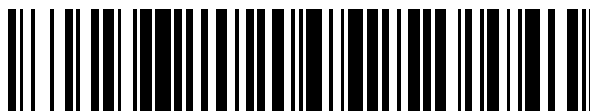


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 834**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.05.2014 PCT/PL2014/050029**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.11.2014 WO2014189398**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2014 E 14736045 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2016 EP 2999798**

54 Título: **Método para la detección simultánea de bacterias y hongos en una preparación biológica mediante PCR, cebadores así como kit de detección de bacterias y hongos**

30 Prioridad:

21.05.2013 PL 40399613

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

22.06.2017

73 Titular/es:

**UNIWERSYTET JAGIELLONSKI (100.0%)
Ul. Golebia 24
31007 Krakow, PL**

72 Inventor/es:

**GOSIEWSKI, TOMASZ;
BRZYCHCZY-WLOCH, MONIKA;
PIETRZYK, AGATA y
BULANDA, MALGORZTA**

74 Agente/Representante:

LOZANO GANDIA, José

ES 2 618 834 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).

MÉTODO PARA LA DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE BACTERIAS Y HONGOS EN UNA PREPARACIÓN BIOLÓGICA MEDIANTE PCR, CEBADORES ASI COMO KIT DE DETECCIÓN DE BACTERIAS Y HONGOS

DESCRIPCIÓN

5 El objeto de la invención es un método para la detección simultánea de bacterias y hongos en una muestra de material biológico mediante PCR, cebadores para detección de bacterias y hongos, y un kit para detectar estos microorganismos en una muestra de material biológico. La invención proporciona una manera de realizar una
10 detección de ADN simultánea de bacterias Gram-negativas, bacterias Gram-positivas, hongos de levadura y hongos de moho en una muestra de material biológico, tal como saliva o sangre del paciente.

15 Las infecciones producidas por bacterias y hongos siempre han sido un gran problema médico. Lo más peligroso de ellas son las infecciones sistémicas, es decir, la sepsis. A pesar del progreso de su tratamiento, conseguido principalmente a través del uso de antibioterapia y la introducción en la práctica médica de tecnologías para soporte vital prolongado de pacientes en estado crítico, todavía se está fallando a la hora de mantener con vida a muchos
20 pacientes. Paradójicamente, con el desarrollo del conocimiento médico y la introducción de procedimientos terapéuticos cada vez más nuevos en el tratamiento, la incidencia de la sepsis está aumentando. Lever *et al.* indicaron que, cada año en los EE.UU., 750.000 personas enferman de sepsis y esta es la causa de más de 215.000 muertes. En la Unión Europea, 146 mil pacientes mueren anualmente debido a sepsis grave. Sólo en el R.U. la mortalidad por la misma oscila desde 30 hasta 50/100.000 al año, lo que sitúa a la sepsis al frente de las diez principales causas de muerte. En los países desarrollados, la sepsis se desarrolla en 2-4/1.000 neonatos recién nacidos y es la principal causa de su muerte. En Polonia, existe una falta de datos epidemiológicos precisos, sin embargo Zielinski *et al.* proporcionan información acerca de 967 muertes producidas en 2005 debidas a sepsis,
25 incluyendo 43 muertes de niños. La creciente mortalidad debida a la sepsis es el resultado de la creciente resistencia a los antibióticos, el uso de métodos de tratamiento invasivos y el envejecimiento de la población. La sepsis es la mayor amenaza de las personas inmunocomprometidas especialmente cuando son hospitalizadas a lo largo de periodos prolongados de tiempo, principalmente en unidades de cuidados intensivos. Esto afecta particularmente a pacientes con enfermedades neoplásicas, pacientes inmunocomprometidos, pacientes con quemaduras, a los ancianos y niños.

30 El problema más importante y más difícil en el tratamiento de infecciones del torrente sanguíneo, que determina la eficacia del tratamiento y, por consiguiente, los costes y la duración de la hospitalización, es el diagnóstico eficaz de los factores que producen la respuesta inflamatoria sistémica en el transcurso de la sepsis. La identificación del agente etiológico (microorganismo: hongo o bacteria) permite el empleo de antibioterapia con direccionamiento
35 eficaz. El material sometido a pruebas de diagnóstico es preferiblemente sangre tomada de un paciente que manifiesta síntomas clínicos de sepsis, tales como taquicardia, bradicardia, temperatura corporal aumentada o disminuida, descenso en la tensión arterial, etc.

40 La sangre plantea los mayores retos entre todos los materiales biológicos con respecto a un material para pruebas microbiológicas. La mayor dificultad es el hecho de que los microorganismos responsables de la infección pueden encontrarse en sangre en cantidades muy pequeñas, o existe sólo su liberación periódica en la sangre.

45 A pesar de esto, los patrones de diagnóstico actuales son cultivos de sangre realizados sobre medios especiales, idealmente en sistemas de cultivo automatizados (por ejemplo, BACTEC - Becton Dickinson). Las ventajas de tales métodos son su simplicidad y costes relativamente bajos de las pruebas. Su punto débil es que requieren mucho tiempo, durando hasta 5 días (hasta que se emiten los resultados de la prueba), y tienen baja sensibilidad, lo que hace que sólo se obtenga el crecimiento microbiano del 15-20% del cultivo. Por consiguiente, en la gran mayoría de los casos, el doctor sólo puede aplicar antibioterapia empírica debido a la falta en el logro del crecimiento de
50 microorganismos responsables de la infección. La situación se agrava adicionalmente por el hecho de someter a los pacientes a antibioterapia antes de que se extraiga cualquier muestra de sangre para el cultivo – los pacientes a menudo se tratan con antibióticos antes de manifestar los síntomas de la sepsis. Los cultivos de sangre son muy problemáticos en casos de este tipo, debido al hecho de que contienen antibióticos que inhiben el crecimiento de los microorganismos. Con el fin de aumentar las posibilidades de detectar los agentes microbiológicos en sangre, se están realizando intentos sobre la base de su detección en métodos serológicos tales como la detección de
55 liposacáridos (LPS) de bacterias Gram-negativas o galactomanano fúngico.

