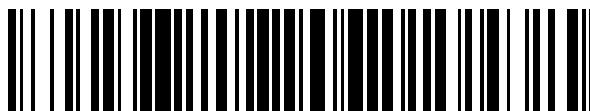


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 859**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2010** **E 10155508 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.02.2017** **EP 2363502**

54 Título: **FISH múltiple mejorada**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
12.07.2017

73 Titular/es:

MIACOM DIAGNOSTICS GMBH (100.0%)
Merowingerplatz 1a
40225 Düsseldorf, DE

72 Inventor/es:

THRIPPLETON, IAN PETER DR. y
FREIHERR VON STEIN, WALTER

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 623 859 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

FISH múltiple mejorada

La presente descripción se refiere al uso multiplexado de bucles en horquilla para la hibridación *in situ* fluorescente y la mejora de la reproducibilidad, especificidad y velocidad del ensayo. Un primer aspecto de la presente invención es una combinación de moléculas de ácido nucleico como se definen en las reivindicaciones 1-8, capaces de hibridar con una secuencia de ácido nucleico diana, en donde la combinación comprende (a) al menos un ácido nucleico que comprende una secuencia capaz de formar un bucle en horquilla (p. ej. una baliza molecular), y (b) una segunda molécula de ácido nucleico, una tercera molécula de ácido nucleico, y opcionalmente al menos una molécula de ácido nucleico adicional que son ácidos nucleicos auxiliares.

La rápida identificación de organismos patógenos en muestras clínicas es cada vez más importante para reducir la mortalidad, la morbilidad y el coste del tratamiento de enfermedades infecciosas. El avance en la aplicación de la tecnología de balizas de ADN en las aplicaciones de hibridación *in situ* (1) permite a la tecnología FISH competir con los sistemas de PCR y la tecnología de micromatrices en términos de velocidad y ventajas en cuanto a rentabilidad. El objetivo de esta invención era encontrar maneras de resolver el problema de reproducibilidad que FISH ha estado experimentado y aumentar aún más la velocidad del tiempo de ensayo.

Con el fin de aumentar la velocidad de un ensayo, debe analizarse la dinámica de los ensayos (2). En ensayos de PCR todos los componentes implicados en la hibridación están en una disolución homogénea y siguen una cinética de segundo orden. Las micromatrices siguen una velocidad de pseudo primer orden, ya que los oligonucleótidos captadores se fijan a la fase sólida y los analitos están en disolución (3). En FISH se intercambian los papeles respectivos (es decir, el analito se fija a la fase sólida y los oligonucleótidos están en disolución), sin embargo, la configuración es similar desde el punto de vista cinético. Las constantes de velocidad medidas cuando las sondas se unieron a una fase sólida fueron hasta tres órdenes de magnitud inferiores que las medidas en la disolución (3). Por lo tanto, no puede esperarse que la cinética de hibridación *in situ* pueda estar en el mismo orden de magnitud que en una disolución homogénea.

Las propiedades cinéticas de los ensayos de hibridación del estado de la técnica pueden resumirse como sigue:

Ensayo	Ensayos de amplificación	Ensayos de micro-matrices	FISH
Sonda	En disolución	Fase sólida con estructuras secundarias	En disolución
Analito	En disolución	En disolución	Embebido profundamente en macromoléculas de proteína/ARN fijadas
Cinética	Velocidad de segundo orden	Velocidad de pseudo primer orden (3)	Más comparable al conjunto de micro matrices. La expectación es = para micromatriz para pseudo primer orden

Los problemas intrínsecos de PCR se encuentran en su sensibilidad y predisposición a los inhibidores. En PCR de muestras clínicas, el ADN/ARN se extrae de matrices muy burdas y extremadamente variables que con frecuencia albergan componentes inhibidores de la polimerasa. Dichos inhibidores pueden generar resultados negativos falsos indeseables. FISH no requiere enzimas para generar una señal y por lo tanto no está bajo estas limitaciones.

La tecnología de micromatrices implica la fijación de secuencias conocidas a un soporte en fase sólida. Cuando se utiliza para la hibridación dirigida hacia el ARN ribosómico, se debe gestionar la cuestión de la accesibilidad de la secuencia diana dentro de una molécula de ARN grande que exhibe estructuras secundarias y terciarias. Fuchs et al. han demostrado con exactitud que las regiones del ARNr 16S y 23S son accesibles en grados variables (4, 5). Esto puede variar desde un sitio fácilmente accesible (puntuación I de Fuchs) hasta un sitio completamente inaccesible (puntuación VI de Fuchs). La inaccesibilidad de las regiones limita los sitios que se pueden elegir para la especificidad de la especie. Al mismo tiempo, las regiones inaccesibles muestran la mayor variabilidad y serían las dianas más deseables para las sondas específicas de la especie. Además, el intentar utilizar una secuencia incluso parcialmente inaccesible introduce una fluctuación en los resultados de hibridación como una variable altamente indeseable en el ensayo.

Como las sondas FISH también tienen que hibridar con la estructura compleja de un ribosoma intacto, también llevan la misma carga. Además, la hibridación de sondas lineales en sitios accesibles puede también provocar el apagado debido a las interacciones del fluoróforo con el complejo proteína/ARN. En tales casos, presentan

fluorescencia cantidades variables de entre solamente 1% y 20% del número total de organismos. La interpretación de los resultados con esta variable requiere un amplio conocimiento y experiencia de lectura. Otras variables experimentales como la preparación de la muestra y la fluctuación de la temperatura hacen que FISH sea propenso a generar resultados negativos falsos. Deben incorporarse controles diligentes para obtener un resultado fiable. Se debe tener cuidado en el diseño de la sonda de modo que las estructuras secundarias no inhiban el acceso de las sondas a una secuencia específica. Este es un desafío, ya que la mayoría de las secuencias específicas de la especie se encuentran en regiones variables con mala accesibilidad (6). Además, si la temperatura durante la hibridación y el lavado no se controlan con precisión, no se producirá hibridación y se puede generar un falso negativo. El entusiasmo inicial en el uso de los ensayos FISH pronto fue reemplazado por la frustración debido al rendimiento errático.

FISH puede general resultados positivos falsos

- (a) por una lectura inadecuada de la auto fluorescencia
- (b) por una lectura inadecuada de material particulado que se origina procedente de la muestra
- (c) cuando se utilizan sondas lineales, el lavado inadecuado es la fuente más frecuente de falsos positivos
- (d) el diseño inadecuado de la sonda puede permitir una reactividad cruzada con organismos estrechamente relacionados (7).

La gran sensibilidad analítica de los ensayos de amplificación hace que sean propensos a la contaminación del ADN/ARN que tiene lugar durante la toma de la muestra o en el laboratorio, lo que a su vez genera resultados positivos falsos. Los falsos positivos pueden reducirse usando sistemas cerrados complejos.

Para que la tecnología FISH sea competente, su procedimiento y las condiciones de hibridación necesitan simplificarse con respecto a la manipulación del ensayo, la cinética y el procedimiento de hibridación. Deben encontrarse soluciones que aseguren la sensibilidad y la especificidad, así como la velocidad de transferencia de energía y la cinética de hibridación, eliminando así los problemas de FISH y mejorando significativamente el rendimiento.

Fuchs et al. demostraron que el uso de oligonucleótidos auxiliares aumenta la señal desde un débil 4-7%, hasta una señal óptima del 75% de usando el tiempo estándar de hibridación de al menos 90 minutos en ARN 16S de células de *E. coli* suspendidas (6). Las células *E. coli* fluorescentes se detectaron por citometría de flujo. Las enseñanzas de Fuchs et al. muestran que los oligonucleótidos auxiliares pueden aumentar la señal cuando se colocan próximos con respecto a la estructura secundaria y terciaria, lo que sugiere que mediante la acción conjunta de múltiples oligonucleótidos auxiliares adyacentes, cada sitio en el ARNr puede abrirse para FISH. Sin embargo, las enseñanzas no muestran conformidad con los resultados generando resultados variables. En algunos casos, cuatro auxiliares adyacentes redujeron la señal con respecto a la señal de dos auxiliares.

Fuchs (6) describió la diferente eficacia de una gama de auxiliares, y encontró que los auxiliares adyacentes a la sonda eran más eficientes en esta región. Sobre la base de estos datos, cabe esperar que la posición óptima para los auxiliares varíe de organismo a organismo de acuerdo con las diferencias respectivas en la secuencia y en la posición de la diana dentro del ARNr.

Un factor limitante de la señal es el número de ribosomas presentes en un organismo. Esto a su vez depende de cómo un organismo reacciona en condiciones de estrés. Es bien conocido en la técnica que en condiciones estresantes, el número de ribosomas se regula a la baja, cambiando la intensidad de la señal de FISH desde una señal 4+ completa hasta una señal muy débil (7).

La solicitud de patente US 5.030.557 describe experimentos de hibridaciones realizadas en disolución empleando ARN ribosómico aislado como diana (8). Se usan oligonucleótidos auxiliares para mejorar la unión de los oligonucleótidos marcados al ARN ribosómico. Sin embargo, esto requirió una incubación durante una noche para conseguir una señal mejorada. Además, la solicitud de patente US 5.030.557 exige una concentración 50-200 veces mayor de cada auxiliar para conseguir la mejora (8). La adición de otro auxiliar aumentó la señal en un 20% y la adición adicional de un tercer auxiliar aumentó la señal un 7% más. Los datos de la solicitud de patente US 5.030.557 se resumen en la Fig. 1.

En resumen, se ha descubierto que la rápida identificación de microorganismos patógenos por hibridación se ve dificultada por las siguientes limitaciones

- los métodos de micromatrices, requieren largos tiempos de incubación.
- los métodos PCR son más rápidos que los métodos de micromatrices. La PCR requiere una polimerasa que puede ser inhibida cuando se expone a una muestra bruta. Por lo tanto, las muestras clínicas deben purificarse antes de la PCR.

- Los métodos *in situ*, tales como FISH, pueden verse dificultados por la accesibilidad de la secuencia diana en la célula a identificar. No existen condiciones uniformes de hibridación. Más bien, los métodos *in situ* requieren la adaptación de las condiciones de hibridación para cada nueva secuencia diana o/y organismo. Las condiciones experimentales de los métodos *in situ* deben controlarse con mucho cuidado para evitar resultados positivos falsos o negativos falsos. Además, los métodos *in situ* requieren largos tiempos de incubación.

En la presente invención, se encontró sorprendentemente, que se puede conseguir una señal completa del 100% en un ensayo FISH en células fijadas a una superficie mediante una combinación que comprende una baliza molecular y al menos dos oligonucleótidos auxiliares en 8 minutos, independientemente de su posición dentro del ARNr y el organismo elegido. Resultó aún más sorprendente que el uso de los auxiliares junto con la baliza tal como se establece en esta invención produce una tinción homogénea reproducible de todos los organismos con una intensidad de señal completa.

Resultó sorprendente que este diseño estricto de conjuntos baliza-matrices de auxiliares y las condiciones del ensayo eliminan los problemas que se habían encontrado en los procedimientos de FISH.

El objetivo de esta invención es encontrar reglas universales para la combinación de secuencias auxiliares en asociación con balizas moleculares para la hibridación *in situ* y la superación de las restricciones termodinámicas y de transferencia de calor que hasta ahora habían limitado la cinética de hibridación en FISH.

Un primer aspecto de la presente invención es una combinación de moléculas de ácido nucleico capaces de hibridar con una secuencia de ácido nucleico diana, en donde la combinación comprende

(a) al menos una primera molécula de ácido nucleico que comprende

- (i) una secuencia capaz de hibridar con la secuencia diana,
- (ii) dos secuencias complementarias capaces de formar un tallo, y
- (iii) un grupo luminiscente y un grupo desactivador de la fluorescencia, en donde el grupo desactivador de la fluorescencia apaga el grupo fluorescente si el ácido nucleico forma una estructura de bucle en horquilla, y en donde el grupo fluorescente es capaz de emitir una señal de luminiscencia después de la excitación si el oligonucleótido hibrida con la secuencia diana,

(b) una segunda molécula de ácido nucleico, una tercera molécula de ácido nucleico y la opcionalmente al menos molécula de ácido nucleico,

en donde la segunda molécula de ácido nucleico, la tercera molécula de ácido nucleico y la al menos otra molécula de ácido nucleico opcional hibridan con la secuencia diana en una secuencia situada 5' y/o 3' de la secuencia con la cual hibrida el al menos primer ácido nucleico, caracterizada por que en condiciones de hibridación idénticas y en base a las secuencias dianas complementarias, todas las moléculas de ácido nucleico con respecto a la unión a las secuencias afines respectivas de la secuencia diana se diseñan de manera que hibridan independientemente con un ΔG en un intervalo de -15 a -25 kcal/mol y los valores de ΔG no varían más de 3 kcal/mol.

El al menos un primer ácido nucleico de la presente invención capaz de formar un híbrido con una secuencia del ácido nucleico diana y capaz de formar una estructura de bucle en horquilla, si no se forma un híbrido, con la secuencia diana también se denomina en esta memoria "baliza", "baliza molecular", "bucle" o "bucle en horquilla", en donde se incluye la forma "abierta" (no se forma tallo) así como la forma "cerrada" (se forma un tallo). La forma abierta incluye una baliza que no forma un híbrido con la secuencia diana y una baliza que forma un híbrido con la secuencia diana.

En particular, la primera molécula de ácido nucleico comprende una secuencia capaz de formar un bucle en horquilla, como por ejemplo, una baliza molecular.

La secuencia (i) de la primera molécula de ácido nucleico también se denomina en esta memoria "secuencia de la sonda" o "secuencia de la sonda de la baliza molecular".

Si está presente más de un primer ácido nucleico, las secuencias con las que los dos o más primeros ácidos nucleicos hibridan pueden estar situadas, independientemente, adyacentes directamente entre sí, o pueden estar independientemente separadas por un espacio de al menos un nucleótido, tal como uno, dos, tres, cuatro, cinco o incluso más nucleótidos. Las secuencias con las que los dos o más primeros ácidos nucleicos hibridan también pueden estar separadas por un espacio suficientemente grande para que uno o más auxiliares puedan hibridar con la secuencia dentro del espacio.

Si están presentes más de un primer ácido nucleico, éstos pueden dirigirse contra el mismo gen. En otras palabras, si están presentes más de un primer ácido nucleico, las secuencias diana de el más de un primer ácido nucleico

pueden seleccionarse a partir de secuencias obtenidas a partir del mismo gen. Preferiblemente, estas secuencias no se solapan. Esto permite la detección de genes individuales sin amplificación.

Si está presente más de un primer ácido nucleico, pueden dirigirse contra el ARNm del producto de expresión del mismo gen. En otras palabras, si está presente más de un primer ácido nucleico, las secuencias diana de más de un primer ácido nucleico pueden seleccionarse a partir de secuencias obtenidas a partir del ARNm expresado por el mismo gen. Preferiblemente, estas secuencias no se solapan. Esto permite la detección de genes individuales sin amplificación.

En la presente invención, "localizados directamente adyacentes entre sí" significa que no queda espacio si las moléculas de ácido nucleico hibridan en posiciones adyacentes sobre la secuencia diana.

