng/μl
cebador de bacterias 6	1 fg/μl
cebador de bacterias 7	10 fg/μl
cebador de bacterias 8	1 fg/μl
cebador de bacterias 9	10 pg/μl
cebador de bacterias 10	1 ng/μl
cebador de bacterias 11	1 fg/μl
cebador de hongos 5	10 pg/μl
cebador de spa 2	10 pg/μl
cebador de mecA 2	1 ng/μl

Para evaluar la sensibilidad de la detección, el ADN genómico extraído de la cepa se diluyó secuencialmente y se comprobó la presencia o ausencia de detección mediante PCR en tiempo real.

- 10 Se observó una diferencia en la sensibilidad de detección de cada cebador. La sensibilidad del sistema se estableció en 1 ng/μl en función de los cebadores con la más baja sensibilidad de detección (cebadores de bacterias 5 y 10 y cebador de mecA 2).

Creación de la base de datos de valores de Tm de bacterias patógenas

- 15 Para construir un sistema que identifique una bacteria patógena que causa septicemia desconocida, se creó una base de datos de valores de Tm relacionados con bacterias patógenas con alta frecuencia.

- 20 Para determinar las bacterias patógenas registradas en la base de datos, se determinó la frecuencia de detección de 160 cepas que fueron positivas en las exploraciones de los cultivos sanguíneos realizados por el Laboratorio clínico del Hospital Universitario de Toyama desde el 1 de abril de 2004 al 31 de marzo de 2005 y se creó una base de datos para 34 bacterias patógenas en total (tablas 3 a 7).

Las bacterias patógenas se clasificaron según los elementos «gram positiva», «gram negativa», «coco» y «bacilo» y se enumeraron en orden a partir de las bacterias patógenas con la mayor frecuencia.

- 25 Estas tablas pueden utilizarse como una herramienta para buscar el valor de Tm a partir de la bacteria. Se estableció un valor de Tm control obtenido mediante la combinación del ADN de la cepa estándar de *E. coli* y el cebador bac.7 a 84,43 °C.

En las tablas el valor de Tm entre paréntesis puede ser detectado o no.

La compilación del símbolo «(-)» y del valor de Tm indica que no se detectó valor de Tm o indica el valor de Tm detectado.

ES 2 426 038 T3

El símbolo «-» indica que no se detectó el valor de Tm.

En la tabla 3 se muestran los cocos gram positivos.

TABLA 3

nombre	Hongos. 5	bac. 5	bac. 6	bac. 7	bac. 8	bac. 9	bac.1 0	bac.1 1	Spa 2	mecA. 2
S. aureus (SARM)	-	82,9 4	82,3 9	82,3 9	83,8 7	80,66	81,51	80,87	81,0 7	-76,21
S. epidermidis (SERM)	-	83,2 2	82,3 3	83,0 5	83,7	80,87	81,47	80,3	-	-75,88
Staphylococcus capitis subsp. ureolyticus	-	83,7 8	82,5	83,0 5	83,7 5	80,77	81,43	81,17	-	-76,13
S. capitis subsp. capitis	-	83,6 5	82,3 7	83,1	83,6 4	80,12 ,	81,31	80,24	-	-
Staphylococcus auricularis	-	83,1 8	82,5 7	83,1 4	83,8 7	80,56	81,86	80,96	81,9	-76,14
Staphylococcus warneri	-	83,4 9	82,1 6	83,1 1	84,2	80,5	81,66	81,55	-	-
Staphylococcus hominis	-	83,0 5	82,9 2	83	83,7 7	79,87	81,44	80,79	-	-
Streptococcus bovis	-	82,7 5	83,2	82,8	84,3	79,53	80,84	82,58	-	-
Streptococcus mitis	-	83,3 6	82,6	82,9 3	83,3 6	81,6	81,43	83,31	-	-
Streptococcus oralis	-	83,4 2	82,6 5	82,8 3	83,4 7	81,91	81,43	83,37	-	-
Streptococcus pneumoniae	-	83,4 7	82,4 2	83	83,2 6	81,27	81,2	83,1	-	-
Enterococcus faecalis	-	84,7 5	82,7 8	84,2	84,2 4	80,71	82,16	83,63	-	-
Enterococcus faecium	-	(-) 84,2 8	82,1 4	83,9 6	83,9 7	81,36	81,32	83,06	-	-
Enterococcus avium	-	(-) 83,8 7	81,8 8	83,8 5	84,0 2	81,22	81,76	82,66	-	-
Enterococcus gallinarum	-	83,6 7	82,1	84,0 8	84,2	(-) 81,22	81,9	82,17	-	-

En la tabla 4 se muestran los bacilos gram positivos.