60 Otra diana molecular que permite un diagnóstico eficaz, preciso y rápido de infecciones en el torrente sanguíneo son los ácidos nucleicos microbianos que son agentes etiológicos de infección. Tanto el ADN como el ARN de cada organismo contienen secuencias únicas de los mismos, constituyendo una "huella" específica. Con el conocimiento de estas secuencias, es posible aplicar métodos biológicos moleculares, tales como PCR o hibridación, para determinar la presencia de microorganismos en la sangre. La sensibilidad de los métodos moleculares supera considerablemente la sensibilidad del método de cultivo. Además, el uso anterior de una terapia antibiótica no influye en el resultado de la prueba debido al hecho de que no hay necesidad de crecimiento de bacterias u hongos en medios de cultivo, sino sólo la detección de sus secuencias de ADN o ARN.

65 Varias memorias descriptivas y solicitudes de patente, como por ejemplo los documentos EP2547782, EP2087134,

EP1978111 o EP2009118, dan a conocer el uso de métodos de PCR para la detección de microorganismos específicos basados en los cebadores desarrollados.

5 La solicitud EP2547782 da a conocer la detección de microorganismos del grupo *Staphilococcus* en el sistema PCR multiplex basado en los cebadores y sondas desarrollados, pero sin la aplicación del sistema de PCR anidada.

10 La presente invención es un método para la detección de bacterias y hongos en una muestra de material biológico, en el que el ADN contenido en la muestra de material biológico se somete a amplificación en PCR multiplex en tiempo real multiplex. La reacción de amplificación se realiza en dos fases con el uso de cebadores específicos para las bacterias y cebadores específicos para los hongos en la primera fase, y después se usa el producto de la primera amplificación multiplex como molde en la segunda fase, es decir, amplificación usando cebadores y sondas que diferencian hongos en un grupo de hongos de moho y hongos y bacterias de tipo levadura en bacterias Gram-positivas y bacterias Gram-negativas. Los cebadores específicos para la secuencia de ARNr 16S de bacterias se usan como cebadores específicos para las bacterias, preferiblemente oligonucleótidos con las siguientes secuencias:

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'
NEST_BAC_F	GGCGGACGGGTGAGTAA
NEST_BAC_R	CGCATTTACCGCTA

20 Se usan cebadores específicos para la secuencia de ARNr 18S de hongos como cebadores específicos para los hongos, preferiblemente oligonucleótidos con las siguientes secuencias:

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'
NEST_FUN_F	AATTGACGGAAGGGCACC
NEST_FUN_R	TTCCTCGTTGAAGAGCAA

De conformidad con el método de la invención, en la segunda fase de amplificación, la detección e identificación de las bacterias se realiza con el uso de cebadores con secuencias:

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'
GN/GP_F	GACTCCTACGGGAGGC
GN/GP_R	GCGGCTGCTGGCAC

25 y sondas con secuencias:

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'
GP_Probe	Hex- CTGAyssAGCAACGCCGCG -TAMRA
GN_Probe	Cy5 -CCTGAysCAGCmATGCCGCG- BHQ-2

30 mientras que para la amplificación para detectar e identificar hongos, se usan cebadores con secuencias:

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'
FUN_F	TTGGTGGAGTGATTTGTCTGCT
FUN_R	TCTAAGGGCATCACAGACCTG

y sondas con secuencias:

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'
Candid_probe	FAM-
Asperg_probe	TexasRed-

35 Preferiblemente, en el método de la invención, la detección de bacterias y hongos se realiza en una muestra de material biológico aislado de un paciente, preferiblemente de la sangre de un paciente con síntomas de sepsis.

Se dan a conocer oligonucleótidos con secuencias:

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'
NEST_BAC_F	GGCGGACGGGTGAGTAA
NEST_BAC_R	CGCATTTACCGCTA

40 para su uso como cebadores en una reacción de PCR para detectar bacterias.

Se dan a conocer oligonucleótidos con secuencias:

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'
NEST_FUN_F	AATTGACGGAAGGGCACC
NEST_FUN_R	TTCCTCGTTGAAGAGCAA

para su uso como cebadores en una reacción de PCR para detectar hongos.

- 5 La invención proporciona también un kit para la detección de bacterias y hongos en una muestra de material biológico mediante PCR en tiempo real multiplex anidada que contiene los siguientes oligonucleótidos:

para la detección de bacterias, cebadores específicos para ARNr 16S de bacterias:

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'
NEST_BAC_F	GGCGGACGGGTGAGTAA
NEST_BAC_R	CGCATTTACCGCTA

10 y

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'
GN/GP_F	GACTCCTACGGGAGGC
GN/GP_R	GCGGCTGCTGGCAC

15 y sondas específicas para ARNr 16S de bacterias con secuencias:

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'
GP_Probe	Hex- CTGAyssAGCAACGCCGCG -TAMRA
GN_Probe	Cy5 -CCTGAysCAGCmATGCCGCG- BHQ-2

así como

20 para la detección de hongos, cebadores específicos para ARNr 18S de hongos:

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'
NEST_FUN_F	AATTGACGGAAGGGCACC
NEST_FUN_R	TTCCTCGTTGAAGAGCAA

y:

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'
FUN_F	TTGGTGGAGTGATTTGTCTGCT
FUN_R	TCTAAGGGCATCACAGACCTG

- 25 y sondas específicas para ARNr 18S de hongos con secuencias:

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'
Candid_probe	FAM-
Asperg_probe	TexasRed

30 El método de detección reivindicado se basa en la reacción de PCR multiplex en tiempo real, con una amplificación simultánea posible de al menos dos secuencias de ADN. Además, el método de la invención realiza el método de PCR multiplex anidada, es decir, una reacción de amplificación de dos fases, que aumenta significativamente la sensibilidad de detección.

