

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 734**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2009 E 09783197 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.02.2015 EP 2342358**

54 Título: **Método para detectar microorganismos del género Kingella**

30 Prioridad:

**19.09.2008 EP 08164748**

**19.06.2009 EP 09163319**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.05.2015**

73 Titular/es:

**ASSISTANCE PUBLIQUE - HÔPITAUX DE PARIS  
(50.0%)**

**3 Avenue Victoria**

**75004 Paris, FR y**

**UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT - PARIS 7 (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BONACORSI, STÉPHANE;**

**BIDET, PHILIPPE y**

**BINGEN, EDOUARD**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 536 734 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Método para detectar microorganismos del género *Kingella*

5 La artritis séptica aguda en niños tiene que diagnosticarse y tratarse urgentemente debido al riesgo de secuelas a largo plazo. La identificación del organismo causante es necesaria para optimizar la selección de anticuerpos, pero los cultivos son negativos en de un tercio a dos tercios de los pacientes [1-3]. *La Kingella kingae*, un cocobacilo Gram-negativo, es parte de la flora orofaríngea normal de los niños desde los 6 meses hasta los 4 años [4, 5]. Inicialmente se consideró una causa rara de enfermedades invasivas, incluyendo infecciones esqueléticas en niños  
10 y endocarditis en adultos. Sin embargo, el número comunicado de casos de artritis por *K. kingae* ha aumentado de manera notable desde la década de 1990, principalmente debido a mejoras en las técnicas de cultivo, tales como inoculación de viales de cultivo sanguíneo con especímenes de articulación [3, 6]. En la bibliografía, *K. kingae* supone actualmente del 5 % al 29 % [2, 7-9] de infecciones osteoarticulares (IOA) positivas a cultivo, y hasta un 48 % de los casos de artritis séptica en niños de menos de 2 años de edad [10].

15 *K. kingae* es un microorganismo fastidioso y es posible que su frecuencia en la IOA esté subestimada. De hecho, varios métodos moleculares han demostrado recientemente una mayor prevalencia de *K. kingae* de la que se había comunicado anteriormente en este escenario. Rosey *et al.* y Verdier *et al.*, usando un método de PCR de ADN ribosomal 16S universal, encontraron secuencias de *K. kingae* en un 18 % y un 14% de especímenes de cultivo  
20 negativo de niños con IOA [2, 9]. Recientemente, Chometon *et al.*, usando un método de PCR en tiempo real sin sonda, descubrieron que *K. kingae* era la causa principal de IOA en niños en Lyon (Francia) [7].

La detección de ADN bacteriano no proporciona pruebas irrefutables de que la bacteria relevante tiene un papel patógeno [11]. De hecho, Dagan *et al* han demostrado que el ADN de organismos que colonizan el tracto respiratorio, tales como neumococos, pueden detectarse mediante PCR en suero de pacientes no infectados [12].  
25 Por lo tanto, dada la habilidad de *K. kingae* de colonizar el tracto respiratorio de niños pequeños [5], se necesita un control adecuado para confirmar la relevancia de los diagnósticos basados en PCR.

A diferencia del cultivo, los métodos moleculares pueden detectar un patógeno durante hasta varios días o semanas después de comienzo de terapia antibiótica eficaz en varias enfermedades infecciosas [13-16]. A este respecto, sería de interés determinar la contribución de la PCR para diagnosticar la infección por *K. kingae* en niños que ya han recibido antibióticos antes de la aspiración de fluido articular.

35 La presente invención describe y evalúa un nuevo método de PCR en tiempo real específico para *K. kingae* con una sonda fluorogénica, y lo aplica a muestras de sangre y de fluido articular de niños en los que se sospecha que tienen artritis séptica aguda. También se describen las características de la artritis por *K. kingae* en este grupo.

La invención, por lo tanto, se refiere a un método para detectar la presencia de un microorganismo del género *Kingella* en una muestra biológica de un paciente, que comprende la amplificación mediante la PCR de una parte de un gen de chaperonina de dicho microorganismo, como se especifica más adelante.

45 Las chaperoninas o chaperonas son proteínas que asisten al plegamiento/desplegamiento no covalente y al ensamblaje/desensamblaje de otras estructuras macromoleculares, pero que no suceden en estas estructuras cuando estas últimas están llevando a cabo sus funciones biológicas normales. Normalmente están relacionadas con el plegamiento de proteínas, pero también asisten al ensamblaje de otras estructuras, tales como nucleosomas de histonas plegadas y ADN. Algunas chaperonas de ensamblaje, especialmente en el núcleo, están relacionadas con el ensamblaje de subunidades plegadas en estructuras oligoméricas.

50 La estructura aminoacídica de las chaperoninas está bastante conservada entre especies. Como ejemplo, hay cierto grado de identidad entre cpn60 de *K. kingae* y la proteína ortóloga en *Neisseria*.

Para identificar las proteínas chaperoninas en *Kingella*, es posible diseñar una sonda a partir de una región conservada de una chaperonina de otros microorganismos, y usar esta sonda en el genoma de *Kingella*. Dicho genoma se ha cortado y clonado preferentemente en vectores, tales como BAC o cósmidos. La hibridación de la sonda a uno (o más) de los vectores indica la presencia de un gen que presenta homología con esta sonda en dicho vector. Por lo tanto es posible secuenciar el vector, identificar el gen y confirmar que codifica una proteína chaperonina. Dicho método (y otros) se conocen bien por el experto en la materia.

60 Como alternativa, es posible secuenciar el genoma completo de un microorganismo de *Kingella*. La secuenciación de un genoma bacteriano completo está bien descrito en la técnica. Por lo tanto es posible predecir las secuencias codificantes en este genoma, usando programas informáticos específicos (esto es también más fácil de hacer en secuencias genómicas bacterianas que en secuencias genómicas eucariotas, debido a la ausencia de intrones). La comparación de las proteínas predichas con bases de datos dará lugar a la identificación de proteínas chaperoninas del genoma de *Kingella*.

65

En la invención, dicho gen de chaperonina es un cpn60, una secuencia parcial del cual está representada por la SEC ID N°: 1. La SEC ID N°: 1 corresponde a la secuencia de GenBank AY123650. Cpn60 probablemente corresponde a GroEL en *Escherichia coli*.

5 La familia de proteínas GroEL está bien descrita en la técnica. Brocchieri y Karlin (Protein Science, 2000, 9:476-86) ha descrito la conservación entre secuencias de Hsp60 (otro nombre de GroEL) en relación a la estructura, función y evolución. El péptido obtenido de la traducción de SEC ID N°: 1 presenta aminoácidos que son específicos de una proteína GroEL. Usando esta homología de secuencias, es fácil identificar proteínas cpn60 de *Kingella*.