TABLA 4

Nombre	Hongos. 5	bac.5	bac.6	bac.7	bac.8	bac.9	bac.10	bac.11	Spa.2	mec A.2
Especies de Corynebacterium	-	85,33	85,86	84,76	(-) 84,27	81,82	84,41	84,18	-	-
Listeria monocytogenes	-	84,44	81,74	84,27	83,71	81,46	81,95	81,77	-	-
Bacillus cereus	-	84,02	83,21	83,4	83,3	81,3	81,49	82,15	-	-

En la tabla 5 se muestran los cocos gram negativos.

TABLA 5

Nombre	Hongos. 5	bac.5	bac.6	bac.7	bac. 8	bac. 9	bac.1 0	bac.1 1	Spa. 2	mecA. 2
Especies de Acinetobacter	-	84,11	82,65	82,4	83,4 7	80,2 6	(-) 80,63	81,88	-	-

En la tabla 6 se muestran los bacilos gram negativos.

5

TABLA 6

Nombre	Hongo s.5	bac.5	bac.6	bac.7	bac.8	bac. 9	bac.1 0	bac.1 1	Spa. 2	mecA. 2
Escherichia coli	-	84,62	83,76	84,6	85,06	81,5	83,03	82,64	-	-
Klebsiella pneumoniae	-	85,02	84,48	84,85	84,29	81,2	81,84	81,14	-	-
Klebsiella oxytoca	-	84,84	83,46	84,43	83,84	81,0 8	81,42	81,21	-	-
Pseudomonas aeruginosa	-	84,59	82,49	83,53	83,94	81,5 2	(-) 83,14	82,96	-	-
Enterobacter cloacae	-	84,85	84,39	84,84	84,27	81,4 1	81,81	81,15	-	-
Enterobacter aerogenes	-	84,71	83,36	84,78	84,74	80,7 4	82,46	81,16	-	-
Haemophilus influenzae	-	85,03	84,14	84,96	84,91	81,1 2	82,32	81,75	-	-
Citrobacter freundii	-	84,01	82,34	82,85	83,36	80,6 5	81,58	81,81	-	-
Morganella morganii	-	84,42	83,38	83,94	84,54	80,9	82,8	81,46	-	-

Sphingomonas paucimobilis	-	-	83,06	83,47	83,56	81,87	81,67	83,58	-	-
Serratia marcescens	-	84,76	83,82	84,27	84,01	80,92	82,48	81,65	-	-
Kluyvera ascorbata	-	83,7	82,41	83,27	83,89	80,85	81,84	80,67	-	-

En la tabla 7 se muestran los hongos.

TABLA 7

Nombre	Hongos.5	bac.5	bac.6	bac.7	bac.8	bac.9	bac.10	bac.11	Spa.2	mecA.2
Candida albicans	79,79	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Candida krusei	81,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Candida parapsilosis	79,62	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Creación del gráfico de identificación de bacterias patógenas

- 5 Cuando se analizan bacterias patógenas desconocidas causantes de septicemia, se obtiene un valor de Tm control y diez valores de Tm del producto de amplificación por PCR. La base de datos mostrada en la tablas 3 a 7 no es conveniente para identificar bacterias patógenas a partir de los valores de Tm.

Por tanto, se creó un gráfico de identificación de bacterias patógenas para identificar fácilmente las bacterias patógenas a partir de los valores de Tm (tabla 8).

10

TABLA 8

Hongo s5	Spa. 2	bac.5	bac.6	bac.7	bac. 8	bac.9	bac.1 0	bac.1 1	mecA.2	nombre
81,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Candida krusei
79,79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Candida albicans
79,62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Candida parapsilosis
-	81,9	83,18	82,57 -0,61	83,14 0,57	83,8 7 0,73	80,56 -3,31	81,86 1,3	80,96 -0,9	-76,14	Staphylococcus auricularis
-	81,0 7	82,94	82,39 -0,55	82,39 0	83,8 7 1,48	80,66 -3,21	81,51 0,85	80,87 -0,64	-76,21	S. aureus (SARM)
-	-	85,33	85,86 0,53	84,75 -1,1	(-) 84,2 7 - 0,49	81,82 -2,45	84,41 2,59	84,18 -0,23	-	Especies de Corynebacterium
-	-	85,03	84,14 -0,89	84,96 0,82	84,9 1 - 0,05	81,12 -3,79	82,32 1,2	81,75 -0,57	-	Citrobacter freundii
-	-	85,02	84,48 -0,54	84,85 0,37	84,2 9 - 0,56	81,2 -3,09	81,84 0,64	81,14 -0,7	-	Klebsiella pneumoniae
-	-	84,85	84,39 -0,46	84,84 0,45	84,2 7 - 0,57	81,41 -2,86	81,81 0,4	81,15 -0,66	-	Enterobacter cloacae
-	-	84,84	83,46 -1,38	84,43 0,97	83,8 4 - 0,59	81,08 -2,76	81,42 0,34	81,21 -0,21	-	Klebsiella oxytoca
-	-	84,76	83,82 -0,94	84,27 0,45	84,0 1 - 0,26	80,92 -3,09	82,48 1,55	81,65 -0,83	-	Serratia marcescens
-	-	84,75	82,78 -1,97	84,2 1,42	84,2 4 0,04	80,71 -3,53	82,16 1,45	83,63 1,47	-	Enterococcus faecalis
-	-	84,71	83,36 -1,35	84,78 1,42	84,7 4 -	80,74 -4	82,46 1,72	81,16 -1,3	-	Enterobacter aerogenes