35 El método reivindicado proporciona la detección fiable de todas las especies de hongos y bacterias (con diferenciación entre bacterias Gram-positivas, bacterias Gram-negativas, hongos de levadura y hongos de moho) en muestras de ADN aisladas de la sangre de pacientes que manifiestan síntomas de sepsis. Es posible emplear este método para detectar sólo bacterias o sólo hongos pero, al mismo tiempo, su ventaja es la posibilidad de usarlo para la detección simultánea tanto de hongos como de bacterias, dando como resultado menores costes de las pruebas .

40 No se requiere la detección de productos de PCR de la primera amplificación, ya que el resultado final de la prueba de diagnóstico es visible en la segunda amplificación. Si la amplificación I falla en obtener la multiplicación de ADN usando los cebadores diseñados, entonces durante la segunda fase de amplificación, también se obtendrá otro resultado negativo (sin microorganismos en la muestra de material biológico). Esto no impide llevar a cabo la detección de producto tras la finalización de la amplificación I con el uso de electroforesis en gel de ADN, empleando

opcionalmente métodos espectrofotométricos.

La detección e identificación de productos de PCR de la segunda fase de amplificación tiene lugar ya durante el procedimiento de multiplicación de ADN. Las sondas usadas, GP_probe, GN_probe, Candid_probe, Asperg_probe, se unen específicamente a los productos resultantes de amplificación de secuencias de ADN típicas de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, hongos de levadura y hongos de moho y emiten luz fluorescente que se registra mediante el detector durante la amplificación. Cada una de las cuatro sondas se equipa con un marcador fluorescente de una longitud de onda de emisión de luz definida estrictamente, típica para una sonda dada, que permite la diferenciación de los cuatro grupos particulares de microorganismos.

La divulgación abarca cebadores universales específicos nuevos para bacterias y cebadores universales nuevos para hongos, cuya aplicación para la amplificación de material genético a partir de muestras mediante PCR permite incorporar el panel completo de microorganismos bacterianos y fúngicos (con diferenciación entre bacterias Gram-negativas, bacterias Gram-positivas, hongos de levadura, y hongos de moho), pero sin tipificación de especies específicas. Tal información es muy útil para el médico en la selección del tratamiento apropiado antes de obtener el resultado de la identificación que especifica las especies de bacterias u hongos del laboratorio de microbiología.

Los sistemas usados actualmente no poseen la universalidad indicada. Los sistemas empleados (por ejemplo, SeptiFast - Roche) hacen posible detectar entre diez y veinte especies específicas de microorganismos o (como SeptiTest - Molzym) teóricamente permiten la detección de cualquier especie posible, sin embargo, se requiere la secuenciación del producto de PCR, que aumenta el coste y prolonga el tiempo de espera del resultado.

El método de la invención que utiliza técnicas de PCR multiplex en tiempo real permite la detección simultánea de bacterias y hongos en tiempo real sin necesidad de esperar los resultados de electroforesis de ADN, como es el caso de PCR convencional. Además, el uso del sistema anidado permite el aumento de la sensibilidad del método de detección mediante dos órdenes de magnitud en comparación con PCR de una fase. La aplicación de la secuenciación del producto de PCR tampoco es necesaria para identificar una especie particular de microorganismo.

El método de la invención permite la detección rápida de todas las especies de hongos (diferenciando entre hongos de levadura y hongos de moho) y todas las especies de bacterias (diferenciando entre Bacterias Gram-negativas y Gram-positivas), sin identificar especies específicas. El método de detección facilita el confirmar rápidamente la presencia de infección con alta sensibilidad, superando los inconvenientes de los métodos disponibles comercialmente que requieren más tiempo y un amplio espectro de experimentos orientados a un número limitado de las especies más comunes.

En el método reivindicado, también es posible tipificar una especie microbiana específica tras la secuenciación del producto de PCR obtenido en la amplificación I o II, sin embargo, no se requiere para el diagnóstico inicial.

Una divulgación preferida se representa en los dibujos, en los que:

la figura 1 presenta secuencias de ARNr 18S fúngico con marcado de los cebadores desarrollados, NEST_FUN_F, NEST_FUN_R (recuadro gris), y cebadores conocidos de la bibliografía, FUN_F, FUN_R (recuadro transparente); las secuencias están en una cadena de ADN, por tanto, se invierte la secuencia final marcada en el recuadro gris y es complementaria al equivalente de R sintetizado;

la figura 2 presenta secuencias de ARNr 16S bacteriano con marcado de los cebadores desarrollados, NEST_BAC_F, NEST_BAC_R (recuadro gris), y cebadores conocidos de la bibliografía, GN/GP_F, GN/GP_R (recuadro transparente); las secuencias están en una cadena de ADN, por tanto, se invierte la secuencia final marcada en el recuadro gris y es complementaria al equivalente de R sintetizado;

la figura 3 muestra una comparación de la proporción de resultados positivos obtenidos por el método de la invención, de 102 muestras de sangre originarias de pacientes con síntomas clínicos de sepsis: de forma sistemática y desglosados en cuatro grupos de microorganismos;

mientras que la figura 4 presenta una comparación de la proporción de resultados positivos en el estudio de 102 muestras de sangre originarias de pacientes con síntomas clínicos de sepsis usando el método de cultivo en el sistema BACTEC y según el método de la invención.

Sección de experimentación

La metodología de amplificación de ADN microbiano se llevó a cabo sobre un molde de ADN aislado de sangre humana.

La amplificación anidada se llevó a cabo en dos fases de amplificación separadas marcadas con números romanos - I y II. En la fase I, se usaron cebadores desarrollados recientemente específicos para *Prokarya* (bacterias) y *Eucaryota* (hongos), específicos para secuencias de unidades de ARNr 16S (bacterias) y ARNr 18S (hongos).

Después de eso, se utilizó el producto de la primera (I) amplificación de PCR como molde en la segunda (II) amplificación, donde cebadores y sondas conocidos en la bibliografía encontraron su aplicación en la diferenciación de hongos en un grupo de hongos de moho y hongos de tipo levadura y bacterias en bacterias Gram-positivas y bacterias Gram-negativas. La aplicación de PCR anidada permite aumentar la sensibilidad del método.