El segundo ácido nucleico, el tercer ácido nucleico y el al menos otro ácido nucleico adicional se denominan en esta memoria "auxiliares" o "ácidos nucleicos auxiliares" o "oligonucleótidos auxiliares".

Las secuencias afines de los auxiliares diseñados en esta invención pueden colocarse en próximos al extremo 5' o/y 3' de la secuencia afín de la baliza. Se puede utilizar una multiplicidad de auxiliares, sin embargo, se puede lograr una intensidad completa de la señal con dos, tres o cuatro auxiliares. La combinación de la presente invención comprende preferiblemente dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o diez ácidos nucleicos auxiliares. Preferiblemente, la combinación de la presente invención comprende dos, tres, cuatro ácidos nucleicos auxiliares.

Los ácidos nucleicos de una combinación de la presente invención pueden hibridar con la secuencia diana en lugares directamente adyacentes entre sí, o pueden estar separados independientemente por un espacio de al menos un nucleótido, tal como uno, dos, tres, cuatro, cinco o incluso más nucleótidos. Por ejemplo, al menos dos moléculas de ácido nucleico pueden hibridar con la secuencia diana en lugares separados entre sí por un espacio de al menos un nucleótido, tal como uno, dos, tres, cuatro, cinco o incluso más nucleótidos.

Más preferiblemente, la combinación de la presente invención comprende cuatro ácidos nucleicos auxiliares. En la configuración más preferida, las secuencias afines de cuatro auxiliares están situadas directamente adyacentes, sin un espacio próximo a la secuencia afín de la baliza y directamente adyacentes entre sí, dos en el extremo 5' y dos en el extremo 3' de la secuencia afín de la baliza. Se aporta un ejemplo en la figura 3. En este diseño se puede ignorar la posición de las secuencias diana y la accesibilidad según Fuchs.

La secuencia diana puede seleccionarse de manera que las secuencias con las que hibrida al menos una primera, segunda, tercera y opcionalmente al menos otra molécula de ácido nucleico sean secuencias no solapantes con la secuencia diana.

Se describe un ejemplo de configuración en la figura 3. Los auxiliares denominados "1" y "2" se extienden desde el extremo 5' y los auxiliares denominados "3" y "4" se extienden desde el extremo 3' de la secuencia de la sonda de la baliza forzando la separación de la parte de tallo de la baliza lejos del ribosoma y funcionan como un espaciador. Los auxiliares 2 y 4 se colocan al lado de los auxiliares 1 y 3 en los respectivos extremos 5' y 3' igualmente sin un espacio. Con el fin de lograr una máxima sinergia en la hibridación, todas las secuencias de la sonda y de los auxiliares pueden tener las mismas propiedades termodinámicas con respecto a la unión a las secuencias afines. Esta selección estricta de oligonucleótidos permite la orquestación de la acción de hibridación en masa que cubre la longitud de 100 bases (por ejemplo, entre 89 y 120) del ARN ribosómico para una apertura reproducible del ARN ribosómico con una cinética rápida y una alta especificidad de los oligonucleótidos pequeños de 20-mer (16-26-mer) - todos operando en las mismas condiciones estrictas indicadas.

La secuencia de la secuencia diana con la que hibrida un ácido nucleico de la presente invención se denomina en esta memoria "secuencias afines" del ácido nucleico correspondiente. Por ejemplo, la secuencia afín de un primer ácido nucleico (es decir, una baliza molecular) es la secuencia de la secuencia diana con la que hibrida la secuencia (i), como se indica en esta memoria. Un híbrido de moléculas de ácido nucleico de la combinación de la presente invención con la secuencia diana, se denomina también en esta memoria "híbrido con la secuencia afín" o "híbrido afín".

La secuencia del ácido nucleico diana empleada en las diversas realizaciones de la presente invención puede ser una secuencia de ácido nucleico de una célula. La célula puede ser una célula eucariota o una célula procariota. La célula puede ser cualquier célula que pueda estar presente en una muestra biológica o clínica. En particular, la secuencia del ácido nucleico diana puede ser una secuencia de ácido nucleico de un microorganismo, tal como un microorganismo seleccionado de bacterias, levaduras y hongos, en particular de bacterias Gram positivas y/o Gram negativas. Dependiendo del estado de la enfermedad, determinados patógenos son los agentes causales más frecuentes y pueden ser compilados en grupos de diagnóstico. La adición u omisión de ciertos patógenos puede ser necesaria dependiendo de la epidemiología de la región, para alcanzar el percentil 95. El listado de la Tabla 1 cubre los requerimientos para Europa y la mayor parte de Norteamérica. El microorganismo se selecciona preferiblemente entre los organismos incluidos en la Tabla 1 y la Tabla 4.

La célula empleada en la presente invención puede mantenerse en suspensión o/y en un cultivo en suspensión.

La secuencia del ácido nucleico diana puede ser una secuencia de ADN o/y una secuencia de ARN, en particular una secuencia de ARNr, tal como una ARNr 16S bacteriano o/y una secuencia 23S de ARNr bacteriano. La secuencia de ácido nucleico diana también puede ser una secuencia de ARNm.

- 5 En particular, las dos secuencias complementarias (ii) de la primera molécula de ácido nucleico están flanqueando la secuencia (i), es decir, la primera secuencia de (ii) está situada en el extremo 3' de la secuencia (i) y la segunda secuencia de (ii) se encuentra en el extremo 5' de la secuencia (i).

Las dos secuencias complementarias de (ii) pueden tener independientemente una longitud de 4 a 10 nucleótidos, en particular 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o incluso más nucleótidos. Preferiblemente, las dos secuencias de (ii) tienen la misma longitud.

- 10 En la primera molécula de ácido nucleico, el grupo luminiscente puede estar unido a una de las dos secuencias complementarias capaces de formar un tallo, mientras que el desactivador de la fluorescencia puede estar unido a la otra de las dos secuencias complementarias, de manera que el desactivador de la fluorescencia apaga esencialmente la luminiscencia cuando se forma un tallo, y el luminiscente puede emitir una señal de luminiscencia cuando la horquilla está abierta.

- 15 Preferiblemente, el grupo luminiscente está unido independientemente al extremo 5' de la al menos una primera molécula de ácido nucleico, o en una posición que está a una distancia de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 nucleótidos del extremo 5'. En este caso, el desactivador de la fluorescencia está fijado independientemente al otro extremo no cubierto por el grupo luminiscente, es decir, al extremo 3', o en una posición que está a una distancia de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 nucleótidos del extremo 3'.

- 20 También se prefiere que el grupo luminiscente se fije independientemente en el extremo 3' de la al menos una primera molécula de ácido nucleico, o en una posición que está a una distancia de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 nucleótidos del extremo 3'. En este caso, el desactivador de la fluorescencia está unido independientemente al otro extremo no cubierto por el grupo luminiscente, es decir, al extremo 5', o en una posición que está a una distancia de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 nucleótidos del extremo 5'.

- 25 El grupo luminiscente puede acoplarse independientemente a la al menos una primera molécula de ácido nucleico mediante un conector. El grupo desactivador de la fluorescencia puede estar acoplado de forma independiente a la al menos una primera molécula de ácido nucleico mediante un conector. Los conectores adecuados son conocidos por el experto en la técnica. El conector puede comprender independientemente al menos un nucleótido.

- 30 Los grupos luminiscentes adecuados y los desactivadores de la fluorescencia son conocidos por el experto en la técnica. El grupo luminiscente es preferiblemente un grupo fluorescente. Los grupos fluorescentes adecuados pueden seleccionarse independientemente de aquellos fácilmente disponibles comercialmente que absorben desde UV visible, hasta el espectro de luz IR y que emiten con un desplazamiento de Stokes que permite la separación física de luz debida a la excitación y emisión. En el grupo fluorescente, la autofluorescencia puede reducirse por medio del desplazamiento de Stokes mejorado. Los grupos fluorescentes adecuados pueden seleccionarse independientemente de FAM, Cy3, FITC y derivados de los mismos.

La luminiscencia, en particular la fluorescencia, se puede determinar mediante microscopía, citometría de flujo o cualquier otro método adecuado conocido en la técnica. En células mantenidas en suspensión o cultivo en suspensión, la luminiscencia, en particular la fluorescencia, se puede determinar por citometría de flujo.

- 40 La hibridación de la baliza de la presente invención con una secuencia diana puede tener lugar en condiciones en las que el bucle se desplegará en presencia de una secuencia afín. Una baliza con un tallo cerrado proporcionará una especificidad más alta y compensará la disminución debida al aumento de la longitud de la secuencia.

- 45 Este objetivo se consigue eligiendo una secuencia de tallo con una ΔG negativa incluso en condiciones de hibridación, pero sustancialmente más alta (menos negativa) que la secuencia del bucle (híbrido ADN/ARN afín), y preferiblemente en ausencia de Mg^{2+} . De este modo, la hibridación con la secuencia diana puede tener lugar, cuando el tallo se desestabiliza por las condiciones esencialmente libres de Mg^{2+} .

Una " ΔG sustancialmente mayor" significa una diferencia de las respectivas ΔG aproximadamente de entre -15 y aproximadamente -25 kcal/mol, preferiblemente aproximadamente entre -17 y aproximadamente -23 kcal/mol e incluso más preferiblemente aproximadamente entre -19 y aproximadamente 21 kcal/mol.

- 50 Con el fin de lograr el apagado del grupo luminiscente, que forma parte de la baliza, en aquellas moléculas de la baliza que no hibridan con la secuencia diana, debe inducirse la formación del tallo después de la reacción de hibridación. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante una baliza que tenga un $\Delta G < 0$, de manera que la horquilla se forme espontáneamente. Además, la formación del tallo puede introducirse mediante lavado con un tampón que contiene Mg^{2+} como se describe en el presente documento.

- 55 En particular, los bucles en horquilla están contruidos de tal manera que en condiciones de hibridación estandar (por ejemplo, en condiciones esencialmente libres de Mg^{2+}) el tallo está abierto de forma que las posibles

limitaciones estéricas no impiden el proceso de hibridación. Por ejemplo, pueden haber limitaciones estéricas cuando la secuencia diana es una secuencia de ARNr. Si el efector es un fluoróforo, el fluoróforo no se apagará por la estrecha proximidad de las proteínas ribosómicas.

Las condiciones adecuadas para la inducción de la formación del tallo después de la hibridación incluyen un tampón que contiene Mg^{2+} , que contiene, por ejemplo, aproximadamente de 0,1 hasta aproximadamente 20 mM de Mg^{2+} , aproximadamente de 1 hasta aproximadamente 20 mM de Mg^{2+} , de 5 hasta aproximadamente 15 mM de Mg^{2+} , aproximadamente de 8 hasta aproximadamente 12 mM de Mg^{2+} , aproximadamente de 1 mM hasta aproximadamente 10 mM de Mg^{2+} , aproximadamente de 2,5 mM hasta aproximadamente 7,5 mM de Mg^{2+} . Se prefiere una concentración aproximadamente de 5 mM de Mg^{2+} o aproximadamente de 10 mM de Mg^{2+} . El tampón puede tener un pH > 8, preferiblemente aproximadamente 8,3. El pH también se puede ajustar aproximadamente de 7,5 hasta aproximadamente 9 o aproximadamente de 8 hasta aproximadamente 8,5.

Además, los bucles en horquilla funcionan en su totalidad y no se pueden diseccionar. El tallo y el bucle como colindantes más cercanos y el efecto de apilado, tienen una profunda influencia en las propiedades termodinámicas. Los ácidos nucleicos preferidos de la presente invención se describen en la Tabla 1, Tabla 3 y Tabla 4. Demuestran claramente que la secuencia de tallo preferida es independiente del contenido de ΔG , T_m , GC o de la longitud de la secuencia elegida para identificar una especie.

En la presente invención se establecen las especificaciones termodinámicas para la construcción individual de los ácidos nucleicos empleados en la combinación de la presente invención apropiadas para condiciones estándar: La energía de Gibbs (ΔG) para la formación del ácido nucleico puede diseñarse de tal manera que

- El tallo de la horquilla se forme espontáneamente ($\Delta G < 0$) en ausencia de una secuencia diana afín en condiciones de hibridación.
- La ΔG del híbrido afín es significativamente más baja (es decir, más negativa) que la ΔG del tallo de la horquilla.
- La ΔG respectiva de la secuencia afín es menor que una secuencia no coincidente o no afín.
- La T_m para la formación del bucle en horquilla debe ser diseñada de tal manera que la T_m del bucle en horquilla sea inferior o sea esencialmente la T_m del híbrido.

En particular, los ácidos nucleicos de la combinación de la presente invención hibridan independientemente con la secuencia diana con una ΔG más negativa que la ΔG generada por el replegado natural de la secuencia diana, que preferiblemente es un ARNm diana o secuencia de ADN diana.

La ΔG del híbrido afín (es decir, el híbrido de un auxiliar y/o de una baliza molecular de la presente invención con su secuencia diana) está en un intervalo aproximadamente de -15 y aproximadamente -25 kcal/mol, preferiblemente aproximadamente entre -17 y aproximadamente -23 kcal/mol e incluso más preferiblemente entre aproximadamente -19 y aproximadamente 21 kcal/mol en condiciones de hibridación. La ΔG del híbrido afín se puede ajustar independientemente para las moléculas de ácido nucleico de una combinación como se describe en el presente documento.

La ΔG de al menos dos híbridos afines en condiciones de hibridación no varía más de 3 kcal/mol, más preferiblemente no más de 2 kcal/mol y lo más preferiblemente no más de 1 kcal/mol. En particular, la ΔG de los híbridos afines en condiciones de hibridación no varía más de 3 kcal/mol, más preferiblemente no más de 2 kcal/mol y más preferiblemente no más de 1 kcal/mol.

Las moléculas de ácido nucleico de la combinación pueden hibridar independientemente con una secuencia diana, preferiblemente con una secuencia de ARNr diana, con una ΔG combinada en un intervalo de -60 a -150 kcal/mol, -80 a -150 kcal/mol o -100 a -120 kcal/mol. Sorprendentemente, se encontró que, usando la configuración estricta y de 5 ácidos nucleicos sin espacios (incluyendo una baliza molecular), el aumento de la intensidad de la señal hasta una señal universalmente fuerte se consiguió no sólo para una región en E. coli, sino que se podría conseguir un fuerte aumento de señal para numerosas regiones de ARNr 16S y 23S en una amplia gama de organismos con la misma cinética. Se prefiere combinar oligonucleótidos marcados y no marcados que tienen todas las mismas características dinámicas de tal manera que hibridan en condiciones idénticas en todos los organismos con una ΔG combinada y estándar de -60 hasta -150 kcal/mol sin pérdida de capacidad de discriminación de una sola base.

Se podría determinar por lo tanto, que los criterios para la selección de un ensamblaje de sonda vienen dados primero por la especificidad de secuencia, y en segundo lugar por la energía libre (ΔG) generada tras la hibridación, sin tener en cuenta la T_m como parámetro termodinámico utilizado hasta ahora en la técnica. Como todos los auxiliares y balizas pueden estar diseñados para tener características muy similares, no sólo es posible tener auxiliares emparejados junto con una baliza, sino también generar múltiples ejemplos de dichos agrupamientos, funcionando todos en condiciones idénticas y uniéndose tanto a ARNs 16S como a 23S con cinéticas muy similares.