ES 2 426 038 T3

					0,04					
-	-	84,62	83,76 -0,86	84,6 0,84	85,0 6 0,46	81,5 -3,56	83,03 1,53	82,64 -0,39	-	Escherichia coli
-	-	84,59	82,49 -2,1	83,53 1,04	83,9 4 0,41	81,52 -2,42	(-) 83,14 1,62	82,96 -0,18	-	Pseudomonas aeruginosa
-	-	84,44	81,74 -2,7	84,27 2,53	83,7 1 - 0,56	81,46 -2,25	81,95 0,49	81,77 -0,18	-	Listeria monocytogenes
-	-	84,42	83,38 -1,04	83,94 0,56	84,5 4 0,6	80,9 -3,64	82,8 1,9	81,46 -1,34	-	Morganella morganii
-	-	(-) 84,28	82,14 -2,14	83,96 1,82	83,9 6 0	81,36 -2,6	81,32 -0,04	83,06 1,74	-	Enterococcus faecium
-	-	84,11	82,65 -1,46	82,4 -0,25	83,4 7 1,07	80,26 -3,21	(-) 80,63 0,37	81,88 1,25	-	Especies de Acinetobacter
-	-	84,02	83,21 -0,81	83,4 0,19	83,3 -0,1	81,3 -2	81,49 0,19	82,15 0,66	-	Bacillus cereus
-	-	84,01	82,34 -1,67	82,85 0,51	83,3 6 0,51	80,65 -2,71	81,58 0,93	81,81 0,23	-	Haemophilus influenzae
-	-	(-) 83,87	81,88 -1,99	83,85 1,97	84,0 2 0,17	81,22 -2,8	81,76 0,54	82,66 0,9	-	Enterococcus avium
-	-	83,78	82,5 -1,28	83,05 0,55	83,7 5 0,7	80,77 -2,98	81,43 0,66	81,17 -0,26	-76,13	Staphylococcus capitis subsp. Ureolyticus
-	-	83,7	82,41 -1,29	83,27 0,86	83,8 9 0,62	80,85 -3,04	81,84 0,99	80,67 -1,17	-	Kluyvera ascorbata
-	-	83,67	82,1 -1,57	84,08 1,98	84,2 0,12	(-) 81,22 -2,98	81,9 0,68	82,17 0,27	-	Enterococcus gallinarum
-	-	83,65	82,37 -1,28	83,1 0,73	83,6 4 0,54	80,12 -3,52	81,31 1,19	80,24 -1,07	-	S. capitis subsp. Capitis
-	-	83,49	82,16 -1,33	83,11 0,95	84,2 1,09	80,5 -3,7	81,66 1,16	81,55 -0,11	-	Staphylococcus warneri

-	-	83,47	82,42 -1,05	83 0,58	83,2 6 0,26	81,27 -1,99	81,2 -0,07	83,1 1,9	-	Streptococcus pneumoniae
-	-	83,42	82,65 -0,77	82,83 0,18	83,4 7 0,64	81,91 -1,56	81,43 -0,48	83,37 1,94	-	Streptococcus oralis
-	-	83,36	82,6 -0,76	82,93 0,33	83,3 6 0,43	81,6 -1,76	81,43 -0,17	83,31 1,88	-	Streptococcus mitis
-	-	83,22	82,33 -0,89	83,05 0,72	83,7 0,65	80,87 -2,83	81,47 0,6	80,3 -1,17	-75,88	S. epidermidis (SERM)
-	-	83,05	82,92 -0,13	83 0,08	83,7 7 0,77	79,87 -3,9	81,44 1,57	80,79 -0,65	-	Staphylococcus hominis
-	-	82,75	83,2 0,45	82,8 -0,4	84,3 1,5	79,53 -4,77	80,84 1,31	82,58 1,74	-	Streptococcus bovis
-	-	-	83,06	83,47 0,41	83,5 6 0,09	81,87 -1,69	81,67 -0,2	83,58 1,91	-	Sphingomonas paucimobilis

Valor de Tm control=84,43 °C

El valor de Tm entre paréntesis puede ser detectado o no.