5 En el método de la invención, se aplicaron sondas y cebadores TaqMan conocidos en la bibliografía, y al mismo tiempo, se desarrolló un sistema multiplex en el proyecto, lo que permite que se combinen en una única reacción.

10 Se diseñaron cebadores para la amplificación I y se sometió a prueba *in silico* con el uso de la base BLAST/NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), tal como se muestra en la figura 1. Con el fin de determinar la sensibilidad del método, se llevó a cabo el aislamiento de ADN de las muestras de sangre (procedentes de voluntarios sanos), que se infectaron de manera artificial con microorganismos de modelos: bacterias Gram-negativas - *Escherichia coli* ATCC 25922 (American Type Culture Collection); bacterias Gram-positivas - *Staphylococcus aureus* ATCC 33497; hongos de tipo levadura - *Candida albicans* ATCC 10231, hongos de moho - *Aspergillus fumigatus* ATCC 14110, de modo que se crea un gradiente de su número en sangre. Se usó el ADN aislado para realizar la amplificación de PCR multiplex anidada diseñada. Los resultados del ensayo de sensibilidad del método se dan en la tabla 1. La tabla 15 1 también comprende datos comparativos para la amplificación que excluye el sistema anidado, que usa los cebadores diseñados, sin embargo, disminuye entonces la sensibilidad del método.

20 Tabla 1. La sensibilidad de detección de bacterias y hongos en sangre usando el método de PCR en tiempo real en dos variaciones: PCR multiplex anidada y PCR multiplex con los cebadores diseñados.

Grupos de microorganismos / especies	Sensibilidad del método de PCR multiplex en tiempo real [CFU/ml]	
	PCR multiplex anidada	PCR multiplex
Hongos de moho (<i>A. fumigatus</i>)	4,0 x 10 ¹	3,25 x 10 ³
Hongos de levadura (<i>C. albicans</i>)	2,0 x 10 ¹	9,5 x 10 ²
Bacteria Gram (-)(<i>E. coli</i>)	6,5 x 10 ¹	5,2 x 10 ³
Bacteria Gram (+)(<i>S. aureus</i>)	6,0 x 10 ¹	5,1 x 10 ³

25 Las secuencias de los oligonucleótidos aplicados (sondas y cebadores) se recopilan en la tabla 2.

Tabla 2. Secuencias de cebadores y sondas usados en el estudio.

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'	Secuencias diana
NEST_BAC_F *	GGCGGACGGGTGAGTAA	ARNr 16S
NEST_BAC_R *	CGCATTTTCACCGCTA	ARNr 16S
NEST_FUN_F *	AATTGACGGAAGGGCACC	ARNr 18S
NEST_FUN_R *	TTCCTCGTTGAAGAGCAA	ARNr 18S
FUN_F	TTGGTGGAGTGATTTGTCTGCT	ARNr 18S
FUN_R	TCTAAGGGCATCACAGACCTG	ARNr 18S
Candid_probe	FAM-TTAACCTACTAAATAGTGCTGCTAGC-BHQ1	ARNr 18S
Asperg_probe	TexasRed-TCGGCCCTTAAATAGCCCGGTCCGC-Eclipse	ARNr 18S
GN/GP_F	GACTCCTACGGGAGGC	ARNr 16S
GN/GP_R	GCGGCTGCTGGCAC	ARNr 16S
GP_Probe	Hex- CTGAyssAGCAACGCCGCG - TAMRA (Q)	ARNr 16S
GN_Probe	Cy5 -CCTGAysCAGCmATGCCGCG-BHQ-2	ARNr 16S
* Secuencias nuevas de cebadores, diseñadas para los fines de la invención		

30 La composición de mezclas de reacción de PCR multiplex y PCR multiplex anidada se dan en la tabla 3, donde se proporcionan además los reactivos usados y los perfiles térmicos de amplificación.

Tabla 3. Composición de mezclas de reacción, los reactivos implicados y perfiles térmicos de PCR

PCR multiplex ANIDADA				PCR multiplex [volumen final 40 µl]	
Amplificación I [volumen final 25 µl]		Amplificación II [volumen final 10 µl]			
1. Agua	6,7 µl	1. Agua	2,08 µl	1. Agua	0,4 µl
2. Tampón B	2,5 µl	2. Tampón B	1,0 µl	2. Tampón B	5,0 µl
3. NEST_BAC_F	0,125 µl	3. GN/GP_F	0,2 µl	3. GN/GP_F	1,0 µl
4. NEST_BAC_R	0,125 µl	4. GN/GP_R	0,2 µl	4. GN/GP_R	1,0 µl
5. NEST_FUN_F	0,125 µl	5. GP_probe	0,05 µl	5. GP_probe	0,25 µl
6. NEST_FUN_R	0,125 µl	6. GN_probe	0,05 µl	6. GN_probe	0,25 µl
7. dNTP's	2,5 µl	7. FUN_F	0,2 µl	7. FUN_F	1,0 µl
8. MgCl ₂	2,5 µl	8. FUN_R	0,2 µl	8. FUN_R	1,0 µl
9. Taq polimerasa perpetua	0,3 µl	9. Asperg_prob	0,05 µl	9. Asperg_prob	0,25 µl
		10. Candid_probe	0,05 µl	10. Candid_probe	0,25 µl
10. ADN	10 µl	11. dNTP's	1,0 µl	11. dNTP's	5,0 µl
		12. MgCl ₂	1,8 µl	12. MgCl ₂	9,0 µl
		13. Taq polimerasa perpetua	0,12 µl	13. Taq polimerasa perpetua	0,6 µl
		14. ADN	3,0 µl	14. ADN	25,0 µl
		(producto de amplificación I)			