Efectivamente, la energía de hibridación libre de un 100mer generado puede usarse mientras se mantiene la especificidad discriminatoria, por ejemplo, de oligonucleótidos cortos 18-26-mer, favoreciendo así la unión híbrida con una señal fuerte sobre la reconstrucción de la estructura ribosómica nativa. La Tabla 4 recoge las balizas diseñadas junto con sus respectivos auxiliares junto con las propiedades termodinámicas y la puntuación de Fuchs et al. (6).

Ocasionalmente las secuencias afines pueden formar bucles en horquilla espontáneos, donde sólo se necesita añadir un brazo para lograr la formación de baliza. Si la secuencia diana es una secuencia de ARNr, este, sin embargo, hace que el efector, por ejemplo el fluoróforo, este muy próximo a las proteínas potencialmente apagadoras del ribosoma. En una configuración preferida, el tallo se extiende. Con el fin de ajustarse a dichas especificaciones termodinámicas como se describe en esta memoria, incluso con un tallo extendido, se diseñó un método para mantener tanto la T_m como la ΔG dentro de las especificaciones. De acuerdo con la presente invención, esto puede conseguirse mediante la introducción de al menos un nucleótido no emparejado o un análogo de nucleótido. En la presente invención, la introducción de al menos un nucleótido no emparejado puede potenciarse mediante la introducción de un nucleótido adicional o un análogo de nucleótido, de manera que las dos secuencias complementarias tengan una longitud diferente, y el tallo se "doble" (véase por ejemplo la posición 36 en la SEQ ID NO: 1), o/y puede lograrse mediante sustitución de un nucleótido emparejado o un análogo de nucleótido por un nucleótido no emparejado o un análogo de nucleótido (véase por ejemplo la posición 5 en la SEQ ID NO: 7).

Por lo tanto, en la presente invención, las "secuencias complementarias capaces de formar un tallo" también pueden incluir al menos un nucleótido no emparejado, preferiblemente 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos no emparejados.

Como puede verse en la Tabla 2, ninguna de las secuencias descritas en esta memoria se podría concebir como una baliza de PNA debido a las citadas limitaciones en la construcción de los oligonucleótidos de PNA. La principal limitación está en la longitud del oligonucleótido requerida para tener suficiente especificidad y una longitud del tallo suficiente para asegurar el repliegue del bucle cuando no híbrida. Por lo tanto, es necesario diseñar balizas de ADN que sean capaces de hibridar con afinidad y velocidad suficientes para permitir la identificación *in situ* de los microorganismos.

Preferiblemente la baliza de la presente invención no es una baliza de PNA. El esqueleto de la baliza es preferiblemente un esqueleto de ácido nucleico, en particular ADN. La baliza puede comprender un análogo de ácido nucleico tal como un análogo de un desoxirribonucleótido o un análogo de un ribonucleótido, en la parte de ácido nucleico o/y en el conector si un conector está presente. Este análogo es preferiblemente un análogo de un nucleótido modificado en el azúcar, en la base y/o en los grupos fosfato. El análogo de un nucleótido preferiblemente no es un bloque de construcción de PNA.

Siguiendo el citado percentil 95 en muestras clínicas, los patógenos pueden agruparse en grupos relacionados con la enfermedad. Las sondas para estos organismos deben funcionar simultáneamente en las condiciones mencionadas, especialmente si todas las sondas tienen que ser utilizadas en un chip. La aplicación de un chip requiere una estandarización estricta tanto de las características de los afines, como del tallo. Si se emplea una combinación de más de una sonda, es decir, de al menos dos sondas, todas las sondas tienen que estar diseñadas para funcionar simultáneamente en el mismo portaobjetos/chip.

La baliza molecular de la combinación de la presente invención se puede seleccionar entre las balizas de la Tabla 1, Tabla 3 y Tabla 4. La combinación de la presente invención puede comprender una, dos, tres o incluso más balizas como las descritas en este documento, que pueden seleccionarse de las balizas de la Tabla 1, Tabla 3 y Tabla 4. Si hay más de una baliza presente en la combinación de la presente invención, las balizas pueden tener las mismas o diferentes secuencias afines. Se prefiere que las secuencias afines de las balizas individuales sean diferentes.

Si está presente más de una baliza en la combinación de la presente invención, la diferencia de ΔG de las balizas individuales del híbrido de las secuencias de (ii) o/y del híbrido de la secuencia de (i) con una secuencia diana puede ser como máximo aproximadamente de 3 kcal/mol, más preferiblemente como máximo aproximadamente de 2 kcal/mol, y lo más preferiblemente como máximo aproximadamente de 1 kcal/mol con respecto a la secuencia afín.

El segundo ácido nucleico, el tercer ácido nucleico y el al menos otro ácido nucleico pueden contener independientemente una etiqueta que puede distinguirse del grupo luminiscente de el al menos un primer ácido nucleico. El segundo ácido nucleico, el tercer ácido nucleico y el al menos otro ácido nucleico preferiblemente no contienen un grupo luminiscente. El segundo ácido nucleico, el tercer ácido nucleico y el al menos otro ácido nucleico preferiblemente no contienen un desactivador de la fluorescencia.

El diseño de las moléculas de ácido nucleico auxiliares puede realizarse de acuerdo con el diseño termodinámico estricto descrito en la solicitud de la patente EP 07818883.6 (1). La secuencia afín de la baliza etiquetada y los auxiliares pueden tener todas las mismas características termodinámicas y por lo tanto pueden funcionar sinérgicamente. La sinergia de la acción debida a la precisión del diseño genera la diferencia en la cinética de hibridación.

La secuencia de un ácido nucleico auxiliar capaz de hibridar con la secuencia diana puede diseñarse sobre la base de su secuencia diana complementaria (secuencia afín), en donde la secuencia del auxiliar preferiblemente no tiene ninguna discrepancia con referencia a la secuencia diana. Una vez diseñada una baliza molecular, la persona experta puede seleccionar secuencias afines para los ácidos nucleicos auxiliares de las secuencias adyacentes a la secuencia afín de la baliza molecular. Las secuencias adecuadas pueden obtenerse de bases de datos públicas. Como se describe en esta memoria, las balizas moleculares preferidas se pueden seleccionar de la Tabla 1, Tabla 3 y Tabla 4. En este caso, las secuencias afines de los ácidos nucleicos auxiliares pueden seleccionarse de las secuencias de la base de datos del organismo correspondiente, adyacentes a la secuencia afín de las balizas descritas en la Tabla 1, Tabla 3 y Tabla 4. Las secuencias afines de los ácidos nucleicos auxiliares pueden seleccionarse también de las secuencias descritas en la Tabla 1, Tabla 3 y Tabla 4.

Las secuencias indicadas en la Tabla 1, Tabla 3 y Tabla 4 como "secuencias auxiliares" o "auxiliares" también pueden emplearse para el diseño de una baliza molecular. En este caso, deben añadirse las secuencias complementarias (ii) N-terminal y C-terminal capaces de formar un tallo o/y otros componentes descritos en la presente memoria. También se pueden emplear las secuencias indicadas en la Tabla 1, Tabla 3 y Tabla 4 como "secuencias de la baliza" para el diseño de un ácido nucleico auxiliar. En este caso, las secuencias del tallo deben ser eliminadas. Por ejemplo, en la Tabla 4 se describen combinaciones de cinco ácidos nucleicos donde la secuencia de un ácido nucleico específico se denomina "secuencia de baliza". Se contempla que cualquier combinación de la Tabla 4 está dentro del alcance de la presente descripción, en donde una o más secuencias de una combinación de la Tabla 4 se seleccionan para el diseño de una baliza molecular y las secuencias restantes se emplean como secuencias auxiliares. Si procede, se eliminan o se añaden secuencias de tallo y/u otros componentes descritos en la presente memoria.

Son preferibles las combinaciones de bucles en horquilla y de ácidos nucleicos auxiliares descritas en la Tabla 4. La Tabla 4 describe combinaciones individuales de bucles en horquilla y ácidos nucleicos auxiliares, en donde las secuencias afines al bucle en horquilla y las secuencias auxiliares están localizadas en la secuencia diana de un microorganismo. Los ejemplos específicos de la presente invención se refieren a las combinaciones descritas en la Tabla 4 que comprenden un bucle en horquilla y uno, dos, tres o cuatro ácidos nucleicos auxiliares. Las combinaciones descritas en la Tabla 4 se pueden designar con el nombre del bucle en horquilla. Una combinación preferida puede seleccionarse entre las combinaciones representadas por B-Achxyl, B-Acinbaum-IV, B-Acibact-2, B-Bacter-II, B-BacPrev, B-Bcc, B-Ctherm, Citfreu-WIII, B-Clodiff, B-Cloper-II, B-Clospp, Corspp, SB-Corspp, EcoShi, B-EHEC-II, B-Entbac-II, SB-EntSak-I, SB-EntSak-II, Eubiae, Entcoc III, B-Entcoc II, B-Entalis-2, B-Entium-II, B-E. coli III, B-Haeinf, SB-InqLum, Klepne-5, B-Kleboxy-II, SB-Klepne-6, B-Klepne-4, B-Limo-II, SB-Mycabi-A, SB-Mycabi-B, B-Neigon, B-Niemeng, SB-Panapi, SB-PansppA, SB-PansppB, B-propacn, B-propacn, B-Protmir, B-Protvul, SB-Psaer E, B-Psaer D, SB-RalsppA, SB-RalsppB, SB-RalsppC, Stalug, B-Sal 1686, B-Sermarc-II, B-Shig-II, B-Shig-III, Sb-Shispp-4, B-Staphspp-2, B-Staur-3, Stalug, B-Stemal-2, B-Straga-3, B-Strepne-2, B-Strepne-3, B-Strpyo-D, B-Strept-III, B-Yers-III y B-Yers-II. Es más preferible seleccionar un grupo de combinaciones de las combinaciones representadas por B-Achxyl, B-Acinbaum-IV, B-Acibact-2, B-Bacter-II, B-BacPrev, B-Bcc, B-Ctherm, Citfreu-WIII, B-Clodiff, B-Cloper-II, B-Clospp, Corspp, SB-Corspp, EcoShi, B-EHEC-II, B-Entbac-II, SB-EntSak-I, SB-EntSak-II, Eubiae, Entcoc III, B-Entcoc-II, B-Entalis-2, B-Entium-II, B-E. coli III, B-Haeinf, SB-InqLum, Klepne-5, B-Kleboxy-II, SB-Klepne-6, B-Klepne-4, B-Limo-II, SB-Mycabi-A, SB-Mycabi-B, B-Neigon, B-Niemeng, SB-Panapi, SB-PansppA, SB-PansppB, B-propacn, B-propacn, B-Protmir, B-Protvul, SB-Psaer E, B-Psaer D, SB-RalsppA, SB-RalsppB, SB-RalsppC, Stalug, B-Sal 1686, B-Sermarc-II, B-Shig-II, B-Shig-III, Sb-Shispp-4, B-Staphspp-2, B-Staur-3, Stalug, B-Stemal-2, B-Straga-3, B-Strepne-2, B-Strepne-3, B-Strpyo-D, B-Strept-III, B-Yers-III y B-Yers-II. El grupo puede comprender al menos 2, al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60 o incluso todas las combinaciones descritas en la Tabla 4. El grupo puede comprender como máximo 60, como máximo 50, como máximo 40, como máximo 30, como máximo 20, como máximo 10, o como máximo 5 de las combinaciones descritas en la Tabla 4. Se contempla que las realizaciones específicas de la presente invención se refieren a grupos que tienen el número mínimo o/y el número máximo de combinaciones que se indican en esta memoria, en donde cualquier combinación puede seleccionarse de la Tabla 4. Por ejemplo, se describen grupos que comprenden dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez combinaciones seleccionadas de la Tabla 4.

Los grupos de combinaciones preferidos se refieren a grupos de diagnóstico. Los grupos de combinaciones preferidos se seleccionan de las combinaciones adecuadas para identificar organismos en un cultivo de sangre (BC) de organismos Gram negativos, como se indica por ejemplo en la Tabla 4. Otros grupos preferidos de combinaciones se seleccionan de las combinaciones adecuadas para identificar organismos en un cultivo de sangre de organismos Gram positivos, como se indica por ejemplo en la Tabla 4. Otros grupos preferidos de combinaciones se seleccionan entre combinaciones adecuadas para identificar organismos capaces de causar neumonía, como se indica por ejemplo en la Tabla 4. Otros grupos preferidos de combinaciones se seleccionan de combinaciones adecuadas para identificar organismos asociados con fibrosis quística, como se indica por ejemplo en la Tabla 4. Otros grupos preferidos de combinaciones se seleccionan de combinaciones adecuadas para identificar organismos que se encuentran en las heces, como se indica por ejemplo en la Tabla 4.

Se contempla que una combinación seleccionada de la Tabla 4 puede ser una combinación en la que se seleccionan una o más secuencias de la combinación, para el diseño de un bucle en horquilla, y las secuencias restantes se

emplean como secuencias auxiliares, como se describe en la presente memoria. En otras palabras, no sólo se puede emplear la secuencia indicada en la Tabla 4 como secuencia de una sonda (complementaria a la secuencia diana), sino también una secuencia indicada en la Tabla 4 como secuencia auxiliar, se puede emplear para el diseño de un bucle en horquilla.

- 5 Preferiblemente, el ácido nucleico auxiliar de la presente invención no es un PNA. El esqueleto del auxiliar es preferiblemente un esqueleto de un ácido nucleico, en particular de ADN. El ácido nucleico auxiliar puede comprender un análogo de ácido nucleico tal como un análogo de desoxirribonucleótido o un análogo de ribonucleótido en la parte del ácido nucleico o/y en el conector si hay un conector presente. Este análogo es
10 análogo de nucleótido preferiblemente no es un bloque de construcción de PNA.

- El segundo ácido nucleico, el tercer ácido nucleico y el al menos otro ácido nucleico preferiblemente no contienen un desemparejamiento en la secuencia capaz de hibridar con la secuencia diana. El segundo ácido nucleico, el tercer ácido nucleico y el al menos otro ácido nucleico adicional pueden comprender independientemente al menos un nucleótido que no hibrida con la secuencia diana, preferiblemente situado independientemente en el extremo 3' o/y
15 en el extremo 5' de la molécula de ácido nucleico.

Los ácidos nucleicos de la combinación según la presente invención son particularmente adecuados para la hibridación *in situ*, en particular para FISH. La hibridación puede tener lugar dentro de la célula como se describe en la presente memoria, en particular dentro de un microorganismo como se describe en la presente memoria. Los ácidos nucleicos de la combinación pueden diseñarse para la hibridación en condiciones de hibridación estrictas.