- 5 La compilación del símbolo «(-)» y del valor de Tm indica que el valor de Tm no se detectó o indica el valor de Tm detectado.

El símbolo «-» indica que no se detectó valor de Tm.

El valor proporcionado debajo de cada valor de Tm indica la diferencia con el valor de Tm de la columna izquierda.

- 10 Los elementos se comprueban con respecto al elemento más a la izquierda. El hongo para el que el cebador de hongos era positivo se determinó con la prioridad más alta.

El elemento «spa» sigue al elemento «hongo.5» ya que el número de bacterias que son positivas para spa es pequeño.

- 15 Al elemento «mecA» se le da la prioridad más baja porque la presencia o ausencia de un gen de resistencia a la penicilina difiere incluso si la especie bacteriana es la misma.

*Staphylococcus epidermidis* y algunas otras especies de *Staphylococcus* pueden tener mecA. Sin embargo, al elemento «mecA» se le proporciona la menor prioridad de modo que esta identificación no se complique cuando mecA sea negativo. Con respecto al procedimiento de identificación que excluyen los elementos mencionados anteriormente, se analiza una combinación de los valores de Tm usando los siete cebadores de bacterias.

20

Los cebadores se organizan en orden desde el cebador (bac.5) con el valor de Tm más alto.

Esto facilita el proceso de búsqueda.

También se proporcionó el valor diferencial para indicar el patrón diferencial del valor de Tm bacteriano. La diferencia positiva o negativa de valor de Tm en la columna izquierda se indica mediante el

símbolo «±». Esto permite una determinación en base al patrón diferencial de los valores de Tm de siete bacterias sin verse afectado por un error de medición del aparato de PCR en tiempo real correspondiente a cada ciclo de medición.

Verificación mediante ensayo ciego

5 Prueba 1

Para evaluar el sistema según la invención, la PCR en tiempo real se realizó usando los once conjuntos de cebadores según la invención mientras se ocultan los nombres de las bacterias. La combinación de los valores de Tm se comparó con la base de datos para identificar las especies bacterianas.

10 En la tabla 9 se muestra la combinación de los valores de Tm resultantes.

TABLA 9

Hongos.5	Spa.2	bac.5	bac.6	bac.7	bac.8	bac.9	bac.10	bac.11	mecA.2	nombre
-	-	84,17	82,05 -2,12	83,09 1,04	83,46 0,37	81,03 -2,43	82,7 1,67	82,56 -0,14	-	?

Hongos5, spa2 y mecA2 eran negativos y los valores de Tm del producto de PCR se obtuvieron solo para los cebadores de bacterias.

15 Puesto que el valor de Tm control era 84,02, se determinó que se producía un error de -0,41 a partir del valor original (84,43). Por tanto, se realizaron correcciones añadiendo +0,41 al valor de Tm de Bac.5.

20 Puesto que el valor de Tm para Bac.5 era 84,58, se seleccionó el intervalo de 84,78 a 84,28 en el gráfico de bacterias patógenas (columna Bac.5 en la tabla 10) considerando un error del aparato de ±0,2 °C.

Puesto que la diferencia en el valor de Tm entre Bac.5 y Bac.6 es de -2,12 °C, se seleccionó un intervalo de -1,92 a -2,32 considerando un error del aparato de ±0,2 °C. Como resultado, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecium* seguían siendo candidatos.

25 Puesto que la diferencia en el valor de Tm entre Bac.6 y Bac.7 era de +1,04, solo *Pseudomonas aeruginosa* seguía centrándose en el intervalo de +1,24 a ±0,84).

Las diferencias en el valor de Tm con respecto a Bac.8, 9, 10 y 11 coincidían con los valores de la base de datos para *Pseudomonas aeruginosa*.