<ul style="list-style-type: none"> • Tampón B 10x (EURx) • dNTP's 2mM (EURx) • MgCl₂ mM (DNAGdansk) • Taq polimerasa perpetua 2,5 U/μl (EURx) • *NEST_BAC_F 10 μM (Genomed) – cebador anidado para la detección de bacterias • *NEST_BAC_R 10 μM (Genomed) – cebador anidado para la detección de bacterias • *NEST_FUN_F 10 μM (Genomed) – cebador anidado para la detección de hongos • *NEST_FUN_R 10 μM (Genomed) – cebador anidado para la detección de hongos • GN/GP_F 20μM (Genomed) – cebador anidado para la detección de bacterias • GN/GP_R 20μM (Genomed) – cebador anidado para la detección de bacterias • GP_probe 20μM (Genomed) – sonda para la detección de bacterias Gram-negativas • GN_probe 20μM (Genomed) – sonda para la detección de bacterias Gram-positivas • FUN_F 20μM (Genomed) – cebador para la detección de hongos • FUN_R 20μM (Genomed) – cebador para la detección de hongos • Asperg_prob 20μM (Genomed) – sonda para la detección de hongos de mohó • Candid_probe 20μM (Genomed) – sonda para la detección de hongos de levadura 		
<p>95°C – 5 min 95°C – 20 s 46°C – 20 s 72°C – 30 s</p> <p style="text-align: right;">} 30 x</p>	<p>95°C – 5 min 95°C – 15 s 65°C – 1 min</p> <p style="text-align: right;">} 40 x</p>	<p>95°C – 5 min 95°C – 15 s 65°C – 1 min</p> <p style="text-align: right;">} 40 x</p>

* Secuencias de los cebadores diseñados

Ejemplo 1

PCR multiplex en tiempo real anidada para la detección simultánea de bacterias y hongos.

5 Se realizó un estudio usando el método de PCR multiplex en tiempo real anidada desarrollado en 102 muestras de ADN aislado de la sangre de pacientes que manifestaban síntomas clínicos de sepsis con el fin de detectar bacterias Gram-positivas, bacterias Gram-negativas, hongos de levadura y hongos de mohó. La primera amplificación del ADN recogido se realizó en el volumen final de 25 ml en presencia de los cebadores diseñados recientemente: NEST_BAC_F, NEST_BAC_R, NEST_FUN_F, NEST_FUN_R con secuencias enumeradas en la tabla 1, usando Taq polimerasa perpetua, llevando a cabo 30 ciclos con parámetros de temperatura y tiempo presentados en la tabla 4. Después de eso, se sometieron 3 μl de la mezcla de la primera fase de amplificación que contenía ADN amplificado del microorganismo detectado a la segunda amplificación en el volumen final de 10 μl de la mezcla descrita en la tabla 4, realizando 40 ciclos térmicos.

10

15

Tabla 4. Composición de mezclas de reacción, los reactivos implicados y perfiles térmicos de PCR

PCR multiplex ANIDADA				
Amplificación I [volumen final 25 µl]		Amplificación II [volumen final 10 µl]		
1.	Agua	6,7 µl	1. Agua	2,08 µl
2.	Tampón B	2,5 µl	2. Tampón B	1,0 µl
3.	NEST_BAC_F	0,125 µl	3. GN/GP_F	0,2 µl
4.	NEST_BAC_R	0,125 µl	4. GN/GP_R	0,2 µl
5.	NEST_FUN_F	0,125 µl	5. GP_probe	0,05 µl
6.	NEST_FUN_R	0,125 µl	6. GN_probe	0,05 µl
7.	dNTP's	2,5 µl	7. FUN_F	0,2 µl
8.	MgCl ₂	2,5 µl	8. FUN_R	0,2 µl
9.	Taq polimerasa perpetua	0,3 µl	9. Asperg_prob	0,05 µl
			10. Candid_probe	0,05 µl
10.	ADN	10 µl	11. dNTP's	1,0 µl
			12. MgCl ₂	1,8 µl
			13. Taq polimerasa perpetua	0,12 µl
			14. ADN (producto de 3,0 µl amplificación I)	
95°C – 5 min		95°C – 5 min		
95°C – 20 s		95°C – 15 s		
46°C – 20 s		65°C – 1 min		
72°C – 30 s				
} 30 x		} 40 x		



5 La detección e identificación de los productos de PCR de la segunda amplificación se llevó a cabo en el transcurso del procedimiento de multiplicación de ADN. Las sondas usadas: GP_probe, GN_probe, Candid_probe, Asperg_probe, tras adherirse específicamente a los productos resultantes de amplificación de secuencias de ADN típicas de bacterias Gram-positivas, bacterias Gram-negativas, hongos de levadura y hongos de moho emitieron luz fluorescente registrada mediante el detector en el transcurso de la amplificación, permitiendo la identificación del producto amplificado.

10 Se compararon los resultados obtenidos con los resultados disponibles de los cultivos de las mismas 102 muestras de sangre adquiridas del método tradicional de diagnóstico para sepsis, basadas en un cultivo usando un sistema automatizado BACTEC (Becton Dickinson). En todas las muestras, se confirmaron los resultados generados por el cultivo y, además, se obtuvieron resultados positivos de la presencia de bacterias y hongos en una porción de muestras negativas en el cultivo. Esto valida la alta sensibilidad del nuevo método. Los resultados detallados se
15 presentan en las figuras 3 y 4.

Ejemplo 2. PCR multiplex en tiempo real - anidada para la detección de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas

20 La detección se realizó de manera análoga al método empleado en el ejemplo 1 usando cebadores NEST_BAC_F y NEST_BAC_R para la amplificación de ADN bacteriano, en las condiciones descritas en la tabla 5.