10 Los inventores han identificado una secuencia en esta proteína, conservada entre varias cepas biológicas, y determinados cebadores y sondas específicos que pueden usarse para detectar la presencia de dicho gen en una muestra de un paciente. La presencia de este gen supone la presencia del huésped, es decir, el microorganismo de *Kingella*.

15 En particular, dicha secuencia conservada comprende los nucleótidos 225 a 399 de SEC ID N°: 1, y puede amplificarse con un par de cebadores seleccionados entre (SEC ID N°: 2/SEC ID N°: 3) y (SEC ID N°: 4/SEC ID N°: 5). Por lo tanto se pretende usar SEC ID N°: 2/SEC ID N°: 3, en particular, para la detección específica de *K. kingae*.

20 Dichos ácidos nucleicos amplificados comprenden las secuencias ilustradas de SEC ID N°: 11 a SEC ID N°: 16. Estas seis secuencias corresponden a productos amplificados de cepas de referencia y de cepas aisladas de pacientes.

El método de la invención hace posible detectar la presencia de microorganismos del género *Kingella*, y en particular de *Kingella kingae*.

25 La muestra biológica con la que se lleva a cabo la amplificación es cualquier muestra biológica (en particular, sangre, orina, fluido cefalorraquídeo, tejido endocárdico o muestra ósea). Sin embargo, debido a la naturaleza del microorganismo buscado, el método se lleva a cabo ventajosamente en una muestra de fluido articular.

30 El método de la invención se lleva a cabo en una muestra biológica que se ha recogido previamente de un paciente, mediante cualquier método conocido en la técnica. En una realización preferida, dicho paciente es un niño de menos de 15 años. De hecho, las infecciones por *Kingella* están presentes con más frecuencia en niños. En otra realización, dicho paciente es un niño de menos de 5 años.

35 El método de la invención es interesante para evaluar o confirmar un diagnóstico de una infección por *Kingella* en un paciente que tiene artritis aguda, osteomielitis o endocarditis.

40 La amplificación se lleva a cabo de acuerdo con métodos conocidos en la materia. Los documentos U.S. 4.683.202, 4.683.195, 4.800.159, y 4.965.188 divulgan técnicas de PCR convencionales. La PCR emplea típicamente dos cebadores oligonucleotídicos que se unen a un molde de ácido nucleico seleccionado (por ejemplo, ADN o ARN) desnaturizado mediante calentamiento. Una polimerasa termoestable cataliza la formación de los productos de extensión del cebador complementarios al molde.

45 La PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) hace posible determinar la cantidad de un ADN específico en una muestra. Puede llevarse a cabo directamente en un molde de ARN (donde se lleva a cabo transcripción inversa antes de la amplificación), o a partir de ADNc (efectuándose la transcripción inversa en un tubo separado). También se lleva a cabo fácilmente de manera directa en ADN genómico bacteriano.

50 La cuantificación del ácido nucleico de partida se lleva a cabo básicamente usando cebadores o restos marcados que se unirán a los ácidos nucleicos bicatenarios obtenidos en cada ciclo de amplificación. Estos restos marcados, una vez unidos al ADN emitirán una señal detectable (generalmente fluorescencia) que es proporcional a la cantidad de ADN bicatenario y puede medirse en tiempo real directamente en el tubo de reacción entre dos ciclos de amplificación.

55 Un parámetro importante para la qPCR es el valor de Ct, que es el ciclo donde hay un aumento significativo en la señal indicadora. Este valor está relacionado con la cantidad inicial de ADN y cuanto menor sea el valor de Ct, mayor sensibilidad tendrá el ensayo. Para los ciclos posteriores al Ct, hay un aumento exponencial de la fluorescencia detectada (relacionado con el aumento exponencial de ADN amplificado), hasta que el ADN amplificado alcanza un máximo.

60 SYBR® Green I es un reactivo usado de manera muy común para qPCR. Es un colorante que intercala de manera no específica en ADN bicatenario (ADNbc). La cantidad de colorante intercalado es proporcional a la cantidad de ADN bicatenario.

65 Otra posibilidad es el uso de sondas TaqMan®. Se une un fluoróforo al extremo 5' de la sonda y un inactivador al extremo 3'. Dicho inactivador puede ser un fluoróforo que emite fluorescencia mediante FRET (transferencia de

energía de resonancia de fluorescencia) cuando se excita por la energía (longitud de onda) emitida por el primer fluoróforo tras la excitación por la máquina. Un ejemplo de dichos pares de fluoróforo/inactivador es la pareja FAM/TAMRA.

- 5 Dicho inactivador también puede ser un inactivador de "agujero-negro" (u oscuro), que absorbe la energía emitida por el fluoróforo, pero la libera en forma de calor en vez de en forma de fluorescencia, dando lugar de este modo a una mejor relación señal a ruido.

10 El principio de las sondas TaqMan® es idéntico, independientemente del inactivador usado. La sonda se une al amplicón durante cada etapa de hibridación de la PCR. Cuando la polimerasa *Taq* extiende desde el cebador que está unido al amplicón, desplaza el extremo 5' de la sonda, que se degrada a continuación mediante la actividad de exonucleasa 5'-3' de la polimerasa *Taq*. La escisión continua hasta que la sonda restante se disocia del amplicón. Este proceso libera al fluoróforo y al inactivador en solución, separándolos espacialmente (en comparación con cuando estaban unidos por la sonda).

15 En el caso de usarse una pareja de fluoróforos (tales como FAM/TAMRA), esto da lugar a un aumento irreversible en la fluorescencia del primer fluoróforo (FAM) y a una disminución en la fluorescencia del inactivador (TAMRA). Cuando se usa un inactivador de agujero negro, se puede observar un aumento irreversible en la fluorescencia del fluoróforo.

20 Los inactivadores oscuros son completamente no fluorescentes, y tienen un fondo extremadamente bajo. El uso de inactivadores oscuros mejora significativamente las proporciones señal a ruido y por lo tanto dan una mayor sensibilidad en PCR multiplexada.

25 También es posible usar sondas de baliza molecular. Estas se conocen bien en la técnica, y son sondas de hibridación de oligonucleótido monocatenario que forman una estructura de tallo y bucle, donde el bucle contiene la secuencia de la sonda complementaria a la secuencia diana, y el tallo se forma hibridando secuencias de brazos complementarios que están ubicadas a ambos lados de la secuencia de la sonda. Se une un fluoróforo covalentemente al extremo de un brazo y se une un inactivador covalentemente al extremo del otro brazo, de tal forma que el fluoróforo está muy cercano al inactivador no fluorescente cuando las balizas moleculares están libres en solución. Por lo tanto, no hay emisión de fluorescencia.