30 Como resultado de doce pruebas ciegas, podían obtenerse resultados de identificación correcta para todas las pruebas.

TABLA 10

hongo s.5	Spa. 2	bac.5	bac.6	bac.7	bac.8	bac.9	bac.1 0	bac.1 1	mecA .2	nombre
-	-	84,7 6	83,82 -0,94	84,27 0,45	84,01 -0,26	80,92 -3,09	82,48 1,56	81,65 -0,83	-	Serratia marcescens
-	-	84,7 5	82,78 -1,97	84,2 1,42	84,24 0,04	80,71 -3,53	82,16 1,45	83,63 1,47	-	Enterococcu s faecalis
-	-	84,7 1	83,36 -1,35	84,78 1,42	84,74 -0,04	80,74 -4	82,46 1,72	81,16 -1,3	-	Enterobacter aerogenes
-	-	84,6 2	83,76 -0,86	84,6 0,84	85,06 0,46	81,5 -3,56	83,03 1,53	82,64 -0,39	-	Escherichia coli
-	-	84,5 9	82,49 -2,1	83,53 1,04	83,94 0,41	81,52 -2,42	(-) 83,14 1,62	82,96 -0,18	-	Pseudomona s aeruginosa
-	-	84,4 4	81,74 -2,7	84,27 2,53	83,71 -0,56	81,46 -2,25	81,95 0,49	81,77 -0,18	-	Listeria monocytogen es
-	-	84,4 2	83,38 -1,04	83,94 0,56	84,54 0,6	80,9 -3,64	82,8 1,9	81,46 -1,34	-	Morganella morganii
-	-	(-) 84,2 8	82,14 -2,14	83,96 1,82	83,96 0	81,36 -2,6	81,32 -0,04	83,06 1,74	-	Enterococcu s faecium

Procedimiento de referencia conveniente que no utiliza el valor de Tm

- 5 Es posible identificar fácil y rápidamente si las bacterias patógenas son bacterias, hongos o SARM usando los cebadores como se describe en este documento sin usar un aparato de medición del valor de Tm, como un aparato de PCR en tiempo real.

- 10 Específicamente, el ADN de bacterias patógenas desconocidas como molde se somete a PCR usando un termociclador de PCR y un cebador de bacterias, un cebador de hongos y un cebador de mecA como se describe en este documento y el producto de amplificación se somete a electroforesis en gel de agarosa. Si se observa una banda de tamaño conocido, pueden distinguirse las infecciones debidas a bacterias, hongos y SARM (Figura 1).

Como resultado, las infecciones debidas a bacterias, hongos y SARM pueden distinguirse fácil y rápidamente incluso en una instalación sin un aparato de PCR en tiempo real y similar es de modo que puede seleccionarse un fármaco antimicrobiano apropiado en una fase temprana.

- 15 Puesto que el cebador de bacterias reacciona con el ADN de todas las bacterias, es necesario utilizar una ADN polimerasa de alta pureza con la que se minimiza la mezcla de ADN de las bacterias originada a partir del huésped recombinante.

En la figura 1 se muestra una banda de gel de electroforesis de agarosa determinada usando el procedimiento alternativo conveniente anterior.

- 20 Cebadores utilizados: bac.6, hongos.5, spa y mecA.

ADN polimerasa utilizada: AmpliTaq Gold DNA Polymerase, LD (fabricado por Applied Biosystems)

Las bacterias patógenas responsables de la infección (especialmente septicemia) pueden detectarse e identificarse rápidamente usando el procedimiento de la invención de modo que se implementa un procedimiento rápido de diagnóstico de la septicemia.

5 Específicamente, puesto que la invención permite la construcción de un sistema que identifica bacterias patógenas en dos horas, puede seleccionarse un fármaco antimicrobiano óptico en una fase temprana de la septicemia.

Además, puede controlarse el efecto terapéutico tras la administración de un fármaco antimicrobiano.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> Universidad de Toyama  
<120> Procedimiento para la identificación rápida de bacterias patógenas para infección  
<130> PCT-TU4-33  
<150> JP 2006-043469  
<151> 21/02/2006
- 15 <150> JP 2006-278371  
<151> 12/10/2006  
<160> 46  
<170> PatentIn versión 3.1  
<210> 1
- 20 <211> 1541  
<212> ADN  
<213> *E. coli*  
<400> 1