- 20 Las condiciones de hibridación estrictas, tal como se usan en la presente memoria, comprenden preferiblemente hibridación a 52° C ($\pm$ 0,2° C) durante hasta 30 min, 20 min, 15 min o 10 min, preferiblemente durante aproximadamente 10 minutos, con niveles de sal elevados y preferiblemente en condiciones especialmente libres de cationes divalentes, en particular libres de Mg^{2+} (por ejemplo, 900 mM de NaCl, 20 mM de Tris/HCl, pH 8,3, 0,01% p/p de SDS, 1 mM de EDTA, 20% v/v de formamida), y lavado esencialmente etanólico, bajo en sal y a temperatura
25 ambiente durante aproximadamente 30 a aproximadamente 90 segundos o aproximadamente 45 a aproximadamente 75 segundos, preferiblemente aproximadamente 60 segundos. Preferiblemente, el lavado se realiza a altas condiciones de Mg^{2+} , por ejemplo en etanol al 50%, 215 mM de NaCl, 5 mM de $MgCl_2$, 50 mM de Tris/HCl pH 8,3.

- En la presente invención, la hibridación se puede llevar a cabo en presencia de SDS, por ejemplo aproximadamente de 0,005% p/p a 0,015% p/p o aproximadamente 0,01% p/p de SDS. La hibridación también se puede realizar en presencia de formamida, por ejemplo aproximadamente 15% v/v hasta aproximadamente 25% v/v de formamida, preferiblemente aproximadamente 20% v/v de formamida. Durante la hibridación, puede estar presente un agente capaz de formar complejos con cationes divalentes, tal como EDTA, a una concentración aproximadamente de 0,2 mM a aproximadamente 2 mM, o aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 1,5 mM. Es preferible una
35 concentración de EDTA aproximadamente de 1 mM.

La temperatura ambiente, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere preferiblemente a una temperatura en un intervalo aproximadamente de 18° C a aproximadamente 24° C o aproximadamente de 19° C a aproximadamente 22° C, tal como aproximadamente 18° C, aproximadamente 19° C, aproximadamente 20° C, aproximadamente 21° C, aproximadamente 22° C, aproximadamente 23° C o aproximadamente 24° C.

- 40 Las "condiciones esencialmente etanólicas", tal como se usan en la presente memoria, preferentemente se refieren a una concentración de etanol del 0 al 90% v/v, 40 al 90% v/v, 50 al 90% v/v, 60 al 90% v/v, por ejemplo en el intervalo de 40 a 60% v/v, preferiblemente aproximadamente 50% v/v.

Durante la hibridación y/o el lavado, el pH se puede ajustar independientemente a >8, aproximadamente 7,5 a aproximadamente 9, o aproximadamente 8 a aproximadamente 8,5, preferiblemente aproximadamente 8,3.

- 45 Como se usa en esta memoria, las condiciones de bajo contenido en sal incluyen una concentración de sal total aproximadamente de 50 mM a aproximadamente 400 mM, aproximadamente 100 mM a aproximadamente 300 mM, o aproximadamente 150 a aproximadamente 250 mM. Es preferible una concentración aproximadamente de 200 mM, tal como 215 mM. Sal elevada, tal como se usa en la presente memoria, incluye una concentración de sal total aproximadamente de 700 mM a aproximadamente 1100 mM, aproximadamente 800 mM a aproximadamente 1000
50 mM, o aproximadamente 850 mM a 950 mM. Es preferible una concentración aproximadamente de 900 mM, tal como 915 mM. "La concentración total de sal", tal como se utiliza en la presente memoria, significa la concentración de sales de cationes monovalentes.

- Es preferible que en la combinación los ácidos nucleicos individuales funcionen uniformemente. "Funcionamiento uniforme" significa que la hibridación satisfactoria puede conseguirse con las diferentes sondas de ácidos nucleicos de la presente invención en las mismas condiciones de hibridación, por ejemplo en condiciones de hibridación estándar. En otras palabras, los ácidos nucleicos de funcionamiento uniforme no requieren la optimización individual de las condiciones de hibridación.
55

La combinación de moléculas de ácido nucleico como se describe en esta memoria, se puede proporcionar en una o más composiciones, opcionalmente junto con los reactivos de hibridación requeridos. Es preferible que la combinación se proporcione en una composición.

5 En los ácidos nucleicos de la combinación de la presente invención, los valores de ΔG de los ácidos nucleicos individuales en relación con su respectiva secuencia afín pueden diferir como máximo en aproximadamente 3 kcal/mol. En particular, si hay más de una baliza presente en la combinación de la presente invención, los valores de la ΔG de los tallos de baliza individuales con respecto a su respectiva secuencia afín pueden diferir como máximo en aproximadamente 3 kcal/mol.

10 Las moléculas de ácido nucleico de la combinación de la presente invención pueden ser independientemente oligonucleótidos. Las secuencias de las moléculas de ácido nucleico capaces de hibridar con la secuencia diana independientemente pueden tener una longitud en el intervalo de 16 a 26 nucleótidos, en particular aproximadamente 20 nucleótidos. Por ejemplo, al menos una secuencia de las moléculas de ácido nucleico que hibridan con la secuencia diana puede tener una longitud en el intervalo de 16 a 26 nucleótidos, en particular aproximadamente 20 nucleótidos.

15 La técnica enseña que las secuencias auxiliares deben aplicarse en concentraciones grandes excedentes. Sorprendentemente se encontró que la concentración de trabajo de los auxiliares y de las balizas requerida en la citada configuración puede ser esencialmente equimolar. Además, este diseño elimina las restricciones debidas a la inaccesibilidad de regiones del ARNr y permite una libre elección de secuencias únicas. Sorprendentemente, fue posible generar una señal uniforme del 100% después de sólo 8 minutos independientemente de la posición en la
20 que las balizas hibridaban. Las moléculas de ácido nucleico de la combinación pueden proporcionarse en una composición a concentraciones esencialmente equimolares. En la presente invención, "concentraciones esencialmente equimolares" significa que las concentraciones de al menos dos moléculas de ácido nucleico de la composición pueden diferir en un 15 por ciento en peso como máximo, en un 10 por ciento en peso como máximo, o en un 5 por ciento en peso como el máximo.

25 Otro aspecto más de la presente invención es un kit o chip según la reivindicación 9 que comprende una combinación de moléculas de ácido nucleico como se describe en esta memoria, opcionalmente junto con los reactivos de hibridación requeridos. Preferiblemente, el chip o kit contiene una o más combinaciones de moléculas de ácido nucleico como se describe en esta memoria en composiciones separadas, por ejemplo una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o incluso más combinaciones. Se prefieren ocho combinaciones
30 separadas en un kit o en un chip. En la Tabla 1 se recopila la lista de agrupaciones y kits resultantes para la detección, enumeración e identificación de los organismos enumerados.

Un aspecto adicional de la invención es que utilizando combinaciones según esta invención, los productos de expresión activos de los genes pueden detectarse a nivel de ARNm, por ejemplo alineando más de una pareja de
35 bucles en horquilla con una secuencia específica sin amplificación previa. Se pueden detectar secuencias altamente expresadas de genes que codifican para resistencia a antibióticos, producción de toxinas o incluso oncogenes con la misma velocidad y especificidad que para la identificación de microorganismos.

La combinación, kit o chip de la presente invención se puede usar para la identificación de una célula tal como se describe en esta memoria, en particular de un microorganismo como se describe en la presente memoria. La
40 combinación y/o kit preferiblemente es para uso diagnóstico. Más preferiblemente, la combinación de la presente invención es para el diagnóstico *in vitro* de la presencia de una célula como se describe en la presente memoria, en particular de un microorganismo como se describe en la presente memoria.

La combinación o/y el kit de la presente invención se pueden usar para la determinación de la resistencia a antibióticos.

45 La combinación o/y el kit se puede usar para la determinación de la producción de una toxina, por ejemplo de una célula y/o microorganismo como se describe en la presente memoria.

La combinación o/y el kit se pueden usar para la determinación de la expresión de oncogén, por ejemplo en una célula o/y microorganismo como se describe en esta memoria.

La combinación, kit o chip se puede usar para la fabricación de una composición farmacéutica para el diagnóstico de la presencia de una célula como se describe en la presente memoria, en particular de un microorganismo como se describe en la presente memoria.
50

La combinación, kit o chip puede utilizarse para la fabricación de una composición farmacéutica para el diagnóstico de caracteres patológicos dentro de una célula como se describe en la presente memoria.

La combinación puede aplicarse a ensayos diseñados para ser realizados en tubos, placas de microtitulación, pocillos de microtitulación filtrados, portaobjetos y chips. La detección puede realizarse con fluorescencia,
55 fluorescencia resuelta en el tiempo, con una pluralidad de fluoróforos.

En la realización preferida para FISH, el ensayo se realiza sobre portaobjetos de vidrio diseñados para contener y separar varias muestras.

También, otro aspecto de la presente invención es un método según la reivindicación 10 para identificar una célula en una muestra, que comprende las etapas

- 5 (a) proporcionar una muestra, con la combinación de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención en condiciones que permiten la hibridación de los oligonucleótidos con las secuencias diana en la célula, y (b) determinar la luminiscencia del grupo luminiscente de la primera molécula de ácido nucleico en donde la luminiscencia del primer oligonucleótido indica la presencia de la secuencia diana.

- 10 La presencia de la secuencia diana indica la presencia de la célula o/y de un grupo de células, en particular si la secuencia diana es específica para la célula y/o para el grupo de células.

La célula puede ser una célula tal como se describe en esta memoria, por ejemplo una célula procariota o una célula eucariota. En particular, la célula puede ser un microorganismo como se describe en la presente memoria.

- 15 La muestra puede ser cualquier muestra de origen biológico, tal como una muestra clínica o de un alimento, que se sospecha comprende un ácido nucleico que va a ser detectado por el bucle en horquilla. La muestra puede ser una muestra que comprende una célula, en particular un microorganismo, tal como una bacteria, levadura y/o un hongo, en particular una bacteria Gram positiva y/o Gram negativa. El procedimiento general para el ensayo es idéntico con una desviación mínima en el pretratamiento de organismos Gram negativos y Gram positivos (véase, por ejemplo, el Ejemplo 3).

En el método de la presente invención, las etapas (a) y (b) pueden realizarse *in situ*, en particular mediante FISH.

- 20 En la etapa (a), la muestra puede fijarse sobre una superficie. La etapa (a) puede comprender condiciones de hibridación estrictas, como se describe en la presente memoria.

En la etapa (a), el contacto de la muestra con la combinación de moléculas de ácido nucleico puede realizarse durante aproximadamente hasta 30 minutos, durante aproximadamente hasta 20 minutos, durante aproximadamente hasta 15 minutos, o durante aproximadamente hasta 10 minutos.

- 25 El tampón de hibridación empleado en la etapa (a) esencialmente no contiene preferiblemente cationes divalentes, en particular, el tampón de hibridación empleado en la etapa (a) preferiblemente está esencialmente libre de magnesio.

En la etapa (a), los ácidos nucleicos de la combinación pueden aplicarse a concentraciones esencialmente equimolares.

- 30 La etapa (a) del método de la presente invención puede comprender

(1) poner en contacto al menos un ácido nucleico cualquiera de la presente invención o una combinación de ácidos nucleicos de la presente invención con la muestra biológica,

- 35 (2) hibridar el ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos de (1) con la muestra en condiciones en las que el tallo se abra en presencia de una secuencia afín, por ejemplo, hibridar con un tampón que está esencialmente exento de cationes divalentes, en particular esencialmente libre de Mg^{2+} y

(3) hibridar el ácido nucleico o la combinación de ácido nucleico de (1) con la muestra en condiciones en las que el tallo del ácido nucleico está abierto, por ejemplo, hibridar con un tampón que está esencialmente exento de cationes divalentes, en particular esencialmente libre de Mg^{2+} , y

- 40 (4) inducir condiciones que permiten la formación de tallos en aquellas moléculas de ácido nucleico de (1) que no forman un híbrido con la muestra, por ejemplo, lavar con un tampón que contiene magnesio, por ejemplo a $pH > 8$ y/o a temperatura ambiente.

- 45 Puede aplicarse cualquier protocolo de hibridación que comprenda la aplicación de una disolución esencialmente libre de Mg^{2+} y una disolución que contenga Mg^{2+} como se ha indicado anteriormente. "Esencialmente libre de cationes divalentes" se refiere a cationes divalentes en una concentración de menos de 1 mM, preferiblemente menos de 0,1 mM, más preferiblemente menos de 0,05 mM, más preferiblemente menos de 0,01 mM. "Esencialmente libre de Mg^{2+} " se refiere a una concentración de Mg^{2+} menor que 1 mM, preferiblemente menor que 0,1 mM, más preferiblemente menor que 0,05 mM, más preferiblemente menor que 0,01 mM. Además, la eliminación de iones divalentes puede asegurarse mediante la adición de un agente complejante, tal como EDTA, presente en una concentración aproximadamente de 0,2 mM a 2 mM, o 0,5 mM a 1,5 mM. Se prefiere una 50 concentración de EDTA aproximadamente de 1 mM.

El tampón que contiene magnesio empleado en la etapa (b) puede contener aproximadamente de 0,1 mM a aproximadamente 20 mM de Mg^{2+} , aproximadamente 1 mM a aproximadamente 20 mM de Mg^{2+} , aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM de Mg^{2+} , aproximadamente 2,5 mM a aproximadamente 7,5 mM de Mg^{2+} . Se prefiere una concentración aproximadamente de 5 mM de Mg^{2+} .

- 5 Al final de la hibridación, todas las balizas no unidas necesitan ser devueltas y aseguradas en la formación del bucle en horquilla. De acuerdo con los parámetros termodinámicos, el replegado debe tener lugar espontáneamente a temperatura ambiente. Se encontró que sólo se podía asegurar en presencia de iones metálicos bivalentes. Además, la especificidad del ensayo dependía de la concentración de sal monovalente en el tampón de parada.

- 10 Por lo tanto, el replegado puede conseguirse sumergiendo brevemente el portaobjetos, en primer lugar en un baño de etanol y posteriormente en un baño de tampón de parada que contiene la sal monovalente para soportar la disociación de balizas unidas débilmente y las sales divalentes que soportan la formación de bucle en horquilla, y a una temperatura que favorece la formación del bucle en horquilla. En una configuración preferida se combinan los baños de etanol y de sal y pueden contener 0-90% v/v de etanol, 10 mM a 1M de sal monovalente, 0,1-20 mM de sal bivalente y se tamponan entre pH 7 y pH 9. En la configuración más preferida, el tampón de parada contiene 50%
15 v/v de etanol, 215 mM de NaCl, 5 mM de $MgCl_2$ y 20 mM de Tris/HCl de pH 8,3.

Por ejemplo, se puede usar el siguiente protocolo: Se aplican alícuotas de muestras clínicas a campos definidos en los portaobjetos. Preferiblemente se aplica una cantidad definida de 10 μ l y se seca.