Tabla 5. La composición de las mezclas de reacción, los reactivos implicados y perfiles térmicos de PCR para la detección de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas

PCR multiplex ANIDADA			
Amplificación I [volumen final 25 µl]		Amplificación II [volumen final 10 µl]	
1) Agua	6,95 µl	1) Agua	2,58 µl
2) Tampón B	2,5 µl	2) Tampón B	1,0 µl
3) NEST_BAC_F	0,125 µl	3) GN/GP_F	0,2 µl
4) NEST_BAC_R	0,125 µl	4) GN/GP_R	0,2 µl
5) dNTP's	2,5 µl	5) GP_probe	0,05 µl
6) MgCl ₂	2,5 µl	6) GN_probe	0,05 µl
7) Polimerasa	0,3 µl	7) dNTP's	1,0 µl
8) Taq perpetua		8) MgCl ₂	1,8 µl
9) ADN	10 µl	9) Polimerasa	0,12 µl
		10) Taq perpetua	
		11) ADN	3,0 µl
		(producto de amplificación I)	
95°C – 5 min 95°C – 20 s 46°C – 20 s 72°C – 30 s		95°C – 5 min 95°C – 15 s 65°C – 1 min	
} 30 x		} 40 x	

Ejemplo 3.

5

PCR multiplex en tiempo real - anidada para la detección de hongos de levadura y hongos de moho.

La detección se realizó de manera análoga al método empleado en el ejemplo 1 usando cebadores NEST_FUN_F y NEST_FUN_R en la amplificación I para la detección de hongos, en las condiciones descritas en la tabla 6, seguido por amplificación II en la mezcla descrita en la tabla, llevando a cabo ciclos térmicos tal como se define allí.

10

Tabla 6. La composición de las mezclas de reacción, los reactivos implicados y perfiles térmicos de PCR para la detección de hongos de levadura y hongos de moho

PCR multiplex ANIDADA			
Amplificación I [volumen final 25 µl]		Amplificación II [volumen final 10 µl]	
1) Agua	6,95 µl	1) Agua	2,58 µl
2) Tampón B	2,5 µl	2) Tampón B	1,0 µl
3) NEST_FUN_F	0,125 µl	3) FUN_F	0,2 µl
4) NEST_FUN_R	0,125 µl	4) FUN_R	0,2 µl
5) dNTP's	2,5 µl	5) Asperg_prob	0,05 µl
6) MgCl ₂	2,5 µl	6) Candid_probe	0,05 µl
7) Polimerasa	0,3 µl	7) dNTP's	1,0 µl
8) Taq perpetua		8) MgCl ₂	1,8 µl
9) ADN	10 µl	9) Polimerasa	0,12 µl
		10) Taq perpetua	
		ADN (producto de amplificación I)	3,0 µl
95°C – 5 min 95°C – 20 s 46°C – 20 s 72°C – 30 s		95°C – 5 min 95°C – 15 s 65°C – 1 min	
} 30 x		} 40 x	

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> Uniwersytet Jagielloński

<120> Método para la detección simultánea de bacterias y hongos en una preparación biológica mediante PCR, cebadores así como kit de detección de bacterias y hongos

10 <130> PZ/2491/RW/PCT

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

15

<210> 1

<211> 17

<212> ADN

<213> artificial

20

<220>

<223> cebador NEST_BAC_F
 <400> 1
 ggcggacggg tgagtaa 17
 5
 <210> 2
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> artificial
 10
 <220>
 <223> cebador NEST_BAC_R
 <400> 2
 15 cgcatcacc cgcta 15
 <210> 3
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador NEST_FUN_F
 25 <400> 3
 aattgacgga agggcacc 18
 <210> 4
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador NEST_FUN_R
 35 <400> 4
 ttctcgttg aagagcaa 18
 <210> 5
 40 <211> 16
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 45 <223> cebador GN/GP_F
 <400> 5 16
 gactcctacg ggaggc 16
 50 <210> 6
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> artificial
 55 <220>
 <223> cebador GN/GP_R
 <400> 6 14
 60 gcggtgctg gcac 14
 <210> 7
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> artificial
 65 <220>

<223> sonda Candid_probe
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (1)..(1)
 <223> FAM-
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (28)..(28)
 <223> -BHQ1
 <400> 7
 nttaacctac taaatagtcg tgctagcn 28
 15 <210> 8
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> artificial
 20 <220>
 <223> sonda Asperg_probe
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> TexasRed-
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (27)..(27)
 <223> -Eclipse
 <400> 8
 35 ntcggccctt aaatagcccg gtccgcn 27
 <210> 9
 <211> 22
 <212> ADN
 40 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador FUN_F
 45 <400> 9
 ttggtggagt gattgtctg ct 22
 <210> 10
 <211> 21
 50 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador FUN_R
 55 <400> 10
 tctaaggca tcacagacct g 21
 <210> 11
 60 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 65 <223> sonda GP_Probe

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> HEX-

5

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> TAMRA

10

<400> 11
nctgayssag caacgccg n 21

<210> 12
<211> 22
<212> ADN
<213> artificial

15

<220>
<223> sonda GN_Probe

20

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Cy5 \226

25

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> - BHQ-2

30

<400> 12
nctgaysca gcmatgccgc gn 22

REIVINDICACIONES

1. Método para la detección de bacterias y hongos en una muestra de material biológico en el que el ADN contenido en la muestra de material biológico se somete a amplificación en PCR multiplex en tiempo real, en el que la reacción de amplificación se realiza en dos fases con el uso de cebadores específicos para las bacterias y cebadores específicos para los hongos en la primera fase, y después el producto de la primera amplificación multiplex se usa como molde en la segunda fase - amplificación usando cebadores y sondas que diferencian hongos en un grupo de hongos de moho y hongos de levadura y bacterias en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

2. Método según la reivindicación 1, en el que se usan cebadores específicos para la secuencia de ARNr 16S bacteriano como cebadores específicos para las bacterias.

3. Método según la reivindicación 2, en el que como cebadores específicos para el ARNr 16S bacteriano, se usan oligonucleótidos con las siguientes secuencias:

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'
NEST_BAC_F	GGCGGACGGGTGAGTAA
NEST_BAC_R	CGCATTTACCGCTA

4. Método según la reivindicación 1, en el que como cebadores específicos para los hongos se usan cebadores específicos para la secuencia de ARNr 18S fúngico.