ES 2 426 038 T3

aaattgaaga gtttgatcat ggctcagatt gaacgctggc ggcaggcc ta acacatgcaa 60  
 gtcgaacggg aacaggaaga agcttgctct ttgctgacga gtagcggaac ggtgagtaat 120  
 gtcgggaaa ctgcctgatg gaggggata actactggaa acggtagc ta ataccgcata 180  
 acgtcgcaag accaaagagg gggaccttcg ggcctcttgc categgatgt gccagatgg 240  
 gattagctag taggtggggt aacggctcac ctaggcgacg atccctagct ggtctgagag 300  
 gatgaccagc cacactggaa ctgagacacg gtccagacac ctacgggaag cagcagtggg 360  
 gaatatgca caatggggcg aagcctgatg cagccatgcc gcgtgtatga agaaggcctt 420  
 cgggttgtaa agtacttica ggggggagga agggagtaaa gttaatacct ttgctcattg 480  
 acgttaccog cagaagaagc accggctaac tccgtgccag cagccgcggg aatacggagg 540  
 gtgcaagcgt taatcggaa tactgggctt aaagcgcacg caggcggctt gtttaagtca 600  
 atgtgaaac cccgggctca acctgggaac tgcattctgat actggcaagc ttgagtctcg 660  
 tagagggggg tagaattcca ggtgtagcgg tgaatgcgt agagatctgg aggaataccg 720  
 gtggcgaagg cggccccctg gacgaagact gacgctcagg tgcgaagcg tggggagcaa 780  
 acaggattag ataccctggt agtccacgcc gtaaaccgat tgcacttggg ggttgtgccc 840  
 ttgaggcgtg gcttccggag ctaacgcgtt aagtcgaccg cctggggagt acggccgcaa 900  
 ggttaaaact caaatgaatt gacgggggccc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt 960  
 cgatgcaacg cgaagaacct tacctggtct tgacatccac ggaagitttc agagatgaga 1020  
 atgtgccttc gggaaaccgt agacagggtc tgcattgctg tgcagctc gtgtgtgaa 1080  
 atgttgggtt aagtcccga acgagcgcaa ccttatcct ttgttgcag cggctcggcc 1140  
 gggaaactca aggagactgc cagtataaa ctggaggaag gtgggga tga cgtcaagtca 1200  
 tcatggccct tacgaaccagg gctacacacg tctacaatg gcgcatacaa agagaagcga 1260  
 cctcgcgaga gcaagcggac ctcataaagt gcgtcgtagt ccggattgga gtcctgcaact 1320  
 cgactccatg aagtcggaat cgtagtat cgtggatcag aatgccacgg tgaatacgtt 1380  
 cccgggccc ttacacacac ccgctcacac catgggagtg ggttgcaaaa gaagtggta 1440  
 gcttaacctt cgggagggcg ctaccactt tgtgattcat gactgggggtg aagtcgtaac 1500  
 aaggtaaccg taggggaacc tgoggttga tcacctcct a 1541

<210> 2

<211> 24

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 2

gattagatac cctggtagtc cacg

24

10 <210> 3

<211> 21

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 5 <400> 3  
     cccg~~t~~caatt cctttgagtt : 21  
 <210> 4  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 4  
     aaactc~~s~~aag gaattgacgg g 21  
 15 <210> 5  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20 <223> cebador  
 <400> 5  
     cgc~~t~~cgttgc gggac 15  
 <210> 6  
 <211> 15  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 6  
 30 gtccc~~g~~caac gagcg 15  
 <210> 7  
 <211> 21  
 <212> ADN



<220>  
 <223> cebador  
 <400> 11  
 taactgcaac aactttaata tacgc 25  
 5 <210> 12  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 10 <223> cebador  
 <400> 12  
 tgaacgaaga acaacgcaat 20  
 <210> 13  
 <211> 21  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 13  
 20 ttgctcact gaaggatcgt c 21  
 <210> 14  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 14  
 attataaagc aatcgctaaa gaactaagta 30  
 <210> 15  
 30 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>

<223> cebador

<400> 15

ccaataactg catcatcttt atagcc

26

<210> 16

5 <211> 1788

<212> ADN

<213> *C. albicans*

<400> 16

tatctgggtg atcctgccag tagtcatatg cttgtctcaa agattaagcc atgcatgtct 60  
aagtataagc aattatatac gtgaaactgc gaatggctca ttaaatacagt tategtttat 120  
ttgatagtac cttactactt ggataaccgt ggtaattcta gagctaatac atgcttlaaaa 180  
tcccgactgt ttggaaggga tgtatttatt agataaaaaa tcaatgctt cgggctcttt 240  
gatgatfcat aataactttt cgaatgcat ggccctgtgc tggcgtggg tcaattcaaat 300  
ttctgeccta tcaactttcg atggtaggat agtggcctac catggtttca acgggtaacg 360  
gggaataagg gttcgattcc ggagaggag cctgagaaac ggctaccaca tccaagggaag 420  
gcagcaggcg cgcaaattac ccaatccga ttcaggggag gtagtgacaa taaataacga 480  
tacagggccc ttttgggtct tgtaattgga atgagtacaa tglaaatacc ttaacagga 540  
acaatgggag ggcaagtctg gtgccagcag ccgcggtaat tccagctcca aaagcgtata 600  
ttaagttgt tgcagttaaa aagctcgtag ttgaactttg ggcttggctg gcccgctcat 660  
cttttctgat gcgtactgga ccagccgagc ctttcttct ggtagccatt tatggcgaac 720  
caggactttt actttgaaaa aattagagt ttcaaagcag gcccttgcctc gaatatatta 780  
gcatggaata atagaatagg acgttatggt tctatttgtg tggttctag gaccatcgta 840  
atgattaata gggacggtcg ggggtatcag tattcagatg tcgaaagggtg aaattcttgg 900  
atttactgaa gactaactac tgcgaaagca ttiaccaagg acgttttcat taatcaagaa 960  
cgaaagttag gggatcgaag atgatcagat accgtcgtag tottaacct aaactatgcc 1020  
gactagggat cggttgttgt tcttttattg acgcaatcgg caccctacga gaaatc3aag 1080  
tctttgggtt ctggggggag tatggtcgca agcctgaaac ttaaaggaat tgacggaagg 1140  
gcaccaccag gagtggagcc tgcggcttaa tttgactcaa cacggggaaa ctcaccagggt 1200  
ccagacacaa taaggattga cagattgaga gctctttctt gatcttgggg gtgggtgtgc 1260  
atggccttc ttagttggtg gagtgatttg tcigttaat tgcgataacg aacgagacct 1320  
taacctacta aatagtgtg ctagcatttg ctggtatagt cacttcttag agggactatc 1380  
gactccaagt cgatggaagt ttgaggcaat aacaggctcg tgatgccctt agacgttctg 1440  
ggccgcacgc gccttacct gacggagcca gcgagtataa gccctggccg agaggctctg 1500