35 Cuando las balizas moleculares hibridan con una hebra de ácido nucleico que contiene una secuencia diana, forman un híbrido sonda-diana que es más largo y más estable que el híbrido de tallo, de este modo sufriendo una reorganización conformacional espontánea que fuerza la disociación del híbrido de tallo. El fluoróforo y el inactivador se apartan entre sí, de este modo restaurando la fluorescencia.

40 También es posible usar sondas que poseen ambas ventajas de las sondas TaqMan® y de baliza molecular. Estas sondas son complementarias a las secuencias diana y se añade una "cola" (unos pocos nucleótidos) a sus extremos 3' que son complementarios a los primeros nucleótidos de la sonda. Se une covalentemente un fluoróforo al extremo de un brazo de la sonda y se une covalentemente un inactivador al extremo del otro brazo. Cuando la sonda está libre en solución, forma un bucle como las sondas moleculares, no dando lugar de este modo a fluorescencia. Cuando la secuencia diana está presente, la sonda hibrida con esta, de este modo dando lugar a la restauración de la fluorescencia. Ya que el extremo 5' de la sonda es complementario a la secuencia diana, la polimerasa *Taq* (que se extiende del cebador que está unido al amplicón) estará disponible para el extremo 5' de la sonda y la degradará (tal como sucede en TaqMan®), de este modo liberando al fluoróforo. Por lo tanto hay dos fuentes de emisión de fluorescencia durante la amplificación (unión de la sonda a las dianas amplificadas y la liberación del fluoróforo), de este modo aumentando la sensibilidad de la detección.

50 El uso de PCR en tiempo real hace posible detectar la presencia de un ADN específico en una muestra más rápidamente y más fácilmente que la PCR convencional.

55 La invención también se refiere a un kit para detectar un microorganismo del género *Kingella* (específicamente *K. kingae*) que comprende un par de cebadores de SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 3 y la sonda de secuencia SEC ID N°: 7. También pueden incluirse instrucciones para usar este kit.

#### Figuras

60 Figura 1: Alineamiento Pretty de secuencias de la región de amplificación del gen *cpn60* en *Kingella kingae* y muestras positivas (SEC ID N°: 11 a SEC ID N°: 16).

Secuencia 1<sup>a</sup>: secuencia de referencia para la cepa de tipo *K. kingae*.

Secuencias 2<sup>a</sup> a 4<sup>a</sup>: otras cepas de referencia de *K. kingae*.

Secuencias 5<sup>a</sup> y 6<sup>a</sup>: PCR de *cpn60* efectuada en muestras de pacientes sin cultivo positivo.

65 En las secuencias 2<sup>a</sup> a 6<sup>a</sup>, los puntos representan bases idénticas a la 1<sup>a</sup> secuencia.

En la 7ª secuencia, los puntos representan bases no consenso entre las cuatro cepas de referencia de *K. kingae*. Las regiones de hibridación de la sonda y cebadores están indicadas en fuente negrita y subrayado en la secuencia consenso (7ª secuencia, SEC ID N°: 17).

## 5 Ejemplos

Materiales y métodos

### Pacientes y diagnóstico

10 Este estudio incluyó a todos los niños admitidos en el hospital entre enero de 2006 y enero de 2008 con sospechas de artritis séptica aguda. Este diagnóstico se definió por dolor articular y movimiento limitado de extremidades con o sin fiebre ( $\geq 38$  °C) y efusión articular visualizada mediante radiografía o sonografía. Todos los niños con sospecha de artritis séptica aguda se sometieron a una aspiración de fluido articular guiada por fluoroscopia para documentar la infección. La evaluación biológica incluyó el recuento de glóbulos blancos de sangre periférica (CMB), de proteína C-reactiva (CRP) y niveles de fibrinógeno.

### Métodos microbiológicos

20 Antes de la cirugía, se inoculó una muestra de sangre en viales de cultivo sanguíneo aerobio (BacT/ALERT 3D, BioMérieux). Durante la cirugía, se inoculó el fluido articular inmediatamente en los botes de cultivo sanguíneo aerobio. El resto de muestra de fluido articular se envió al laboratorio para tinción de Gram, recuento celular y para la inoculación inmediata en agar de sangre Columbia (incubado en condiciones anaerobias), agar de chocolate (incubado en aire enriquecido en CO<sub>2</sub>) y caldo de cerebro-corazón. Se almacenaron alícuotas (100-200  $\mu$ l) a -80 °C para la extracción de ADN. Los botes de cultivo sanguíneo y el otro medio se incubaron durante 5 y 10 días, respectivamente. Cuando hubo suficiente muestra disponible, se separaron de 100 a 200  $\mu$ l de plasma de las muestras de sangre obtenidas para el recuento CMB o para pruebas de coagulación, y se almacenaron a -80 °C para la extracción de ADN. Las muestras de drenaje de fluido articular se recogieron a los dos, cuatro y seis días después de la cirugía y se almacenaron a -80 °C para la extracción de ADN.

30 La identificación de *K. kingae* se basó en las características microbiológicas [10]. La susceptibilidad a antibiótico se ensayó con el método de difusión en disco en agar de sangre de oveja de Mueller-Hinton en aire enriquecido en CO<sub>2</sub> tal como se había descrito anteriormente [17]. La actividad de  $\beta$ -lactamasa se detectó con la prueba de nitrocefina.

### Investigaciones moleculares preliminares

35 Para desarrollar un método diagnóstico basado en la PCR elevadamente específico para *K. kingae*, se diseñaron primeramente dos pares de cebadores - Ksm1 (5' GCAAGAAGTCGGCAAAGAG 3', SEC ID N°: 2) y Ksm2 (5' GTCAAACAACAACACAAATGGG 3', SEC ID N°: 3), amplificando un fragmento de 175 pb, y KingF (TGTTGGCGCAAGCGATTGTTGCTG, SEC ID N°: 4) y KingR (CGCCCACTTGAGCGATTTGCTCG, SEC ID N°: 5), amplificando un fragmento de 169 pb - usando la secuencia del gen *cpn60* no ribosómico, que era la única secuencia disponible en la base de datos pública al comienzo del estudio (número de referencia AY123650). La especificidad de los cebadores se evaluó mediante PCR convencional en cuatro cepas de referencia de *K. kingae*, 12 especies y géneros genéticamente relacionados, y cuatro aislados no de *K. kingae* de pacientes con artritis séptica (Tabla 1). Los productos de amplificación obtenidos con los cebadores más específicos se secuenciaron, produciendo una secuencia consenso y permitiendo diseñar una "sonda King" específica: FAM-CGCGATCGCGACAAGTAGCCACGGTCAAGATCGCG-BHQ1 (SEC ID N°: 6). Una secuencia de sonda King preferente para su uso es 6-carboxifluoresceína-CGGTCAAATTGCATACCTTTAACCACTTCTTGACCG -inactivador de agujero negro 1 (SEC ID N°: 7).