1. Las muestras se fijan al portaobjetos con calor.
2. Los organismos Gram positivos se someten a una digestión con Lisozima/Lisostafina siguiendo las especificaciones publicadas. En una realización preferida la digestión se lleva a cabo de 2 a 7 minutos, a entre 28 y 60° C en una cámara humidificada. La digestión más preferida se lleva a cabo añadiendo enzimas de digestión en cada uno de los campos requeridos del portaobjetos, directamente mientras está en la placa de calentamiento (52° C) y se deja hasta que se seca.
3. Posteriormente se forman los poros, por ejemplo, sumergiendo el portaobjetos en metanol puro o en etanol puro (al menos 96%) durante varios minutos. En una realización preferida, el metanol o el etanol se enfrían con hielo y el tiempo de inmersión está entre 2 y 10 minutos. En una realización más preferida, los portaobjetos se sumergen de 4 a 6 minutos en etanol. En la realización más preferida, los portaobjetos se sumergen en etanol de alcohol industrial metilado (IMS) al 96% (o etanol desnaturalizado equivalente) durante 5 minutos a temperatura ambiente.
4. El portaobjetos se seca sobre una placa caliente, por ejemplo a 52° C.
5. Los ácidos nucleicos (uno o más balizas, al menos dos auxiliares) se disuelven en un tampón de hibridación (que puede estar esencialmente exento de Mg^{2+}) y luego se aplican a cada campo del portaobjetos mientras está en el calentador.
6. El portaobjetos se coloca en una cámara de hibridación, se humidifica con un tampón de hibridación. En una realización preferida, el portaobjetos se cubre con un cubreobjetos deslizante hidrófobo y se coloca en un calentador de portaobjetos cubierto a 52° C durante aproximadamente 10 minutos.
7. El portaobjetos se lava posteriormente con un tampón que contiene magnesio, por ejemplo a pH > 8 o/y a temperatura ambiente. El tampón principal contiene aproximadamente de 0,1 a aproximadamente 20 mM de Mg^{2+} , en particular aproximadamente de 1 a aproximadamente 10 mM de Mg^{2+} , más particularmente aproximadamente de 2,5 a 7,5 mM de Mg^{2+} , incluso más particularmente aproximadamente 5 mM de Mg^{2+} .
8. El portaobjetos se seca y se puede montar con un fluido de montaje y se puede leer con un microscopio de epifluorescencia con una ampliación total, por ejemplo de, 400 $\times$, 600 $\times$ o 1000 $\times$.

En el caso de que se utilicen otros recipientes para la hibridación, la detección puede realizarse mediante citometría de flujo o con un lector de fluorescencia automatizado bien conocidos en la técnica.

- 45 También se puede emplear en el método de la presente invención un kit o un chip como se describe en la presente memoria.

- Para aplicaciones en los chips, las balizas necesitan estar unidas covalentemente a una superficie de soporte. Para facilitar esto, la base 3'-terminal de las balizas diseñadas puede estar biotinilada o ligada a través de un reactivo hetero-bifuncional a una enzima utilizando métodos bien conocidos en la técnica de la química de proteínas y ácidos nucleicos. Las balizas biotiniladas pueden añadirse posteriormente a los chips recubiertos con Streptavidina que pueden obtenerse libremente de fuentes comerciales (19). En esta solicitud, los respectivos bucles en horquilla biotinilados se pueden unir a una pluralidad de campos distintos de un chip, por ejemplo al menos 10, al menos 50, al menos 100, al menos 200 o al menos 500 campos, o como máximo 500, como máximo 400 o como máximo 300 campos. El ARN total se puede extraer de las muestras usando los kits comercialmente disponibles (20) y se puede aplicar al chip en las condiciones de hibridación que se describen en esta memoria.

Después de la hibridación, el chip se puede lavar brevemente con un tampón que contiene magnesio, como se describe en esta memoria, por ejemplo, a pH > 8. La fluorescencia en un campo marca la presencia de una secuencia diana específica, por ejemplo un ARN específico que indica la presencia de un organismo correspondiente en la muestra.

- 5 Para ampliar los ensayos de hibridación a aplicaciones rutinarias a gran escala es necesario analizar secuencialmente una pluralidad de muestras sobre un chip reutilizable. El diseño del chip debe permitir una producción a gran escala, un control eficiente de la calidad y un tiempo de almacenamiento largo.

Para llevar a cabo dicho ensayo, se han desarrollado una gran pluralidad de secuencias con características idénticas (por ejemplo Tabla 1, Tabla 3 o/y Tabla 4), que pueden aplicarse a posiciones definidas en el dispositivo de
10 detección (chip), respectivamente.

En un ensayo típico, el ARN total se extrae de una muestra utilizando el procedimiento de extracción y los kits disponibles en el mercado, y se coloca en el chip en las condiciones de hibridación citadas. Después de la hibridación, el chip se lava con el tampón de parada a temperatura ambiente, y se lee como es bien conocido en la técnica. Al final del ciclo, todo el ARN hibridado se lava con el tampón de hibridación libre de ADN y ARN a
15 aproximadamente 62° C. Posteriormente la temperatura se deja descender aproximadamente a 52° C para equilibrarse durante el siguiente ciclo de hibridación.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos y figuras.

Leyendas

20 Tabla 1 describe las secuencias de las balizas de la presente invención. Abreviaturas: R&G: un colorante fluorescente rojo o/y verde que puede unirse a la baliza, tal como Cy3 o FITC o un derivado del mismo.

Tabla 2 describe que las balizas de PNA no son adecuadas en la presente invención. Los cálculos se realizaron con las secuencias de la Tabla 1 suponiendo que la baliza era una baliza de PNA. En contraste con las balizas de ADN, se deben cumplir todos los cinco criterios siguientes: contenido de GC <60%, <3 bases autocomplementarias, 4 purinas en fila, longitud máxima de 18, palíndromos de secuencia inversa o repeticiones o horquillas. "Sí" ("No") en la Tabla 2 indica que el criterio se cumple (no se cumple). La columna "Final" indica si una baliza de PNA es
25 adecuada en la presente invención ("Sí") o no ("No"). "No" en la columna final indica que uno de los cinco criterios no se cumple. "Sí" indicaría que se cumplen todos los criterios. Todas las secuencias de la Tabla 2 se consideran "No". Por lo tanto, ninguna de las secuencias de la Tabla 1 sería adecuada en una baliza de PNA.

30 Tabla 3: Lista de sondas de baliza que funcionan en condiciones idénticas a las de la Tabla 1 y que poseen condiciones fisicoquímicas muy similares.

Tabla 4: Combinaciones individuales de bucles en horquilla y ácidos nucleicos auxiliares, en donde las secuencias afines de la baliza y las secuencias auxiliares están localizadas en la secuencia diana de un microorganismo ("organismo diana"). En la secuencia del bucle en horquilla, la secuencia complementaria a la secuencia afín está subrayada. "ARNr" hace referencia a la localización de la secuencia diana en el ARNr 16S o 23S, si procede. "Alineamiento con E. coli" se refiere a la posición de la secuencia correspondiente en el ARNr 16S o 23S de E. coli, respectivamente. La "puntuación de Fuchs" se refiere a la puntuación (clase de brillo) definida en Fuchs et al. (4). Las columnas "balizas activas en kits" indican los grupos de combinaciones preferidos. Los grupos de combinaciones preferidos se refieren a los grupos de combinaciones adecuados para identificar organismos en hemocultivos (BC) de organismos Gram negativos, organismos en hemocultivos de organismos Gram positivos, organismos que causan neumonía, organismos asociados con fibrosis quística y organismos que se encuentran en las heces. Los miembros de estos "grupos de diagnóstico" se indican con "1" en las columnas respectivas.
35
40

Figura 1: Comparación de los datos de hibridación derivados de la solicitud de patente US 5.030.557 ("sonda convencional") y los datos de hibridación de la presente invención. Los datos de las Tablas I, IIa, IIb y IIc de la solicitud de patente US 5.030.557 se han promediado. (1) Sólo la sonda de la solicitud de patente US 5.030.557. (2) Sonda y un auxiliar según la solicitud de patente US 5.030.557. (3) Sonda y dos auxiliares según la solicitud de patente US 5.030.557. (4) Sonda y tres auxiliares según la solicitud de patente US 5.030.557. (5) Sonda (baliza molecular) y cuatro ácidos nucleicos auxiliares según la presente invención. "12 min" y "durante una noche" indican los períodos de hibridación. La "porcentaje de mejora durante una noche" indica el porcentaje de mejora por hibridación de la incubación durante una noche en comparación con la hibridación de 12 min. "% hibridación" indica el porcentaje de sitios de hibridación en una muestra que están ocupados por una sonda de hibridación.
45
50

Figura. 2: Cinética de hibridación. (1) Baliza molecular de E. coli con auxiliar, (2) E. coli sin auxiliar, (3) baliza molecular B-Straga-3 (véase la Tabla 4) con auxiliar, (4) B-Straga-3 sin auxiliar. La fluorescencia se proporciona en unidades relativas.

Figura. 3: Esquema que describe el alineamiento de una baliza molecular y cuatro oligonucleótidos auxiliares en una secuencia de ARNr.
55

Ejemplo 1. Efecto de los Auxiliares

La comparación de los efectos del estado de la técnica de la Figura 1 resume el efecto de los oligonucleótidos auxiliares tras la hibridación de la sonda, como se describe en solicitud de patente US 5.030.557 (véanse las barras (1) a (4) en la figura 1). Los datos se obtuvieron de las Tablas I, IIa, IIb y IIc de la solicitud de patente US 5.030.557. Se han calculado los promedios.

La solicitud de patente US 5.030.557 muestra el uso de oligonucleótidos auxiliares para potenciar la unión de los oligonucleótidos marcados al ARN ribosómico aislado. Se han empleado sondas lineales de 18 a 24 nucleótidos de longitud. Los auxiliares tenían una longitud de 23 a 58 nucleótidos. Sin embargo, esto requirió una incubación durante una noche para conseguir una señal mejorada. Además, la solicitud de patente US 5.030.557 exige una concentración 50-200 veces mayor de cada auxiliar para conseguir la mejora. La adición de un segundo auxiliar aumentó la señal en un 20% y la adición adicional de un tercer auxiliar sólo aumentó la señal en un 7% adicional (véanse las barras "durante una noche" en la figura 1).

En la hibridación *in situ* en un microorganismo con una combinación de una baliza molecular y cuatro ácidos nucleicos auxiliares de acuerdo con la presente invención, la hibridación alcanza aproximadamente el 100% después de 12 min (ver barras (5) en la figura 1). Teniendo en cuenta que la hibridación *in situ* requiere generalmente períodos de hibridación más largos que la hibridación que tiene lugar en disolución, un período de hibridación de sólo 12 minutos con una combinación de la presente invención en comparación con la hibridación durante una noche como se describe en la solicitud de patente US 5.030.557 es una gran mejora con respecto a las combinaciones de sondas y auxiliares del estado de la técnica.

Ejemplo 2. Cinética de hibridación *in situ*

Las balizas moleculares de la presente invención (baliza molecular de *E. coli*, B-Straga-3, véase Tabla 4) se ensayan en ausencia y presencia de cuatro ácidos nucleicos auxiliares en la hibridación *in situ* con *E. coli* y *Streptococcus*, respectivamente, fijados en un portaobjetos. La baliza B-Straga-3 comprende una secuencia que hibrida con una secuencia diana localizada en ARNr 16S de *Streptococcus agalactiae*.

Se colocaron alícuotas de 10 µl de una suspensión bacteriana respectiva sobre cada campo de un portaobjetos y se secaron para producir 10⁵ células por campo. El ensayo de hibridación *in situ* adicional se realizó como se describe en la invención con una excepción. El campo 1 recibió la mezcla de hibridación en el minuto = 0; el campo 2 después de 2 minutos; el campo 3 después de 4 minutos; el campo 4 después de 6 minutos; el campo 5 después de 8 minutos; el campo 6 después de 10 minutos; el campo 7 después de 11,5 minutos; y el campo 8 antes de sumergirlo en la disolución de parada.

Como puede verse en la Fig. 2, la hibridación de una baliza de *E. coli* sin auxiliar es débil y por lo tanto reversible, y el reanillamiento del ARNr es preferible a la hibridación con la baliza. La velocidad de hibridación mostrada en la Fig. 2 se debe al diseño estricto de las balizas junto con los auxiliares respectivos.

Ejemplo 3

Un procedimiento típico de hibridación para el ensayo es idéntico para todas las balizas con una desviación mínima en el pretratamiento de organismos Gram negativos y Gram positivos, como se indica en la Tabla siguiente.

Etapa	Aplicaciones Gram negativas	Aplicaciones Gram positivas
1	Aplicar 10 µl de muestra a cada campo designado en un portaobjetos	Aplicar 10 µl de muestra a cada campo designado en un portaobjetos
2	Secar sobre placa caliente 52° C	Secar sobre placa caliente 52° C
3		Añadir 10 µl de la mezcla de lisis (3.4) en la placa caliente y secar (tarda 4 minutos)
4	En una caja de Coplin, sumergir el portaobjetos en IMS durante 7 minutos y secar en la placa caliente 52° C	En una caja de Coplin, sumergir el portaobjetos en IMS durante 3 minutos y secar en la placa caliente 52° C
5	Separar de la placa caliente y añadir 10 µl de mezcla de hibridación lista para su uso a cada campo	
6	Colocar el cubreobjetos de hibridación sobre el portaobjetos e incubar a 52° C en un horno (2.5) durante 10 minutos	
7	En una caja de Coplin, sumergir el portaobjetos en una Mezcla de Parada (3.2) durante 1 minuto	

8	Sumergir brevemente en IMS y secar en la placa caliente a 52° C
9	Colocar inmediatamente una pequeña gota de medio de montaje en cada campo y cubrir con un cubreobjetos
10	Leer con microscopio de fluorescencia

La lectura puede realizarse visualmente o con la ayuda de dispositivos de lectura automatizados con un microscopio de fluorescencia. Como es bien conocido en la técnica, la hibridación *in situ* puede adaptarse fácilmente a la citometría de flujo realizando las citadas etapas en una placa de microtitulación y leyéndola con un citómetro de flujo.

5 La ventaja obvia radica en la facilidad de automatización.

Referencias

- (1) EP 07 818 883.6
- (2) M. S. Shchepinov, S. C. Case-Green and E. M. Southern, Appl Environ Microbiol. 2007 January; 73(1): 73-82. Steric factors influencing hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays
- 10 (3) Michael M. A. Sekar, Will Bloch and Pamela M. St John, Nucleic Acids Research 2005 33(1):366-375; Comparative study of sequence-dependent hybridization kinetics in solution and on microspheres
- (4) BERNHARD M. FUCHS, KAZUAKI SYUTSUBO, WOLFGANG LUDWIG, AND RUDOLF AMANN, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, AEM. 67.2.961-968.2001, *In situ* Accessibility of Escherichia coli 23S ARNr to Fluorescently Labeled Oligonucleotide Probes
- 15 (5) BERNHARD MAXIMILIAN FUCHS, GUNTER WALLNER, WOLFGANG BEISKER, INES SCHWIPPL, WOLFGANG LUDWIG, AND RUDOLF AMANNI, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, December 1998, p. 4973-4982 Flow Cytometric Analysis of the *In situ* Accessibility of Escherichia coli 16S rRNA for Fluorescently Labeled Oligonucleotide Probes
- 20 (6) BERNHARD M. FUCHS, FRANK OLIVER GLOCKNER, JORG WULF, AND RUDOLF AMANN, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, August 2000, p. 3603-3607, Unlabeled Helper Oligonucleotides Increase the *In situ* Accessibility to 16S rRNA of Fluorescently Labeled Oligonucleotide Probes
- (7) RUDOLF I. AMANN, WOLFGANG LUDWIG, AND KARL-HEINZ SCHLEIFER, MICROBIOLOGICAL REVIEWS, March 1995, p. 143-169, Phylogenetic Identification and *In situ* Detection of Individual, Microbial Cells without Cultivation
- 25 (8) U.S. Pat. No. 5,030,557: Means and Methods for enhancing nucleic acid hybridisation. Inventors: Hogan JJ and Milliman CL.
- (9) WO 1992014841 19920903, NOVEL LANTHANIDE CHELATE-CONJUGATED OLIGONUCLEOTIDES.