ES 2 426 038 T3

		gaaactcttgt gaaactccgt cgtgctgggg atagagcatt gtaattgttg ctcttcaacg	1560
		aggaattcct agtaagcgca agtcatcage ttgcgttgat tacgtccctg ccctttgtac	1620
		acaccgcccg tcgctactac cgattgaaag gcttagtgag gcctccggat tggtttagga	1680
		aagggggcaa ctccattctg gaaccgagaa gcctggcaaa ctgggtcatt tagaggaagt	1740
		aaaagtcgta acaaggtttc cgtaggtgaa cctgcggaag gatcatta	1788
	<210>	17	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
5	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	cebador	
	<400>	17	
		agagtttgat catggctcag	20
10	<210>	18	
	<211>	18	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
15	<223>	cebador	
	<400>	18	
		cgtaggagtc tggaccgt	18
	<210>	19	
	<211>	17	
20	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	cebador	
	<400>	19	
25		gactcctacg ggaggca	17
	<210>	20	
	<211>	17	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	

<220>  
 <223> cebador  
 <400> 20  
 tattaccgcg gctgctg 17  
 5 <210> 21  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 10 <223> cebador  
 <400> 21  
 agcagccgcg gtaata 16  
 <210> 22  
 <211) 23  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 22  
 ggactaccag ggtatcctaat cct 23  
 20 <210> 23  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 23  
 aacaggatta gataccctgg tag 23  
 <210> 24  
 30 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>

<223> cebador  
 <400> 24  
 aattaaacca catgctccac c 21  
 <210> 25  
 5 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 10 <400> 25  
 tggtttaatt cgatgcaacg c 21  
 <210> 26  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 26  
 gagctgacga cagccat 17  
 20 <210> 27  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 25 <223> cebador  
 <400> 27  
 ttgggttaag tcccgc 16  
 <210> 28  
 <211> 16  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 28

	<code>cgtcaccccc accttc</code>	16
	<210> 29	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 29	
	<code>ggctacacac gtgctacaat</code>	20
10	<210> 30	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> cebador	
	<400>30	
	<code>ccgggaacgt attcacc</code>	17
	<210> 31	
	<211> 26	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 31	
25	<code>gtggtaatc tagagctaat acatgc</code>	26
	<210> 32	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 32	
	<code>ggtagccgtt tctcagg</code>	17



<211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 5 <223> cebador  
 <400> 37  
     ataccgctcgt agtccttaacc a 21  
 <210> 38  
 <211> 24  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 38  
 15 gtcaattcct ttaagttica gcct 24  
 <210> -39  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 39  
     catggccgtt cttagtigg 19  
 <210> 40  
 25 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 30 <400> 40  
     gggcatacaca gacctggt 18  
 <210> 41  
 <211> 19

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 5 <400> 41  
     aggtctgtga tgcccttag 19  
 <210> 42  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 42  
     cgggcggtgt gtacaaa 17  
 15 <210> 43  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20 <223> cebador  
 <400> 43  
     taaacgatgc tcaagcacca a 21  
 <210> 44  
 <211> 21  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 44  
     ggtttaacga catgtactcc g 21  
 30 <210> 45  
 <211> 23  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 45