### Diagnóstico molecular

55 Una vez a la semana, se extrajo ADN de los especímenes con la estación de trabajo BioRobot EZ1, usando el kit de tejido EZ1 ADN (Qiagen) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Parte del extracto de ADN se amplificó inmediatamente, y el resto se almacenó a -80 °C. Se incluyó en cada ejecución un control de extracción negativa, que consistía en todos los reactivos usados para la extracción de ADN, menos la muestra. La mezcla de PCR en tiempo real contenía 5  $\mu$ l de ADN, 1  $\mu$ l de cada cebador (Ksm1 y Ksm2) a 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ l de sonda a 10  $\mu$ M, y 25  $\mu$ L de IQ Multiplex Powermix (BioRad) en un volumen final de 50  $\mu$ l. La amplificación se llevó a cabo en un dispositivo iCycler (BioRad) con una etapa inicial de 15 minutos a 95 °C, seguida de 45 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C, y 30 segundos a 72 °C, y una etapa final de extensión de 10 minutos a 72 °C. Se incluyó un control positivo que consistía en ADN extraído de *K. kingae* CIP8016 en cada reacción. Para cada muestra, la amplificación del gen de betaglobulina humana (262 pb) con cebadores B2M-TR-1 (5' GCAAGGACTGGTCTTTCTATC 3', SEC ID N°: 8) y B2M-TR-2 (5' TACACAACCTTCAGCAGCTTACA 3', SEC ID N°: 9) y la sonda B2M-TR-sde (FAM-CGTGCCCTGCCGTGTGAACCATGTGACTTTGGCACG-BHQ1, SEC ID N° 10) sirvieron como control interno positivo de extracción y para detectar la presencia de inhibidores de la PCR.

Tratamiento

En caso de recuperarse fluido purulento de la aspiración de fluido articular, se llevó a cabo una artrotomía abierta o una artroscopia para el lavado de la articulación. Después de la cirugía, todos los pacientes recibieron un protocolo de tratamiento estándar. La terapia antibiótica empírica comenzó con cefotaxina intravenoso (200 mg/kg/24 h) y fosfomicina (200 mg/kg/24 h) durante 7 días, seguido en caso de no documentarse artritis, de amoxicilina/ácido clavulánico oral (80 mg/kg/24 h) y rifampicina (20 mg/kg/24 h) durante 5 semanas. En caso de documentarse artritis por *K. kingae*, el régimen antibiótico consistió en amoxicilina sola (150 mg/kg/24 h en 3 fracciones), durante el mismo espacio de tiempo. No se usó inmovilización por escayola. Todos los pacientes tuvieron un seguimiento de un mínimo de 6 meses.

Análisis estadístico

Las medias y las frecuencias se compararon usando la prueba U de Mann-Whitney y la prueba de Chi<sup>2</sup>. Los valores de p por debajo de 0,05 se consideraron que indicaban diferencias significativas.

## Resultados

Desarrollo de PCR en tiempo real específica de *K. kingae*

De los dos primeros pares, solo Ksm1-Ksm2 fue elevadamente específico para *K. kingae* (Tabla 1). Este par se usó para obtener secuencias del gen *cpn60* parciales de cuatro cepas de referencia de *K. kingae* a partir de dos de los aislados clínicos. Las secuencias resultantes, excluyendo regiones que se encontraron contenidas en varias mutaciones puntuales (n = 8) (números de referencia: EU864312-EU864316), se usaron entonces para diseñar una sonda (Figura 1). Los resultados de la RT-PCR para el panel de cepas de prueba estaban perfectamente de acuerdo con los resultados de la PCR convencional. El límite de detección del método RT-PCR, determinado con diluciones en serie de ADN genómico de *K. kingae* que contenían un número de 10<sup>6</sup> copias a 1 copia fue un número de 200 copias.

Características demográficas y microbianas

Durante el periodo de estudio, 89 pacientes con edades desde 1 mes hasta 14 años (media: 45 meses) se sometieron a cirugía en el hospital por sospecha de artritis séptica. Ninguno había recibido antibióticos en la semana anterior a su admisión. Se cultivó un microorganismo en 36 casos (40 %). *Staphylococcus aureus* fue el más prevalente (19 casos, 53 %), seguido de *K. kingae* (7 casos, 19 %). El rendimiento de los diferentes métodos de cultivo para el aislamiento de *K. kingae* se indica en la Tabla 2. *K. kingae* nunca se aisló mediante cultivo de sangre periférica. Ninguno de los siete aislados de *K. kingae* produjo β-lactamasas, y todos fueron susceptibles a amoxicilina, cefuroxina, cefotaxina, cotrimoxazol, ciprofloxacino y rifampicina. Los otros patógenos fueron *Streptococcus pneumoniae* (4 casos, 11%), *Salmonella spp* (3 casos, 8,3%), y *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* serogrupo W135, y *E. coli* K1 no encapsulados en un caso cada uno.

El método específico de RT PCR fue positivo en todos los pacientes con cultivo positivo a *K. kingae*, y negativo en todos los demás pacientes con artritis microbiológicamente documentada. Entre los 53 pacientes de cultivo negativo, el ensayo RT PCR identificó *K. kingae* en 24 casos (45 %). Por lo tanto, cuando se combinaron cultivo y RT PCR, *K. kingae* fue el patógeno principal entre los casos documentados (31/(36+24); 52%), por encima de *S. aureus* (19/60; 32%). La RT PCR también se aplicó a extractos de ADN de muestras de sangre de 15 pacientes con un diagnóstico molecular de infección por *K. kingae* (Tabla 2). Ninguno fue positivo. La RT PCR también se aplicó a muestras de fluido de drenaje articular de 9 pacientes. Todas las nueve muestras obtenidas 48 h después del inicio del tratamiento fueron positivas. Cuatro (80 %) de las cinco muestras obtenidas después de cuatro días fueron positivas, y también lo fueron 3 (75 %) de las 4 muestras obtenidas después de 6 días (Tabla 2).

Características clínicas y biológicas iniciales de pacientes con artritis por *K. kingae* (Tabla 3)

Veintisiete (87 %) de los 31 niños con artritis por *K. kingae* tenían menos de 24 meses de edad en comparación con solo tres (16%) de los 19 niños con artritis por *S. aureus* (p<0,001). Los síntomas comenzaron de promedio 3 días antes de la admisión (intervalo 1-10 d). La articulación más frecuentemente afectada fue la rodilla (52 %), seguida de la cadera (26 %). Un tercio de los pacientes no estaban febriles en el momento de la admisión. El nivel de CRP estaba ligeramente elevado en todos los casos salvo uno. El nivel de fibrinógeno estaba elevado en todos los pacientes ensayados. Por el contrario, el recuento de glóbulos blancos fue anormal en solo tres casos. La tinción de Gram de fluido articular mostró *K. kingae* en solo un caso. Los fluidos articulares fueron hemáticos en 6 casos y purulentos en otros con una mediana de recuento de células de 106.000 células/mm<sup>3</sup> (intervalo, 5.900-3.200.000 células/mm<sup>3</sup>). La distribución estacional de la artritis por *K. kingae* fue la siguiente: 9 casos en otoño, 7 casos en invierno, 12 casos en primavera, y 2 casos en verano.