5. Método según las reivindicaciones 3 ó 4, en el que como cebadores específicos para ARNr 18S fúngico, se usan oligonucleótidos con las siguientes secuencias:

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'
NEST_FUN_F	AATTGACGGAAGGGCACC
NEST_FUN_R	TTCCTCGTTGAAGAGCAA

6. Método según las reivindicaciones 1-5, en el que en la segunda fase de amplificación se usan cebadores con las siguientes secuencias para la detección e identificación de bacterias:

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'
GN/GP_F	GACTCCTACGGGAGGC
GN/GP_R	GCGGCTGCTGGCAC

y sondas con secuencias:

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'
GP_Probe	Hex- CTGAyysAGCAACGCCGCG -TAMRA
GN_Probe	Cy5-CCTGAysCAGCmATGCCGCG-BHQ-2

7. Método según la reivindicación 1-5, en el que en la segunda fase de amplificación se usan cebadores con las siguientes secuencias para la detección e identificación de hongos:

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'
FUN_F	TTGGTGGAGTGATTTGTCTGCT
FUN_R	TCTAAGGGCATCACAGACCTG

y sondas con secuencias:

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'
Candid_probe	FAM-TTAACCTACTAAATAGTGCTGCTAGC-BHQ1
Asperg_probe	TexasRed-TCGGCCCTTAAATAGCCCGGTCCGC-Eclipse

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3 ó 5 ó 6 ó 7, en el que la detección de bacterias y hongos se realiza en una muestra de material biológico aislado de un paciente, preferiblemente de la sangre de un paciente con síntomas de sepsis.

9. Kit para la detección de bacterias y/o hongos en una muestra de material biológico usando el método descrito en la reivindicación 1, que contiene los siguientes oligonucleótidos:

para la detección de bacterias, cebadores específicos para el ARNr 16S bacteriano:

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'
NEST_BAC_F	GGCGGACGGGTGAGTAA
NEST_BAC_R	CGCATTTCACCGCTA

y

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'
GN/GP_F	GACTCCTACGGGAGGC
GN/GP_R	GCGGCTGCTGGCAC

5 y sondas específicas para ARNr 16S bacteriano con secuencias:

oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'
GP_Probe	Hex- CTGAyssAGCAACGCCGCG -TAMRA
GN_Probe	Cy5 -CCTGAysCAGCmATGCCGCG- BHQ-2

y/o

10 para la detección de hongos cebadores específicos para ARNr 18S fúngico:

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'
NEST_FUN_F	AATTGACGGAAGGCACC
NEST_FUN_R	TTCCTCGTTGAAGAGCAA

y:

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'
FUN_F	TTGGTGGAGTGATTTGTCTGCT
FUN_R	TCTAAGGGCATCACAGACCTG

15

y sondas específicas para ARNr 18S fúngico con secuencias:

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'
Candid_probe	FAM-TTAACCTACTAAATAGTGCTGCTAGC-BHQ1
Asperg_probe	TexasRed-TCGGCCCTTAAATAGCCCGGTCCGC-Eclipse

Fig. 1

Secuencias de ARNr 18S fúngico con los cebadores diseñados NEST_FUN_F, NEST_FUN_R marcados (recuadro gris) y cebadores FUN_F, FUN_R conocidos de la bibliografía (recuadro transparente)

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

JX869355      AAACCTTAAAGCAATTGACGGGAGGGCCACCCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGAC
JQ612155      AAACCTTAAAGCAATTGACGGGAGGGCCACCCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGAC
HQ876034      AAACCTTAAAGCAATTGACGGGAGGGCCACCCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGAC
JN941105      AAACCTTAAAGCAATTGACGGGAGGGCCACCCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGAC
AY089231      AAACCTTAAAGCAATTGACGGGAGGGCCACCCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGAC
JQ665711      AAACCTTAAAGCAATTGACGGGAGGGCCACCCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGAC
KC120773      AAACCTTAAAGCAATTGACGGGAGGGCCACCCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGAC
JX303664      AAACCTTAAAGCAATTGACGGGAGGGCCACCCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGAC
HQ871896      AAACCTTAAAGCAATTGACGGGAGGGCCACCCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGAC
JQ260823      AAACCTTAAAGCAATTGACGGGAGGGCCACCCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGAC
XXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

JX869355      TCAACACGGGGAAACTCAACCAGGTCAGATGAATAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTT
JQ612155      TCA-CACGGGGAAACTCAACCAGGTCAGACACAATGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTT
HQ876034      TCAACACGGGGAAACTCAACCAGGTCAGACACAATGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTT
JN941105      TCAACACGGGGAAACTCAACCAGGTCAGACACAATGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTT
AY089231      TCAACACGGGGAAACTCAACCAGGTCAGACACAATGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTT
JQ665711      TCAACACGGGGAAACTCAACCAGGTCAGACAAAATGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTT
KC120773      TCAACACGGGGAAACTCAACCAGGTCAGACAAAATGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTT
JX303664      TCAACACGGGGAAACTCAACCAGGTCAGACACAATGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTT
HQ871896      TCAACACGGGGAAACTCAACCAGGTCAGACAAAATGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTT
JQ260823      TCAACACGGGGAAACTCAACCAGGTCAGACACAATGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTT
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX X XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

JX869355      TCTTGATTTTTCAGCTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCT
JQ612155      TCTTGATTTTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCT
HQ876034      TCTTGATTTTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCT
JN941105      TCTTGATTTTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCT
AY089231      TCTTGATTTTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCT
JQ665711      TCTTGATCTTTTGGATGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCT
KC120773      TCTTGATCTTTTGGATGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCT
JX303664      TCTTGATCTTTTGGATGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCT
HQ871896      TCTTGATCTTTTGGATGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCT
JQ260823      TCTTGATCATGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCT
XXXXXXXXX X XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