5    caaaactacgg taacattgat .cgc

23

<210> 46

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> cebador

<400> 46

atgtaigctt tggcttttct gc

22

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para identificar bacterias patógenas responsables de infecciones, comprendiendo el procedimiento extraer el ADN del microorganismo objetivo para la identificación, someter el ADN como molde a amplificación génica usando una combinación de los siguientes conjuntos de cebadores (B), (F) y (M) y analizar la combinación de las temperaturas de fusión (valores de Tm) específicos del microorganismo en comparación con las temperaturas de fusión (valores de Tm) específicas del microorganismo conocido,
- 5 donde la combinación de los conjuntos de cebadores (B), (F) y (M) se selecciona entre (I) o (II):
- 10 (I) una combinación en la que el conjunto de cebadores (B) comprende
- el cebador (B1) de secuencia ID N.º 2 y secuencia ID N.º 3;
- el cebador (B2) de secuencia ID N.º 4 y secuencia ID N.º 5;
- el cebador (B3) de secuencia ID N.º 6 y secuencia ID N.º 7; y
- el cebador (B4) de secuencia ID N.º 8 y secuencia ID N.º 9; y
- 15 en el que el conjunto de cebadores (F) comprende los cebadores (F1) de secuencia ID N.º 10 y secuencia ID N.º 11; y
- en el que el conjunto de cebadores (M) comprende
- los cebadores (M1) de secuencia ID N.º 12 y secuencia ID N.º 13;
- y
- 20 los cebadores (M2) de secuencia ID N.º 14 y secuencia ID N.º 15;
- o
- (II) una combinación en la que el conjunto de cebadores (B) comprende
- los cebadores (B5) de secuencia ID N.º 17 y secuencia ID N.º 18;
- los cebadores (B6) de secuencia ID N.º 19 y secuencia ID N.º 20;
- 25 los cebadores (B7) de secuencia ID N.º 21 y secuencia ID N.º 22;
- los cebadores (B8) de secuencia ID N.º 23 y secuencia ID N.º 24;
- los cebadores (B9) de secuencia ID N.º 25 y secuencia ID N.º 26;
- los cebadores (B10) de secuencia ID N.º 27 y secuencia ID N.º 28;
- y
- 30 los cebadores (B11) de secuencia ID N.º 29 y secuencia ID N.º 30,
- y
- en el que el conjunto de cebadores (F) comprende
- los cebadores (F2) de secuencia ID N.º 31 y secuencia ID N.º 32;
- los cebadores (F3) de secuencia ID N.º 33 y secuencia ID N.º 34;
- 35 los cebadores (F4) de secuencia ID N.º 35 y secuencia ID N.º 36;
- los cebadores (F5) de secuencia ID N.º 37 y secuencia ID N.º 38;
- los cebadores (F6) de secuencia ID N.º 39 y secuencia ID N.º 40 y

los cebadores (F7) de secuencia ID N.º 41 y secuencia ID N.º 42 y  
en el que el conjunto de cebadores (M) comprende:

los cebadores (M3) de secuencia ID N.º 43 y secuencia ID N.º 44;

y

5 los cebadores (M4) de secuencia ID N.º 45 y secuencia ID N.º 46.

2. El procedimiento según la reivindicación 1, siendo la PCR el método de amplificación génica.

3. El procedimiento según la reivindicación 2, siendo la PCR una PCR en tiempo real.

10

4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, usándose el ADN de una cepa estándar de *Escherichia coli* con una concentración constante como molde como control de referencia; y

15

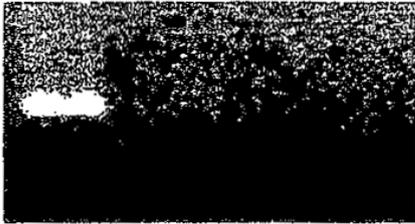
mediéndose un valor de T<sub>m</sub> de referencia en cada ciclo usando (B) el conjunto de cebadores que pueden amplificar diversas regiones de los genes del ARNr 16S de todas las bacterias para corregir un error en el valor de T<sub>m</sub> debido al aparato de medición.

20

5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, identificándose las bacterias patógenas utilizando la combinación de las diferencias entre los valores de T<sub>m</sub> junto con la combinación de los valores de T<sub>m</sub> como algoritmo de identificación de bacterias patógenas para minimizar el efecto de un error de medición.

6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, siendo el microorganismo una bacteria patógena responsable de la septicemia.

FIG. 1

BANDA ELECTROFORÉTICA DE BACTERIAS	CEBADOR	bac.6	hongos.5	spa.2	mecA2
					
BANDA ELECTROFORÉTICA DE HONGOS	CEBADOR	bac.6	hongos.5	spa.2	mecA2
					
BANDA ELECTROFORÉTICA DE SARM	CEBADOR	bac.6	hongos.5	spa.2	mecA2
					