Resultado

Después de 3 días de terapia antibiótica intravenosa, la CRP fue normal en solo 8 casos, pero la temperatura se encontraba por debajo de 37,5 °C en todos los casos (Tabla 3). Después de 7 días, el nivel de CRP fue normal en todos los 30 pacientes ensayados. La estancia en el hospital duró 7 días en todos los casos, debido al uso de un protocolo de tratamiento estándar. No se comunicaron complicaciones, incluyendo detención epifisaria, durante el seguimiento. Ninguno de los pacientes tuvo un procedimiento de revisión.

#### Discusión

En este estudio, se evaluó un método nuevo de PCR en tiempo real específico para *K. kingae* en una serie retrospectiva de niños hospitalizados consecutivos con artritis séptica aguda. También se ensayó, por primera vez, muestras de sangre obtenidas en el momento de la admisión y fluido articular obtenido durante el tratamiento.

La especificidad del método de RT PCR para *K. kingae* con una sonda fluorogénica se determinó ensayando no solo patógenos frecuentemente implicados en la artritis séptica, sino también en otras especies de *Kingella*, y un género relacionado filogenéticamente. Se descubrió que un gen *cpn60* homólogo está probablemente compartido por *K. kingae*, *K. oralis* y *K. denitrificans*, y por *Alyssiella spp.* Sin embargo, un par de cebadores (Ksm1-2) fue elevadamente específico para *K. kingae*. El diseño de la sonda se basó en las secuencias de los amplicones obtenidos con este par de cebadores y seis cepas de *K. kingae*, y tuvo en cuenta la presencia de varias regiones que portaban mutaciones puntuales. Para evaluar adicionalmente la especificidad del método, también se ensayó otro par de cebadores basándose en el gen de hemolisina *rtxA* de reciente secuenciación [18]. Todas las muestras de PCR en tiempo real positivas también fueron positivas para *rtxA* (no mostrado), lo que proporciona pruebas de la elevada especificidad del método de PCR.

Treinta y seis (40 %) de los 89 casos sospechosos de artritis séptica aguda se documentaron mediante cultivo, una proporción coherente con otros estudios [1-3]. *S. aureus* fue el patógeno principal detectado mediante cultivo (19 casos, 53%). *K. kingae* sumó el 19 % (7/36) de casos de cultivo positivo, una proporción similar a la comunicada por Yagupsky *et al* (22 %) [3] y mayor que la comunicada por Luhmann *et al* (8 %) [1]. Sin embargo, cuando se añadieron los resultados de método de PCR en tiempo real, la frecuencia de artritis documentada ascendió del 40 % al 67 %, y *K. kingae* se convirtió en el patógeno más prevalente (31 casos, 52 %). En los niños menores de 24 meses, *K. kingae* sumó el 75 % (27/36) de casos documentados.

Hasta donde se sabe, este es el segundo estudio para demostrar el beneficio potencial de un método de PCR específico para el diagnóstico de infecciones por *K. kingae* [7]. En comparación con cultivo convencional, nuestro método de PCR aumentó la tasa de detección de *K. kingae* en un factor de más de cuatro, de 7 a 31 casos. Chometon *et al.* comunicaron recientemente que el uso de un método de PCR específico aumentó el número de casos identificados de osteomielitis y artritis por *K. kingae* en un factor de ~2 (de 17 a 39), convirtiendo a éste en el patógeno más prevalente en niños con estas enfermedades [7]. Rosey *et al.*, usando un método de PCR de amplio espectro, descubrieron que el 30 % de los casos de artritis séptica en una población pediátrica con una mediana de edad de 32 meses se debían a *K. kingae* [2]. La mayor tasa observada en este caso (52 %) puede deberse en parte a la mejor sensibilidad de métodos específicos de PCR [7].

El ADN de *S. pneumoniae* que coloniza la garganta de niños pequeños puede entrar en el torrente sanguíneo y proporcionar diagnóstico falso positivo de infección para este organismo usando PCR en extracción de ácido nucleico de la sangre. [12]. Ya que *K. kingae* coloniza la garganta de hasta el 20 % de los niños pequeños, Yagupsky *et al.* indicaron que un resultado positivo en la PCR para fluido articular puede no probar necesariamente la responsabilidad de *K. kingae* [11]. Interesantemente, sin embargo, se ensayaron muestras de sangre prequirúrgica de 15 pacientes con un diagnóstico de artritis por *K. kingae*, y todas fueron negativas en la PCR. Estos resultados indican que la RT PCR en muestras de sangre no contribuye al diagnóstico etiológico, y que la positividad en la PCR de fluido articular no se debe a ADN bacteriano derivado de la sangre. Por lo tanto, se cree que se ha proporcionado un conjunto de control que proporciona pruebas del auténtico beneficio de la RT PCR para el diagnóstico de artritis por *K. kingae*. Además, la RT PCR siempre fue negativa en pacientes con artritis debida a otros patógenos, sirviendo también como conjunto de control [11], aunque tendieron a ser mayores que los niños con infección por *K. kingae*.

Las características demográficas y clínicas principales de los 31 casos de artritis aguda por *K. kingae* se encuentran en consonancia con comunicaciones anteriores [6-9, 19-21]. En particular, los pacientes con infección por *K. kingae* tendían a ser jóvenes (mediana de edad 19,3 meses, frente a 98 meses para artritis por *S. aureus*,  $p < 0,001$ ), lo que confirma la mayor prevalencia de este microorganismo en niños de menos de 3 años de edad [6-9, 19-21]. Los síntomas clínicos y biológicos en el momento de la admisión fueron normalmente leves, consistentes en una temperatura, CRP y valores de fibrinógeno ligeramente elevados. El fibrinógeno fue el marcador más sensible de inflamación en los pacientes, todos los cuales tenían valores anormales. La frecuencia de infección por *K. kingae* fue la más baja en verano (2 casos), también indicada en estudios anteriores [7, 9, 19]. De nuevo, de acuerdo con la bibliografía, se descubrió que la artritis por *Kingella* era siempre monoarticular, y principalmente afectó a las articulaciones inferiores (27/31 casos en la serie) [10]. *K. kingae* infectó principalmente la rodilla, tal como se esperaba [10], mientras que *S. aureus* o *S. pneumoniae* infectaron principalmente la cadera en la serie [22, 23]. De hecho, en la serie, *S. aureus* infectó la cadera en 9 de los 19 casos (no mostrado).