REIVINDICACIONES

1. Una combinación de moléculas de ácido nucleico capaces de hibridar con una secuencia de ácido nucleico diana, en donde la combinación comprende
 - (a) al menos una primera molécula de ácido nucleico que comprende
 - (i) una secuencia capaz de hibridar con la secuencia diana,
 - (ii) dos secuencias complementarias capaces de formar un tallo, y
 - (iii) un grupo luminiscente y un grupo desactivador de la fluorescencia, en donde el grupo desactivador de la fluorescencia apaga el grupo fluorescente si el ácido nucleico forma una estructura de bucle en horquilla, y en donde el grupo fluorescente es capaz de emitir una señal de luminiscencia después de la excitación si el oligonucleótido hibrida con la secuencia diana,
 - (b) una segunda molécula de ácido nucleico, una tercera molécula de ácido nucleico y opcionalmente al menos otra molécula de ácido nucleico,

en donde la segunda molécula de ácido nucleico, la tercera molécula de ácido nucleico y la al menos otra molécula de ácido nucleico opcional son oligonucleótidos auxiliares que hibridan con la secuencia diana en una secuencia situada 5' y/o 3' de la secuencia con la cual hibrida el primer ácido nucleico,

caracterizada por que

en condiciones de hibridación idénticas y en base a las secuencias diana complementarias todas las moléculas de ácido nucleico con respecto a la unión a sus secuencias afines respectivas de la secuencia diana, se diseñan de manera que hibridan independientemente con un ΔG en el intervalo de -15 a -25 kcal/mol y sus valores de ΔG no varían más de 3 kcal/mol.
2. La combinación según la reivindicación 1, en donde el ΔG de todas las moléculas de ácido nucleico con respecto a la unión a las secuencias de la secuencia diana en condiciones de hibridación no varía más de 2 kcal/mol, preferiblemente no más de 1 kcal/mol.
3. La combinación según las reivindicaciones 1 o 2, en donde los ácidos nucleicos son adecuados para la hibridación *in situ*, en particular para FISH.
4. La combinación según las reivindicaciones 1, 2 o 3, en donde la secuencia del ácido nucleico diana se selecciona de secuencias de ADN y secuencias de ARN, y donde la secuencia del ácido nucleico diana es preferiblemente una secuencia de ARNr o una secuencia de ARNm.
5. La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las moléculas de ácido nucleico hibridan con la secuencia diana en posiciones directamente adyacente entre sí, o en donde al menos dos moléculas de ácido nucleico hibridan con la secuencia diana en posiciones separadas entre sí por un espacio de al menos un nucleótido.
6. La combinación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde al menos una secuencia de las moléculas de ácido nucleico que hibrida con la secuencia diana tiene una longitud en el intervalo de 16 a 26 nucleótidos.
7. La combinación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para uso diagnóstico, en particular para el diagnóstico de la presencia de una célula.
8. La combinación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para la determinación de la resistencia a un antibiótico, producción de una toxina, y/o expresión de un oncogén.
9. Kit o chip que comprende la combinación de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
10. Un método de identificación de una célula en una muestra, que comprende las etapas
 - (a) poner en contacto una muestra con la combinación de moléculas de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en condiciones que permitan la hibridación de los oligonucleótidos con las secuencias diana en la célula, y
 - (b) determinar la luminiscencia del grupo luminiscente de la primera molécula de ácido nucleico,

en donde la fluorescencia del primer oligonucleótido indica la presencia de la secuencia diana.

11. El método según la reivindicación 10, en donde la muestra se selecciona de muestras biológicas, en particular de muestras clínicas.
12. El método según las reivindicaciones 10 o 11, en donde las etapas (a) y (b) se llevan a cabo *in situ*, en particular mediante FISH.
- 5 13. El método según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, donde el tampón de hibridación empleado en la etapa (a) no contiene cationes divalentes.
14. Uso de la combinación de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o un kit o chip de la reivindicación 9 para la identificación de una célula.

Figura 1

Efecto de los auxiliares en la Hibridación

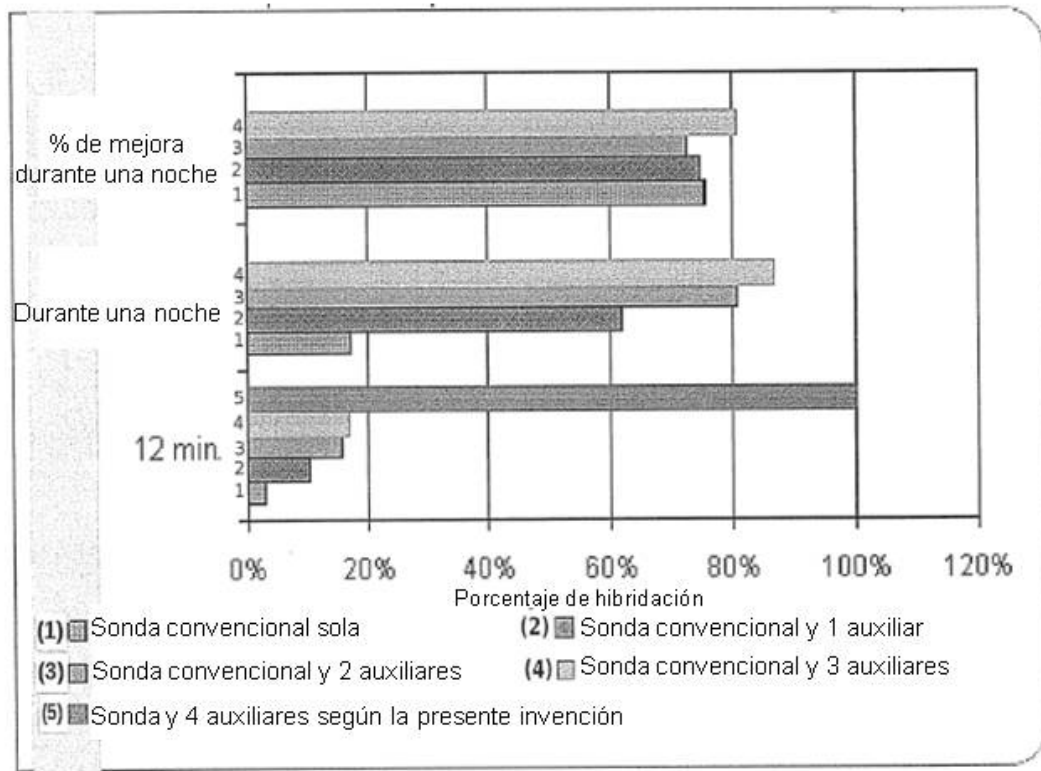


Figura 2

Cinética de hibridación

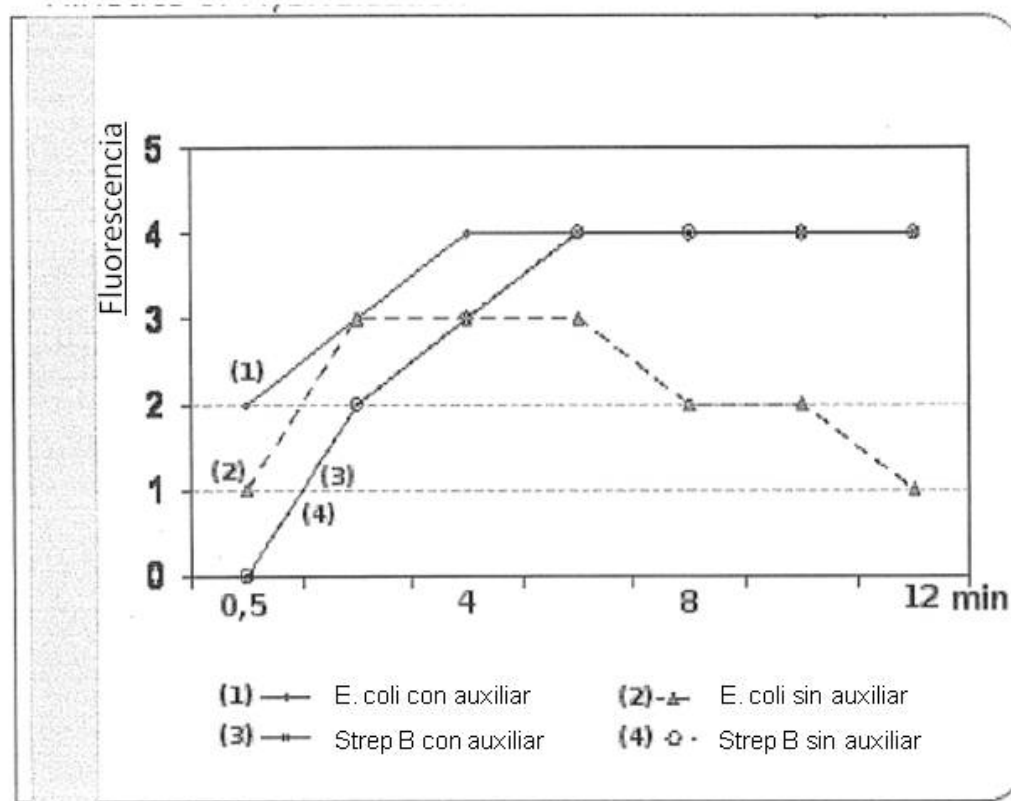


Figura 3

Alineamiento de baliza y auxiliares

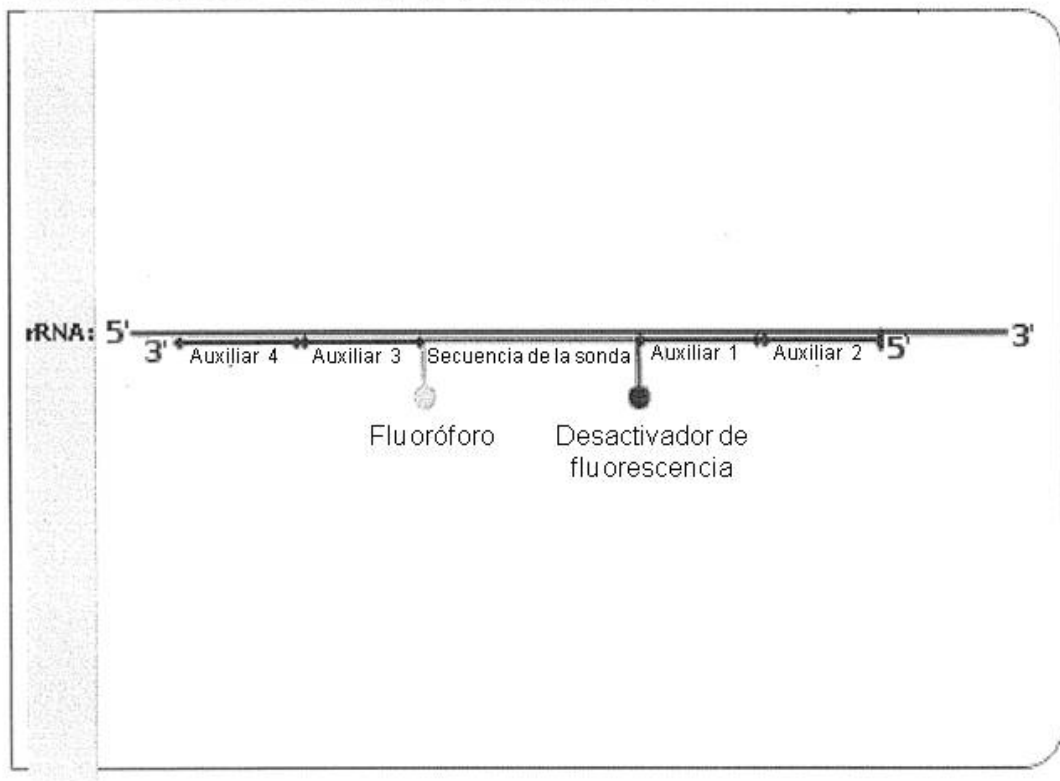


Tabla I

Número de código de diagnóstico de los bucles	Organismo diana	Nombre de la baliza	RNA	Posición en rRNA (Ecoli)	Puntuación de fuch 1=alta; Vi = sin señal / señal baja
L- 01- 1 -10 -50 -100	R&G Acinetobacter	B-Acibact-1	16S rRNA	652 - 669	650-667 V
L- 01- 2 -10 -50 -100	R&G Acinetobacter baumannii	B-Acinbaum-2	16S rRNA	67 - 86	66-83 =II
L- 01- 3 -10 -50 -100	R&G Actinomyces spp.				
L- 01- 4 -10 -50 -100	R&G Aspergillus spp				
L- 01- 5 -10 -50 -100	Aspergillus flavus	Aspfia	18s	NA	NA
L- 01- 6 -10 -50 -100	Aspergillus fumigatus	Aspfum	18s	NA	NA
L- 01- 7 -10 -50 -100	Aspergillus niger	Aspnig	18s	NA	NA

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Organismo diana	Nombre de la baliza	RNA	Posición en rRNA (Ecoli)	Puntuación de fuch 1=alta; VI= sin señal / señal baja
L- 01- 8 -10 -50 -100	Aspergillus terreus	Aspter	18s	NA	NA
L- 01- 9 -10 -50 -100	R&G Bacteroides/Prevotella	B-BacPrev	16S rRNA		
L- 01- 10 -10 -50 -100	R&G Borrelia burgdorferi	B-Borburg	16S rRNA	39 - 58	38 - 54 =II; 48 - 65 = II
L- 01- 11 -10 -50 -100	R&G Bordetella pertussis	B-Borper	23S rRNA	1768 - 1785	1768 - 1786 = IV
L- 01- 12 -10 -50 -100	R&G Burkholderia cepacia Complejo = Opción I	B-Burcep-complex-1	16S	425 - 449	431 - 448 = III
L- 01- 13 -10 -50 -100	R&G Burkholderia cepacia Complejo, dos balizas = Opción II	B-Burcep-complex - 2a	16S	404 - 383	387-403 =IV

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Organismo diana	Nombre de la baliza	RNA	Posición en rRNA (Ecoli)	Puntuación de fuch 1=alta, VI= sin señal / señal baja
L- -100		B-Burcep-compl- 2b	16S	446 - 433	431-448 = III
L- 01- 14 -50 -100	R&G Burkholderia cepacia	B-Burcep-pure	16S	441 - 460	440-456 = I
L- 01- 15 -50 -100	R&G Burkholderia pyrocinia / stabilis/ambifaria	B-Burstabpyramb	16S	407 - 424	413-429 = II
L- 01- 16 -50 -100	R&G Burkholderia dolosa/anthina	B-Burdolant	16S	474 - 458	443-460=II
L- 01- 17 -50 -100	R&G Burkholderia multivorans	B-Burmult	16S	475 - 463	455-473=VI