JX869355      TAATTGCGATAACGAACGAGACCTTAACCTGCTAATAGCCAGGCTAGCATTGGCTGGT-
JQ612155      TAATTGCGATAACGAACGAGACCTTAACCTACTAATAGTTCACTCAGCTTTGGCTGAA-
HQ876034      TAATTGCGATAACGAACGAGACCTTAACCTACTAATAGTGGCTAGCATTGGCTGGTA
JN941105      TAATTGCGATAACGAACGAGACCTTAACCTACTAATAGTGGCTAGCATTGGCTGGTA
AY089231      TAATTGCGATAACGAACGAGACCTTAACCTACTAATAGTGGCTAGCATTGGCTGGT-
JQ665711      TAATTGCGATAACGAACGAGACCTGGGCCC-TTAAATAGCCCGGTCCGCATTTGGGGGC-
KC120773      TAATTGCGATAACGAACGAGACCTGGGCCC-TTAAATAGCCCGGTCCGCATTTGGGGGC-
JX303664      TAATTGCGATAACGAACGAGACCTGGGCCC-TTAAATAGCCCGGTCCGCATTTGGGGGC-
HQ871896      TAATTGCGATAACGAACGAGACCTGGGCCC-TTAAATAGCCCGGTCCGCATTTGGGGGC-
JQ260823      TAATTGCGATAACGAACGAGACCTTAACCTGCTAATAGCCCGGACCCGCTTTGGGGGGC-
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XX XXXXXXXX

JX869355      CCGCTGGCTTCTTAGAGGGACTATCGG--CTCAAGCCGATGGAAGTTTGAGGCCAATAA CAG
JQ612155      TGTTCACCTTCTTAGAGGGACTATCGA-TTTCAGTCCGATGGAAGTTTGAGGCCAATAA CAG
HQ876034      TAGTCACCTTCTTAGAGGGACTATCGA-CTTCAAGTCCGATGGAAGTTTGAGGCCAATAA CAG
JN941105      TGTTCACCTTCTTAGAGGGACTATCGG-TTTCAGCCGATGGAAGTTTGAGGCCAATAA CAG
AY089231      CCGCTGGCTTCTTAGAGGGACTATCGG--CTCAAGCCGATGGAAGTGGCGGCCAATAA CAG
JQ665711      CCGCTGGCTTCTTAGAGGGACTATCG--CTCAA-----
KC120773      CCGCTGGCTTCTTAGAGGGACTATCGG--CTCAAGCCGATGGAAGTGGCGGCCAATAA CAG
JX303664      CCGCTGGCTTCTTAGAGGGACTATCGG--CTCAAGCCGATGGAAGTGGCGGCCAATAA CAG
HQ871896      CCGCTGGCTTCTTAGAGGGACTATCGG--CTCAAGCCGATGGAAGTGGCGGCCAATAA CAG
JQ260823      CCGCTGGCTTCTTAGAGGGACTATCGGATTTCAAGACGATGGAAGTTTGAGGCCAATAA CAG

```



```

NC130920      GTTAAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGCCAGGCGGTTTTCTTAAGTCAGATGTGAAA
JQ613961      GTTAAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCGCGGTAGGTGGTTTTCTTAAGTTCGATGTGAAA
NC153529      GTTATTCGGGAATTAATGGGCGTAAAGCGCGCGCCAGGTGGTTTTCTTAAGTTCGATGTGAAA
NC150142      GTTGTCCGGATTTAATGGGCGTAAAGCGCACGCCAGGCGGTTTTCTTAAGTTCGATGTGAAA
***      **** ** ***** ** ** ** * ** * **

NC150143      GCCCGGAGCTTAACTTGGGAATTGCRATCTGARACTGGTTGGCIAGAGTCTTGTAGAGGGG
NC130920      TCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCRTTTCARACTGGCCAGCTAGAGTCTCGTAGAGGGG
JQ613961      GCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCRTCCAAAACGGCCAGCTAGAGTACGGTAGAGGGT
NC153529      GCCCAGCGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTCGAAACTGGGAGACTTCAGTGCAGAGAGGAA
NC150142      GCCCGGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTCGAAACTGGGAGACTTCAGTGCAGAGAGGAG
***      ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **

NC150143      GGTAGAAATCCATTCGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
NC130920      GGTAGAAATCCATTCGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
JQ613961      GGTAGAAATTCCTTCGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
NC153529      AGTGGAAATCCATTCGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
NC150142      AGTGGAAATCCATTCGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
** ***** * ***** ** * ** * ** * ** * **

```

Fig. 3

Porcentaje de infección de muestras de sangre examinadas mediante PCR multiplex en tiempo real anidada para la presencia de microorganismos en el total y diferentes tipos de: Bacterias G+, Bacterias G-, Candida fungi y Aspergillus fungi

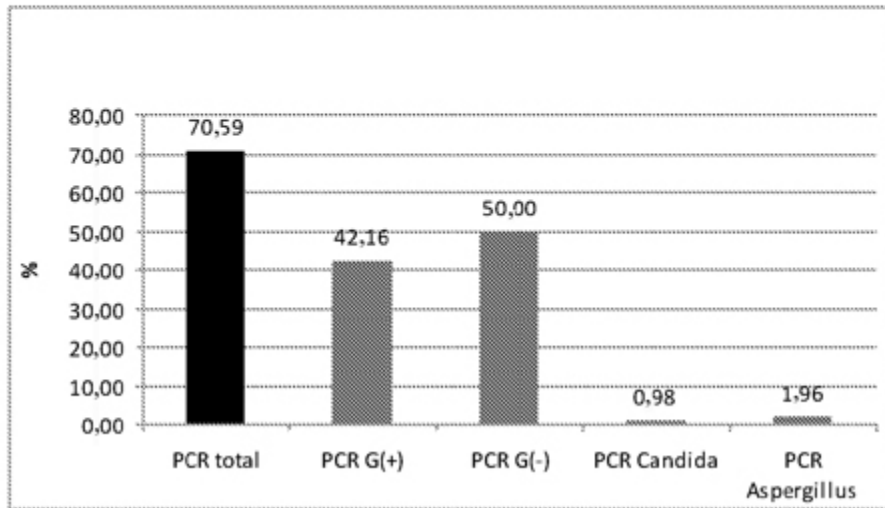


Fig. 4

Comparación de la sensibilidad de detección de bacterias y hongos mediante cultivo y PCR multiplex en tiempo real anidada