5 Lebel *et al.* sugirieron que la artrotomía quirúrgica para la artritis por *K. kingae* podía posponerse si la movilidad voluntaria de la articulación y la leucocitosis periférica mejoraba después de la terapia antibiótica [20]. Sin embargo, la cirugía sistemática parece preferible en esta experiencia. Todos los pacientes se sometieron a lavado articular quirúrgico en caso de fluido articular purulento. Cuando se aisló *K. kingae*, la terapia antibiótica oral consistió en amoxicilina sola (150 mg/kg/24 h) durante 5 semanas. Todos los pacientes se curaron y se encontraban libres de secuelas a los 6 meses, reflejando probablemente la importancia del control quirúrgico así como la baja patogenicidad de esta bacteria y su elevada susceptibilidad a la amoxicilina.

10 Un límite del diagnóstico basado en la PCR es que no proporciona información de la susceptibilidad antimicrobiana. Sin embargo, *K. kingae* es elevadamente susceptible a antibióticos de  $\beta$ -lactama: los valores comunicados de MIC50 de penicilina G y amoxicilina son 0,023 y 0,16 mg/l [17, 24]. Se ha comunicado que muy pocos aislados, incluyendo tres en Islandia, producen  $\beta$ -lactamasas [25]. Por lo tanto, se cree que, en la mayoría de países, puede tratarse una artritis por *K. kingae* diagnosticada mediante PCR de manera segura con un fármaco de  $\beta$ -lactama, tal como amoxicilina, proporcionando un fácil cambio de antibioterapia intravenosa a oral.

15 Otra ventaja de los métodos de la PCR es que pueden proporcionar un diagnóstico etiológico varios días o semanas después del comienzo del tratamiento [13-15]. Hasta donde se sabe, solo un estudio ha investigado esta propiedad en la artritis séptica [16]. La PCR de amplio espectro se aplicó a muestras en serie de fluido articular de seis adultos con artritis séptica debida a varias bacterias. El ADN de *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria meningitidis* y *Peptostreptococcus anaerobius* se detectó una semana después del comienzo del tratamiento. Del mismo modo, se demuestra por primera vez en el presente documento que el ADN de *K. kingae* puede detectarse en fluido articular durante hasta 6 días después del comienzo del tratamiento.

20 En conclusión, este nuevo método de RT PCR específica confirma que *K. kingae* es la principal causa bacteriana de artritis en niños. Se proporciona una prueba contundente de que el ADN de *K. kingae* en fluidos articulares no surge de una colonización nasofaríngea a través del torrente sanguíneo, y que el ADN bacteriano persiste durante varios días después del comienzo del tratamiento, permitiendo el diagnóstico retrospectivo. Esta técnica elevadamente sensible debe ayudar a determinar en estudios posteriores la duración óptima de la terapia antibiótica intravenosa y oral y de la hospitalización para pacientes con artritis por *K. kingae*. En una consideración más general, el método de RT PCR de la invención puede contribuir también en el futuro al diagnóstico de la endocarditis, al conocimiento de las características de colonización de este patógeno y a la investigación de brotes [4].

#### Referencias

- 35
1. Luhmann JD, Luhmann SJ. Etiology of septic arthritis in children: an update for the 1990s. *Pediatr Emerg Care* 1999;15:40-2.
  2. Rosey AL, Abachin E, Quesnes G, et al. Development of a broad-range 16S rDNA real-time PCR for the diagnosis of septic arthritis in children. *J Microbiol Methods* 2007;68:88-93.
  - 40 3. Yagupsky P, Dagan R, Howard CW, Einhorn M, Kassis I y Simu A. High prevalence of *Kingella kingae* in joint fluid from children with septic arthritis revealed by the BACTEC blood culture system. *J Clin Microbiol* 1992;30:1278-81.
  4. Kiang KM, Ogunmodede F, Juni BA, et al. Outbreak of osteomyelitis/septic arthritis caused by *Kingella kingae* among child care center attendees. *Pediatrics* 2005;116:e206-13.
  - 45 5. Yagupsky P, Dagan R, Prajrod F y Merires M. Respiratory carriage of *Kingella kingae* among healthy children. *Pediatr Infect Dis J* 1995;14:673-8.
  6. Mounile K, Merckx J, Glorion C, Berche P y Ferroni A. Osteoarticular infections caused by *Kingella kingae* in children: contribution of polymerase chain reaction to the microbiologic diagnosis. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22:837-9.
  - 50 7. Chometon S, Benito Y, Chaker M, et al. Specific real-time polymerase chain reaction places *Kingella kingae* as the most common cause of osteoarticular infections in young children. *Pediatr Infect Dis J* 2007;26:377-81.
  8. Lundy DW, Kehl DK. Increasing prevalence of *Kingella kingae* in osteoarticular infections in young children. *J Pediatr Orthop* 1998;18:262-7.
  9. Verdier I, Gayet-Ageron A, Ploton C, et al. Contribution of a broad range polymerase chain reaction to the diagnosis of osteoarticular infections caused by *Kingella kingae*: description of twenty-four recent pediatric diagnoses. *Pediatr Infect Dis J* 2005;24:692-6.
  - 55 10. Yagupsky P. *Kingella kingae*: from medical rarity to an emerging paediatric pathogen. *Lancet Infect Dis* 2004;4:358-67.
  11. Yagupsky P. Diagnosis of *Kingella kingae* arthritis by polymerase chain reaction analysis. *Clin Infect Dis* 1999;29:704-5.
  - 60 12. Dagan R, Shriker O, Hazan I, et al. Prospective study to determine clinical relevance of detection of pneumococcal DNA in sera of children by PCR. *J Clin Microbiol* 1998;36:669-73.
  13. Bonacorsi S, Farnoux C, Bidet P, et al. Treatment failure of nosocomial pertussis infection in a very-low-birth-weight neonate. *J Clin Microbiol* 2006;44:3830-2.
  - 65 14. Maas KS, Mendez M, Zavaleta M, et al. Evaluation of brucellosis by PCR and persistence after treatment in patients returning to the hospital for follow-up. *Am J Trop Med Hyg* 2007;76:698-702.