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Organismo diana	Nombre de la baliza	RNA	Posición en rRNA (Ecoli)	Puntuación de fuch 1=alta, VI = sin señal / señal baja
L- 01- 18 -10	R&G Burkholderia cenocepacia/Vietnamiensis	B-Bur-vieteno	16S	475 - 458	455-473=VI
L- 01- 19 -10 -50 -100	R&G Campylobacter (pathogenic thermophiles	Ctherm	23S	1419	
L- 01- 20 -10 -50 -100	R&G Campylobacter lari	Clari	16S rRNA		
L- 01- 21 -10 -50 -100	R&G Campylobacter jejuni	Cplej			
L- 01- 22 -10 -50 -100	R&G Cp. upsaliensis	Cpupa			
L- 01- 23 -10 -50 -100	R&G Cp coli	Cpcoli			
L- 01- 24 -10 -50 -100	R&G Cp coli -comp	Cpcolcomp			
L- 01- 25 -10 -50 -100	R&G Chlamydia	S-G-Chla-0232-A-18			

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Organismo diana	Nombre de la baliza	RNA	Posición en rRNA (Ecoli)	Puntuación de fuch 1=alta; V1 = sin señal / señal baja
L- 01- 26 -10 -50 -100	R&G Chlamydiaceae	S-F-Chlae-0574-a-A-18			
L- 01- 27 -10 -50 -100	R&G Chlamydiales	S-O-Chls-0523-a-A-18b			
L- 01- 28 -10 -50 -100	R&G Chlamydia	S-G-Chlph-0583-a-A-18			
L- 01- 29 -10 -50 -100	R&G Chlamydia pneumoniae	B-Chlapneu	16S rRNA		
L- 01- 30 -10 -50 -100	R&G "Chlamydia psittaci" group	S-S-Cps-1414-a-A-18			
L- 01- 31 -10 -50 -100	R&G Subgroup of the Parachlamydiaceae	Bn9658			
L- 01- 32 -10 -50 -100	R&G Chlamydia ssp.	ChlamyA			
L- 01- 33 -10 -50 -100	R&G Chlamydia trachomatis	ChltraA			

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Organismo diana	Nombre de la baliza	RNA	Posición en rRNA (Ecoli)	Puntuación de fuch 1=alta, Vi = sin señal / señal baja
L- 01- 34 -10 -50 -100	R&G Canda albicans	Can-alb-2	18S	314 - 295	NA
L- 01- 35 -10 -50 -100	R&G Canda krusei	Can-kr-2	18S	146 - 169	NA
L- 01- 36 -10 -50 -100	R&G Candida dublinensis	Can-dub-2	18S	187 - 206	NA
L- 01- 37 -10 -50 -100	R&G Candida glabrata	Can-gla-2	18S	379 - 363	NA
L- 01- 38 -10 -50 -100	R&G Candida parapsilosis	Can-para-2	18S	310 - 291	NA

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Organismo diana	Nombre de la baliza	RNA	Posición en rRNA (Ecoli)	Puntuación de fuch 1=alta; VI = sin señal / señal baja
L- 01- 39 -10 -50 -100	R&G Candida spp	Can-spp-2	18S	366 - 347	NA
L- 01- 40 -10 -50 -100	R&G Candida tropicales	Can-trop-3	18S	84 - 84	NA
L- 01- 41 -10 -50 -100	Candida lusitanae				
L- 01- 42 -10 -50 -100	R&G Citrobacter freundii	B-clfreu	23S rRNA	542 - 559	547-584 = III
L- 01- 43 -10 -50 -100	R&G Clostridium botulinum	B-Clobot	16S rRNA	173 - 194	173-190IV, 181-198 = II
L- 01- 44 -10 -50 -100	Clostridium difficile	B-Clodiff	16S rRNA	73 - 51	38-54 = II; 55-72 = III

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Organismo diana	Nombre de la baliza	rRNA	Posición en rRNA (Ecoli)	Puntuación de fuch 1=alta, VI = sin señal / señal baja
L- 01- 45 -10 -50 -100	R&G Clostridium spp	B-Closp	16S rRNA	52 - 35	48-65 = II; 38-54 = II
L- 01- 46 -10 -50 -100	R&G Clostridium perfringens	B-Cloper-Cp2-10	16S rRNA	212 - 189	199-215=II
L- 01- 47 -10 -50 -100	R&G Clostridium perfringens	B-Cloper-Cp2-18	16S rRNA		
L- 01- 48 -10 -50 -100	Clostridium tetani	B-Clolet	16S rRNA	114 - 95	91-108= II; 102-118 = III
L- 01- 49 -10 -50 -100	Cryptococcus neoformans				
L- 01- 50 -10 -50 -100	R&G Enterobacteriaceae	B-EBAC-1791	23S rRNA	1811 - 1791	1787-1804=III
L- 01- 51 -10 -50 -100	R&G Enterobacteriaceae	B-Entero-1247	16S rRNA	1264 - 1247	1248-1265=III

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Organismo dian a	Nombre de la baliza	RNA	Posición en rRNA (Ecoli)	Puntuación de fuch 1=alta, Vi = sin señal y señal baja
L- 01- 52 -10 -50 -100	R&G Enterobacteriaceae	B-Enterot+182	16S rRNA	Subjt: 201 - 182	199-215= II
L- 01- 53 -10 -50 -100	R&G Enterococci	B-Entococ	16S rRNA	242 - 225	218-235= I;236-252=II
L- 01- 54 -10 -50 -100	R&G Enterococcus faecalis	B-Ent-alls	16S rRNA	129 - 146	127-144 = III
L- 01- 55 -10 -50 -100	R&G Enterococcus faecium	B-Ent-lum	16S rRNA	192 - 212	191-209 =II
L- 01- 56 -10 -50 -100	R&G Escherichia coli	B-Ecol-On 1	16S rRNA	75 - 95	66-83= II; 73-90=IV
L- 01- 57 -10 -50 -100	R&G Eu-bacteria	Eub			

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Organismo diana	Nombre de la baliza	rRNA	Posición en rRNA (Ecoli)	Puntuación de fuch 1=alta, VI = sin señal / señal baja
L- 01- 58 -10 -50 -100	R&G <i>Fusarium</i> spp				
L- 01- 59 -10 -50 -100	R&G <i>Gardnerella vaginalis</i>	Garvag			
L- 01- 60 -10 -50 -100	R&G <i>Haemophilus influenzae</i>	B-Haeinf-2	16S rRNA	189 - 167	173 - 190=IV; 181-198=II
L- 01- 61 -10 -50 -100	R&G <i>Haemophilus influenzae</i>	B-Haeinf-3	16S rRNA	183 - 162	163-180=IV
L- 01- 62 -10 -50 -100	R&G <i>Klebsiella pneumoniae</i>	b-Klepne-2	16S rRNA	445 - 465	443*460 = II
L- 01- 63 -10 -50 -100	R&G <i>Klebsiella oxytoca</i>	B-Kieboxy	16S rRNA	467 - 444	446-463 = II

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Organismo diana	Nombre de la baliza	RNA	Posición en rRNA (Ecoli)	Puntuación de fuch 1=alta, VI = sin señal / señal baja
L- 01- 64 -10 -50 -100	R&G Lactobacillus brevis	B-Ladbre	16S rRNA	84 - 63	63-80 = II
L- 01- 65 -10 -50 -100	R&G Mycobacterium avium				
L- 01- 66 -10 -50 -100	R&G Mycobacterium bovis				
L- 01- 67 -10 -50 -100	R&G Mycobacterium chelonae				
L- 01- 68 -10 -50 -100	R&G Mycobacterium fortuitum				
L- 01- 69 -10 -50 -100	R&G Mycobacterium gordonae				
L- 01- 70 -10 -50 -100	R&G Mycobacterium intracellulare				
L- 01- 71 -10 -50 -100	R&G Mycobacterium kansasii				
L- 01- 72 -10 -50 -100	R&G Mycobacterium mageritense				
L- 01- 73 -10 -50 -100	R&G Mycobacterium smegmatis				

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Organismo diana	Nombre de la bacteria	rRNA	Posición en rRNA (Ecoli)	Puntuación de fuch 1=alta; VI = sin señal / señal baja
L- 01- 74 -10 -50 -100	R&G Mycobacterium tuberculosis				
L- 01- 75 -10 -50 -100	R&G Mycobacterium xenopi				
L- 01- 76 -10 -50 -100	R&G Legionella pneumophila	B-Legpne	16S rRNA	633 - 616	614 - 631 =IV
L- 01- 77 -10 -50 -100	R&G Listeria monocytogenes	Listmon			
L- 01- 78 -10 -50 -100	R&G Mycoplasma hominis	Mychom			
L- 01- 79	R&G Nocardia spp.				
L- 01- 80 -10 -50 -100	R&G Proteus mirabilis/vulgaris	B-Protnmvi	23S rRNA	1835 - 1818	1823-1839 = III
L- 01- 81 -10 -50 -100	R&G Pneumocystis -1	Pcp -1	18S	1155	

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Organismo diana	Nombre de la baliza	RNA	Posición en rRNA (Ecoli)	Puntuación de fuch 1=alta; VI = sin señal / señal baja
L- 01- 82 -10 -50 -100	R&G Pneumocystis- 2	Pop -2	18S	845	
L- 01- 83	R&G Propionibacterium acnes				
L- 01- 84	R&G Propionibacterium spp Distinto de Psae				
L- 01- 85 -10 -50 -100	R&G Pseudomonas aeruginosa	B- Psae C	23S rRNA	1526 - 1508	1509 - 1526 = III
L- 01- 86 -10 -50 -100	R&G Pseudomonas spp	Psepp	16S rRNA	79 - 59	60-077 = II
L- 01- 87 -10 -50 -100	R&G Salmonellen	Sal 23S 331	23S rRNA		
L- 01- 88 -10 -50 -100	R&G Salmonellen 331 Komp	Komp Sal 23S 331	23S rRNA		
L- 01- 89 -10 -50 -100	R&G Salmonellen	Sal 23S 1705	23S rRNA		

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Organismo diana	Nombre de la baliza	RNA	Posición en rRNA (Ecoli)	Puntuación de fuch I = alta; VI = sin señal / señal baja
L- 01- 90 -10 -50 -100	R&G Salmonellen	Sal 23S 1705 Komp	23S rRNA		
L- 01- 91 -10 -50 -100	R&G Salmonellen	Sal 23S 544	23S rRNA		
L- 01- 92 -10 -50 -100	R&G Salmonella	B-Sal 1686	23S rRNA	1705 - 1686	1696-1713 = I; 1678-1695 = III
L- 01- 93 -10 -50 -100	R&G Serratia spp				
L- 01- 94 -10 -50 -100	R&G Serratia marcescens	B-Sermarc	16S rRNA	637 - 656	639-656 = VI
L- 01- 95 -10 -50 -100	R&G Staphylococcus aureus	B-Staphau	16S rRNA	75 - 52;	55-72 = III

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Organismo diana	Nombre de la baliza	rRNA	Posición en rRNA (Ecoli)	Puntuación de fuch I=alta, VI= sin señal / señal baja
L- 01- 96 -10 -50 -100	R&G Staphylococci	B-Staphspp-2	16S rRNA	769 - 751	756-773 = IV
L- 01- 97 -10 -50 -100	R&G Stenotrophomonas maltophilia	Stema-2	16S rRNA	592 - 612	614-631= IV
L- 01- 98 -10 -50 -100	R&G Streptococcus agalactiae	B-Straga-2	16S rRNA	416 - 396	396-412 = IV
L- 01- 99 -10 -50 -100	R&G Streptococci	B-Strept-2	16S rRNA	459 - 439	440 - 456 = I
L- 01- 100 -10 -50 -100	R&G Streptococcus pneumoniae	B-Strepne-2	16S rRNA	202 - 178	181-198 = II

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Organismo diana	Nombre de la baliza	RNA	Posición en rRNA (Ecoli)	Puntuación de fuch 1=alta, Vi = sin señal / señal baja
L- 01- 101 -10 -50 -100	R&G Streptococcus pyogenes	B-Strpyo-C	16S rRNA	196 - 217	199-215 = II
L- 01- 102 -10 -50 -100	R&G Ureaplasma urealyticum	Ureure			
L- 01- 103 -10 -50 -100	R&G Urogenital-Peptostreptococci	Pepure			
L- 01- 104 -10 -50 -100	R&G Yersinia enterocolitica	Yerent			

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	SEQ.ID. NO:	Secuencia 5'-3'	Longitud	Contenido AT	Contenido GC	Diana delta Gs: -21+/-2 kcal/mol
L- 01- 1 -10 Baliza	1	TGCCGGATT ACC ATC CTC TCC CAT	21	11	10	48% $\Delta G = -21.9$
-50 Sonda	2	ACTCTA AATCCCGCA	39			54% $\Delta G = -0.48$
-100 Diana	3	ACC ATC CTC TCC CAT ACT CTA				
L- 01- 2 -10 Baliza	4	TAG AGT ATG GGA GAG GAT GGT	20	9	11	55% $\Delta G = -22.1$
-50 Sonda	5	CGCGC TC CGG TAG CAA GCT ACC TTC	30	9	21	70% $\Delta G = -0.94$
-100 Diana	6	TC CGG TAG CAA GCT ACC TTC				
L- 01- 3 -10		GAA GGT AGC TTG CTA CCG GA				
-50						
-100						
L- 01- 4 -10						
-50						
-100						
L- 01- 5 -10 Baliza	7	CCGCCGGCGT AC AGA GTT CGT GGT	20	9	11	55% $\Delta G = -21.5$
-50 Sonda	8	GTC TCC TCGCCAGCGG	41	12	29	71% $\Delta G = -0.18$
-100 Diana	9	AC AGA GTT CGT GGT GTC TCC				
L- 01- 6 -10 Baliza	10	GGA GAC ACC ACG AAC TCT GT	18	7	11	61% $\Delta G = -20.6$
-50 Sonda	11	cgtc gcc tac aga gca ggt gac g	23	8	15	65% $\Delta G = -0.86$
-100 Diana	12	gcc tac aga gca ggt gac				
L- 01- 7 -10 Baliza	13	gtc acc tac tct gta ggc	25	10	9	36% $\Delta G = -21.4$
-50 Sonda	14	ctctga a cgt att gca ttc aat caa ctc agag	32	19	13	41% $\Delta G = -0.18$
-100 Diana	15	a cgt att gca ttc aat caa ctc aga				
		tct gag ttg att gaa tgc aat cag t				