15. Nilsson AC, Bjorkman P y Persson K. Polymerase chain reaction is superior to serology for the diagnosis of acute *Mycoplasma pneumoniae* infection and reveals a high rate of persistent infection. *BMC Microbiol* 2008;8:93.
- 5 16. van der Heijden IM, Wilbrink B, Vije AE, Schouls LM, Breedveld FC y Tak PP. Detection of bacterial DNA in serial synovial samples obtained during antibiotic treatment from patients with septic arthritis. *Arthritis Rheum* 1999;42:2198-203.
17. Yagupsky P, Katz O y Peled N. Antibiotic susceptibility of *Kingella kingae* isolates from respiratory carriers and patients with invasive infections. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:191-3.
- 10 18. KehI-Fie TE, St Geme JW, 3rd. Identification and characterization of an RTX toxin in the emerging pathogen *Kingella kingae*. *J Bacteriol* 2007;189:430-6.
19. Gene A, Garcia-Garcia JJ, Sala P, Sierra M y Huguet R. Enhanced culture detection of *Kingella kingae*, a pathogen of increasing clinical importance in pediatrics. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23:886-8.
- 20 20. Lebel E, Rudensky B, Karasik M, Itzchaki M y Schlesinger Y. *Kingella kingae* infections in children. *J Pediatr Orthop B* 2006;15:289-92.
- 15 21. Yagupsky P, Dagan R. *Kingella kingae*: an emerging cause of invasive infections in young children. *Clin Infect Dis* 1997;24:860-6.
22. Ross JJ, Saltzman CL, Carling P y Shapiro DS. Pneumococcal septic arthritis: review of 190 cases. *Clin Infect Dis* 2003;36:319-27.
23. Wang CL, Wang SM, Yang YJ, Tsai CH y Liu CC. Septic arthritis in children: relationship of causative pathogens, complications, and outcome. *J Microbiol Immunol Infect* 2003;36:41-6.
- 20 24. Kugler KC, Biedenbach DJ y Jones RN. Determination of the antimicrobial activity of 29 clinically important compounds tested against fastidious HACEK group organisms. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;34:73-6.
- 25 25. Birgisson H, Steingrimsson O y Gudnason T. *Kingella kingae* infections in paediatric patients: 5 cases of septic arthritis, osteomyelitis and bacteraemia. *Scand J Infect Dis* 1997;29:495-8.

Tabla 1: Especificidad del cebador para la amplificación de ADN de *K. kingae*

Especie	Origen	Amplificación con cebadores <sup>d</sup>	
		KingF-R	Ksm1-2
<i>Kingella kingae</i>	CIP 80.16	+	+
<i>Kingella kingae</i>	CIP 68.12	+	+
<i>Kingella kingae</i>	CIP 73.01	+	+
<i>Kingella kingae</i>	CIP 102470	+	+
<i>Kingella denitrificans</i>	CIP 103473	+	-
<i>Kingella oralis</i>	CIP 103803	+	-
<i>Capnocytophaga canimorsus</i>	CIP 103936	-	-
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	CIP 103448	-	-
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	CIP 52.106	banda n.s.	-
<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>	CIP 70.73	-	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	CIP 52.152	-	-
<i>Cardiobacterium hominis</i>	CIP 70.70	-	-
<i>Eikenella corrodens</i>	CIP 70.75	banda n.s.	-
<i>Neisseria polysaccharea</i>	CIP 100113	-	-
<i>Alysiella crassa</i>	CIP 103341	+	-
<i>Conchiformibius steedae</i>	CIP 103435	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i> W135	Aislado clínico	-	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Aislado clínico	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Aislado clínico	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	Aislado clínico	-	-

a: +, amplificación positiva con una banda de la longitud esperada; -, no se observa banda, banda n.s.: banda no específica (de longitud no esperada).

Tabla 2: Diagnóstico microbiológico de 31 casos pediátricos de artritis aguda por *Kingella kingae*

Método diagnóstico	Proporciones (%) de resultados positivos
Cultivos de fluido articular en medio sólido	3/31 (10)
Cultivos de fluido articular en viales de cultivo sanguíneo	7/31 (22)
Cultivo de sangre periférica	0/31
PCR en tiempo real en fluido articular en el momento de la admisión	31/31 (100)
PCR en tiempo real en muestras de sangre en el momento de la admisión	0/15
PCR en tiempo real en fluido de drenaje articular	
2 días después del comienzo del tratamiento	9/9 (100)
4 días después del comienzo del tratamiento	4/5 (80)
6 días después del comienzo del tratamiento	3/4 (75)

Tabla 3: Características clínicas y biológicas de 31 casos pediátricos de artritis aguda por *Kingella kingae*

Características	Pacientes (%)	Mediana/media	Percentiles 10 <sup>o</sup> - 90 <sup>o</sup>	intervalo
Edad (meses)		16/19,3	10 - 38	8 - 68
Niños	18/31 (58)			
Localizaciones				
Rodilla	16/31 (52)			
Cadera	8/31 (26)			
Tobillo	3/31 (10)			
Hombro	1/31 (3)			
Codo	1/31 (3)			
Muñeca	1/31 (3)			
Articulación interfalángica proximal	1/31 (3)			
Temperatura en el momento de la admisión (°C)	19/31 (61) <sup>b</sup>	38/38	37 - 38,8	36,3 - 39,9
Temperatura en el día 3	0/31 (0) <sup>b</sup>			
CRP (mg/l) en el momento de la admisión	30/31 (97) <sup>b</sup>	32/39	18 - 69	10 - 133
CRP en el día 3	23/31 (74) <sup>b</sup>	22/28	10 - 63	10 - 122
CRP en el día 7	0/30 (0) <sup>b</sup>			
CMB <sup>a</sup> (x1000/mm <sup>3</sup> ) en el momento de la admisión	3/31 (10) <sup>b</sup>	12,3/12,4	9,3 - 16,3	6 - 19,6
Fibrinógeno (g/l) en el momento de la admisión	27/27(100) <sup>b</sup>	5,4/5,8	5 - 7,1	4,2 - 9,1

a: CMB: recuento de glóbulos blancos. b: proporción de valores anormales (Temperatura ≥ 38 °C, CRP>10 mg/l, CMB >17000/mm<sup>3</sup> entre 6 meses y 2 años; >15000/mm<sup>3</sup> entre 4 y 6 años, fibrinógeno >4 g/l)

## 5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Assistance Publique - Hopitaux de Paris

<120> Método para detectar microorganismos

<130> BRV 09 - WO

<150> EP08164748.9

<151> 19-09-2008

<150> EP09163319.8

<151> 19-06-2009

<160> 17

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 555

<212> ADN

< 213> *Kingella kingae*

# ES 2 536 734 T3

```

<400> 1
gcaaccgtgt tggcgcaagc gattgttgct gaaggcatga aatacgttac cgcagggcatg      60
aatcctaccg atttgaaacg cggatttgac aaagcagtgg cggctttggt tggcgaattg      120
gcaaacatcg cgaaaccttg cgaaacatac gagcaaatcg ctcaagtggg cgcgatttct      180
gcgaactctg acgagcaagt tggcaaaatc attgcagacg cgatgcaaga agtcggcaaa      240
gagggcgtga ttaccgttga agacggcaaa tcattggaaa acgagttaga agtggttaa      300
ggtatgcaat ttgaccgtgg ctacttgtcg ccttatttcg tgaatgattt ggaaaaaaca      360
atcgctgggt tggacagccc atttgtgttg ttgtttgaca aaaaaatcag caatatccgt      420
gatttgttgc cggttttgga acaagtggca aaaaccagcc gccattggtt gattatcgcg      480
gaagacgtgg aaggcgaagc attggcaact ttggttgtaa acagcattcg cggtatTTTg      540
aaaaccgttg cggta                                                              555

5  <210> 2
   <211> 19
   <212> ADN
   <213> Artificial

10 <220>
   <223> cebador Ksm1

   <400> 2
   gcaagaagtc ggcaaagag      19

15 <210> 3
   <211> 22
   <212> ADN
   <213> Artificial

20 <220>
   <223> cebador Ksm2

   <400> 3
   gtcaaacaac aacacaaatg gg      22

25 <210> 4
   <211> 24
   <212> ADN
   <213> Artificial

30 <220>
   < 223> cebador KingF

   <400> 4
   tgttggcgca agcgattgtt gctg      24

35 <210> 5
   <211> 23
   <212> ADN
   <213> Artificial

40 <220>
   < 223> cebador KingR

45 <400> 5
   cgcccacttg agcgatttgc tcg      23

   <210> 6
   <211> 35

```

ES 2 536 734 T3

<212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 < 223> sonda  
  
 <400> 6  
 cgcgatcgcg acaagtagcc acggtcaaga tcgcg 35  
  
 10 <210> 7  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 15 <220>  
 < 223> sonda  
  
 <400> 7  
 20 cggtcaaatt gcataccttt aaccacttct tgaccg 36  
  
 <210> 8  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 25 <220>  
 <223> cebador B2M-TR-1  
  
 <400> 8  
 30 gcaaggactg gtctttctat c 21  
  
 <210> 9  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador B2M-TR-2  
  
 <400> 9  
 40 tacacaactt tcagcagctt aca 23  
  
 <210> 10  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 45 <213> Artificial  
  
 <220>  
 < 223> sonda  
  
 <400> 10  
 50 cgtgccctgc cgtgtgaacc atgtgacttt ggcacg 36  
  
 <210> 11  
 <211> 175  
 <212> ADN  
 55 < 213> *Kingella kingae*  
  
 <400> 11  
 gcaagaagtc ggcaaagagg gcgtgattac cgttgaaggc ggcaaatcat tggaaaacga 60  
 gttagaagtg gttaaaggta tgcaatttga ccgtggctac ttgtcgcctt atttcgtgaa 120  
 60 tgatttgaa aaacaaatcg ctggtttga cagccattt gtggttgttgt ttgac 175  
  
 <210> 12

# ES 2 536 734 T3

<211> 175  
 <212> ADN  
 < 213> *Kingella kingae*

5      <400> 12  
           gcaagaagtc ggcaaagagg gcgtgatttc ccttgaaaac ggcaaatcat tggaaaacga      60  
           gttggaagtg gttaaaggta tgcaatttga ccgtggctac ttgtcgcctt atttcgtgaa      120  
           tgatttggaa aaacaaatcg ctggtttggg cagcccattt gtggttgttg ttgac      175

10      <210> 13  
 <211> 175  
 <212> ADN  
 < 213> *Kingella kingae*

          <400> 13  
           gcaagaagtc ggcaaagagg gcgtgattac cgttgaaggc ggcaaatcat tggaaaacga      60  
           gttggaagtg gttaaaggta tgcaatttga ccgtggctac ttgtcgcctt atttcgtgaa      120  
           tgatttggaa aaacaaatcg ctggtttggg cagcccattt gtggttgttg ttgac      175

15      <210> 14  
 <211> 175  
 <212> ADN  
 < 213> *Kingella kingae*

20      <400> 14  
           gcaagaagtc ggcaaagagg gcgtgattac cgttgaagac ggcaaatcat tggaaaacga      60  
           gttggaagtg gttaaaggta tgcaatttga ccgcggctac ttgtcacctt attttgtgaa      120  
           tgatttggaa aaacaaatcg ctggtttggg cagcccattt gtggttgttg ttgac      175

25      <210> 15  
 <211> 143  
 <212> ADN  
 < 213> *Kingella kingae*

          <400> 15  
           gcaagaagtc ggcaaagagg gcgtgattac cgttgaagac ggcaaatcat tggaaaacga      60  
           gttggaagtg gttaaaggta tgcaatttga ccgcggctac ttgtcacctt attttgtgaa      120  
 30      tgatttggaa aaacaaatcg ctg      143

35      <210> 16  
 <211> 143  
 <212> ADN  
 < 213> *Kingella kingae*

          <400> 16  
           gcaagaagtc ggcaaagagg gcgtgattac cgttgaagac ggcaaatcat tggaaaacga      60  
           gttggaagtg gttaaaggta tgcaatttga ccgcggctac ttgtcacctt attttgtgaa      120  
           tgatttggaa aaacaaatcg ctg      143

40      <210> 17  
 <211> 175  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

45      <220>  
 < 223> Secuencia consenso

# ES 2 536 734 T3

<400> 17  
gcaagaagtc ggcaaagagg gcgtgattwc csttgaarrc ggcaaatcat tggaaaacga 60  
gttrgaagtg gttaaaggta tgcaatttga ccgyggctac ttgtrcctt atttygtgaa 120  
tgatttgaa aaacaaatcg ctggtttga cagccattt gtgttgttgt ttgac 175

5

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para detectar la presencia de un microorganismo de *Kingella kingae* en una muestra biológica de un paciente, que comprende las etapas de
- 10 a. Llevar a cabo una amplificación PCR del ADN en dicha muestra con el par de cebadores de SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 3  
b. Detectar la presencia o la ausencia de un ácido nucleico amplificado, en el que la presencia de un ácido nucleico amplificado supone la presencia de un microorganismo de *Kingella kingae* en dicha muestra biológica.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha amplificación es una PCR en tiempo real.
3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la detección del producto de amplificación se lleva a cabo con una sonda de SEC ID N°: 7.
- 20 4. El método de la reivindicación 3, en el que dicha muestra contiene 6-carboxifluoresceína en su extremo 5' e inactivador de agujero negro 1 en su extremo 3'.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha muestra biológica es una muestra de fluido articular.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho paciente es un niño de menos de 15 años de edad.
- 25 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho paciente tiene artritis aguda.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 6, en el que dicho paciente tiene endocarditis.
- 30 9. Un kit para detectar un microorganismo del género *Kingella* que comprende un par de cebadores de SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 3 y la sonda de secuencia SEC ID N°: 7.
10. El kit de la reivindicación 9, en el que dicha muestra contiene 6-carboxifluoresceína en su extremo 5' e inactivador de agujero negro 1 en su extremo 3'.