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	SEQ.ID. NO:	Secuencia 5'-3'	Longitud AT	Contenido GC	Diana delta Gs: kcal/mol
L- 01- 8 -10	16	TCCGTC tga tgg caa aga atc aca ctc aga GACGGA	24	15	38% $\Delta G = -20.9$
-50	17	tga tgg caa aga atc aca ctc aga	36	19	47% $\Delta G = -0.63$
-100	18	tct gag tgt gat tct tgg caa tca			
L- 01- 9 -10	19	GCCGCCGGCAT CCA ATG TGG GGG ACC TTC TAGCCAGCGC	17	6	59% $\Delta G = -20.1$
-50	20	CCA ATG TGG GGG ACC TTC	39		74% $\Delta G = -0.70$
-100	21	GAA GGT CCC CCA CAT TGG			
L- 01- 10 -10	22	TGCCGGATT CA TGC TTA AGA CGC ACT GCC_AATCCGGCA	20	9	50% $\Delta G = -20.9$
-50	23	CA TGC TTA AGA CGC ACT GCC	39		56% $\Delta G = -0.59$
-100	24	GGC AGT GCG TCT TAA GCA TG			
L- 01- 11 -10	25	TGCCGGATT CAG CAC TCT GCA AAG ACG AAA AATCCGGCA	21	11	48% $\Delta G = -20.5$
-50	26	CAG CAC TCT GCA AAG ACG AAA	40		53% $\Delta G = -0.48$
-100	27	TTT CGT CTT TGC AGA GTG CTG			
L- 01- 12 -10	28	ACCGCTC TTT CTT TCC GGA CAA AAG TGC TTT GAGCGCT	24	15	38% $\Delta G = -20.9$
-50	29	TTT CTT TCC GGA CAA AAG TGC TTT	39		51% $\Delta G = -0.92$
-100	30	AAA GCA CTT TTG TCC GGA AAG AAA			
L- 01- 13 -10	31	CGCCTTC AGA ACC AAG GAT TTC TTT CCG G GAAGCG	22	12	45% $\Delta G = -20.5$
-50	32	AGA ACC AAG GAT TTC TTT CCG G			$\Delta G = -1.07$
-100	33	CCG GAA AGA AAT CCT TGG TTC T	36		56%

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	SEQ.ID. NO:	Secuencia 5'3'	Longitud	Contenido AT	Contenido GC	Diana delta Gs: -21 +/- 2 kcal/mol
L- Baliza	34	ACGCA AGAGCCAAAGGTTTCTTCCG CTTGCGT	21	11	10	48% ΔG = -20.2
Secuencia de la sonda	35	AGA GCC AAG GTT TTC TTT CCG	34			50% ΔG = -1.05
Diana	36	CGG AAA GAA AAC CTT GGC TCT				
L- 01- 14 -10 Baliza	37	ACGCTC G TCA TCC CCG GGC CAT GAGCGT	16	5	11	69% ΔG = -20.1
Secuencia de la sonda	38	G TCA TCC CCG GGC CAT	28			68% ΔG = -1.00
Diana	39	ATG GCC GGG GGA TGA C				
L- 01- 15 -10 Baliza	40	CGCTC CGT CAT CCC CCG GCT ATA GGAGCG	18	7	11	61% ΔG = -20.6
Secuencia de la sonda	41	CGT CAT CCC CCG GCT ATA	29			69% ΔG = -0.43
Diana	42	TAT AGC CCG GGG ATG ACG				
L- 01- 16 -10 Baliza	43	CCGCTC GT CAT CCC CCG GCT GTA GAGCGG	17	6	11	65% ΔG = -20.5
Secuencia de la sonda	44	GT CAT CCC CCG GCT GTA	29			72% ΔG = -0.43
Diana	45	TAC AGC CCG GGG ATG AC				
L- 01- 17 -10 Baliza	46	GCCGCCGCGT CGT CAT CCC CCG ATC GTA TCGCCAGCGG	18	7	11	61% ΔG = -20.0
Secuencia de la sonda	47	CGT CAT CCC CCG ATC GTA	41			73% ΔG = -1.11
Diana	48	TAC GAT CCG GGG ATG ACG				

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	SEQ.ID. NO:	Secuencia 5'-3'		Longitud AT	Contenido GC	Diana delta Gs kcal/mol
L- 01- 18 -10	49	GC CGC GCG CGT CGT CAT CCC CCG ACT GTT TCG CCC AGC GCG	Sonda/diana Híbrido Baliza	18	7	61% $\Delta G = -20.3$
	50	CGT CAT CCC CCG ACT GTA		41		76% $\Delta G = -1.11$
	51	TAC AGT CCG GGG ATG ACG				
L- 01- 19 -10	52	GCC CTA AGC GTC CTT CCA				
	53	ACG CTC GAA GTG TAA GCA ACT AAA T GAG CGT	Sonda/diana Híbrido Baliza	19	13	32% -14
	54	GAA GTG TAA GCA ACT AAA T		31		45% -0.78
	55	A TTT AGT TGC TTA CAC TTC				
L- 01- 21 -10	56	ACG CTC AGC TAA CCA CTT ATA CCG GAG CGT	Sonda/diana Híbrido Baliza	18	10	44% -17.3
	57	AGC TAA CCA CTT ATA CCG		30		53% -0.67
	58	CGG TAT AAG TGG TTA GCT				
L- 01- 22 -10	59	CCG CTC CGT GIG TCG CCC TAG GCG TTA GAG CCG	Sonda/diana Híbrido Baliza	20	7	65% -25.4
	60	CGT GTG TCG CCC TAG GCG TA		32		72% -0.84
	61	TA CGC CTA GGG CGA CAC ACG				
L- 01- 23 -10	62	CCG CTC TCG ATG GCA TCA GGG GTT GAG CCG	Sonda/diana Híbrido Baliza	18	8	56% -20.7
	63	TCG ATG GCA TCA GGG GTT		30		67% -0.82
	64	AAC CCC TGA TGC CAT CGA				
L- 01- 24 -10	65	No requerido, competidor no etiquetado	Sonda/diana Híbrido Baliza	18	7	61% -22.0
	66	TCG ACG GCA TCA GGG GTT				
	67	AAC CCC TGA TGC CGT CGA				
L- 01- 25 -10	68	ACG CCG GCGT TAG CTG ATA TCA CAT AGA TCG CCC AGC GTT	Sonda/diana Híbrido Baliza	18	12	33% -14.4
	69	TAG CTG ATA TCA CAT AGA		39		59% -0.06
	70	TCT ATG TGA TAT CAG CTA				

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	SEQ.ID. NO:	Secuencia 5'3'		Longitud AT	Contenido GC	Diana delta G _{sc} -21±2 kcal/mol
L- 01- 26 -10	71	TCCGCCGGCGT CTT TCC GCC TAC ACG CCC TCGCCAGCGGA	Sonda/diana Híbrido Baliza	18	6	67% -22.0
-50	72	CTT TCC GCC TAC ACG CCC		41		73% -1.22
-100	73	GGG CGT GTA GGC GGA AAG				
L- 01- 27 -10	74	TCCGCCGGCGT CCG CCG TAT TAC CGC AGC TCGCCAGCGGA	Sonda/diana Híbrido Baliza	18	7	61% -20.5
-50	75	CCT CCG TAT TAC CGC AGC		41		71% -1.22
-100	76	GCT GCG GTA ATA CGG AGG				
L- 01- 28 -10	77	ACGCCGGCGT CTA ACT TTC CTT TCC GCC TCGCCAGCGT	Sonda/diana Híbrido Baliza	18	9	50% -17.3
-50	78	CTA ACT TTC CTT TCC GCC		39		64% -0.06
-100	79	GGC GGA AAG GAA AGT TAG				
L- 01- 29 -10	80	TCCACCGGCGT CTA CTC CTC AAC CGA AAG TCGCCAGTGA	Sonda/diana Híbrido Baliza	18	9	50% -16.4
-50	81	CTC TTC CTC AAC CGA AAG		41		61%
-100	82	CTT TCG GTT GAG GAA GAG				
L- 01- 30 -10	83	TCAGCCGGCGT AAG GCA AAA CCA ACT CCC TCGCCAGCTGA	Sonda/diana Híbrido Baliza	18	9	50% -18.8
-50	84	AAG GCA AAA CCA ACT CCC		41		61% -0.02
-100	85	GGG AGT TGG TTT TGC CTT				
L- 01- 31 -10	86	CCGCCGGCGT TCC GTT TTC TCC GCC TAC TCGCCAGCGG	Sonda/diana Híbrido Baliza	18	8	50% -19.7
-50	87	TCC GTT TTC TCC GCC TAC		39		69% -0.40
-100	88	GTA GGC GGA GAA AAC GGA				
L- 01- 32 -10	89	TCGCCGGCGT GCT CCC CTT GCT TTC GCC TCGCCAGCGGA	Sonda/diana Híbrido Baliza	18	6	61% -21.7
-50	90	GCT CCC CTT GCT TTC GCG		42		69% -1.22
-100	91	CGC GAA AGC AAG GGG AGC				
L- 01- 33 -10	92	ACGCTC TCG GAT GCC CAA ATA TCG GAGCGT	Sonda/diana Híbrido Baliza	18	9	50% -18.4
-50	93	TCG GAT GCC CAA ATA TCG		30		57% -0.44
-100	94	CGA TAT TTG GGC ATC CGA				

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	SEQ.ID. NO:	Secuencia 5'-3'	Sonda/diana Híbrido Baliza	Longitud AT	Contenido GC	Diana delta Gs -21+/-2 kcal/mol
L- 01- 34 -10	95	GG aa tgg cta ccc aga agg aaa CCATTCC	Sonda/diana Híbrido Baliza	20	11	9
-50	96	aa tgg cta ccc aga agg aaa		29		15
-100	97	ttt cct tct ggg tag cca tt				
L- 01- 35 -10	98	CCGCTC tgt att agc tct aga ttt cca cgg GAGCGG	Sonda/diana Híbrido Baliza	24	15	9
-50	99	tgt att agc tct aga ttt cca cgg		36		19
-100	100	cgg tgg aaa tct aga gct aat aca				
L- 01- 36 -10	101	GTTTGcc ccg aaa gag taa ctt gca GGCAAAC	Sonda/diana Híbrido Baliza	20	10	10
-50	102	cc ccg aaa gag taa ctt gca		32		16
-100	103	tgc aag tta ctc ttt cgg gg				
L- 01- 37 -10	104	GCGCCGGCGT gg cca ccc agg ccc aaa TCGCCAGCGGC	Sonda/diana Híbrido Baliza	17	5	12
-50	105	gg cca ccc agg ccc aaa		40		32
-100	106	ttt ggg cct ggg tgg cc				
L- 01- 38 -10	107	GCGCCGGCGT gc caa aaa ggc tag cca gaa TCGCCAGCGGC	Sonda/diana Híbrido Baliza	20	10	10
-50	108	gc caa aaa ggc tag cca gaa		43		30
-100	109	ttc tgg cta gcc ttt ttg gc				

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	SEQ.ID. NO:	Secuencia 5'-3'	Longitud AT	Contenido GC	Diana delta Gs -21 +/- 2 kcal/mol
L- 01- 39 -10	110	ACGC gct tgg ctg gcc ggt c GCGT	16	4	75% ΔG = -21.1
-50	111	g acc ggc cag cca agc	24	18	75% ΔG = -0.90
-100	112	gct tgg ctg gcc ggt c			
L- 01- 40 -10	113	ACGCCGGCGT tac gca tca gaa aga tgg acc TCGCCAGCGGT	21	11	48% ΔG = -20.7
-50	114	tac gca tca gaa aga tgg acc	44	28	64% ΔG = -1.03
-100	115	GGT CCA TCT TTC TGA TGC GTA			
L- 01- 41 -10					
-50					
-100					
L- 01- 42 -10	116	TGCCGGATT C TAC TTG TTA GGT GAC TGC GT AATCCCGCA	21	10	48% ΔG = -20.4
-50	117	C TAC TTG TTA GGT GAC TGC GT	40		53% ΔG = -0.48
-100	118	AC GCA GTC ACC TAA CAA GTA G			
L- 01- 43 -10	119	TCTTG TAG T GC CGT TTC ATG CGA AAC TAC AA GA	22	12	45% ΔG = -20.7
-50	120	GC CGT TTC ATG CGA AAC TAC AA	33		42% ΔG = -0.79
-100	121	TT GTA GTT TCG CAT GAA ACG GC			
L- 01- 44 -10	122	GCCGCCGGCGT CGAAG TAA ATC GCT CAA CTT GCA TCGCCAGCGGC	23	13	43% ΔG = -20.8
-50	123	CGA AGT AAA TCG CTC AAC TTG CA	46	30	65% ΔG = -1.33
-100	124	TGC AAG TTG AGC GAT TTA CTT CG			

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	SEQ.ID. NO:	Secuencia 5'-3'	Longitud AT	Contenido GC	Diana delta Gs -21 +/- 2 kcal/mol
L- 01- 45 -10	125	CGCTCA CAC CCG TCC GCC GCT AAT GAGCG	18	6	67% $\Delta G = -22.0$
-50	126	CAC CCG TCC GCC GCT AAT	29		69% $\Delta G = -0.39$
-100	127	ATT AGC GGC GGA CCG GTG			
L- 01- 46 -10	128	GCCGCCGCGT GATT GCT CCT TTG GTT GAA TGA TG TCGCCAGCGGC	21	11	48% $\Delta G = -20.9$
-50	129	G ATT GCT CCT TTG GTT GAA TGA TG	44		68% $\Delta G = -1.22$
-100	130	CA TCA TTC AAC CAA AGG AGC AAT C			
L- 01- 47 -10	131	ACGCTC GGT TGA ATG ATG ATG CCA I GAGCGT	19	10	42% $\Delta G = -21.2$
-50	132	GGT TGA ATG ATG CCA TCT TT			
-100	133	AA AGA TGG CAT CAT TCA ACC	31		52% $\Delta G = -0.16$
L- 01- 48 -10	134	GCGGAC CT GTG TTA CTC ACC CGT CCG C	20	8	42% $\Delta G = -21.6$
-50	135	CT GTG TTA CTC ACC CGT CCG			
-100	136	CGG ACG GGT GAG TAA CAC AG	27	18	52% $\Delta G = -1.15$
L- 01- 49 -10					
-50					
-100					
L- 01- 50 -10	137	TGCCGGATT TT CGT GTT TGC ACA GTG CTGT AATCCCGCA	21	11	48% $\Delta G = -21.1$
-50	138	TT CGT GTT TGC ACA GTG CTG T	40		53% $\Delta G = -0.48$
-100	139	A CAG CAC TGT GCA AAC ACG AA			
L- 01- 51 -10	140	TGCCGGATT TCT CGC GAG GTC GCT TCT TCT AATCCCGCA	18	7	61% $\Delta G = -21.0$
-50	141	TCT CGC GAG GTC GCT TCT			
-100	142	AGA AGC GAC CTC GCG AGA			$\Delta G = -0.80$

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	SEQ.ID. NO:	Secuencia 5'-3'	Longitud	Contenido AT	Contenido GC	Diana delta Gs -21 +/- 2 kcal/mol
L- 01- 52 -10	143	TGCCGGATT CCC CCW CTT TGG TCT TGC GA AATCCCGGCA	20	8	12	60% $\Delta G = -20.4$
-50	144	CCC CCW CTT TGG TCT TGC GA				
-100	145	TC GCA AGA CCA AAG WGG GGG	39			59% $\Delta G = -0.59$
L- 01- 53 -10	146	TGCCGGATT ATC CAT CAG CGA CAC CCG AATCCCGGCA	18	7	11	61% $\Delta G = -20.5$
-50	147	ATC CAT CAG CGA CAC CCG				
-100	148	CGG GTG TCG CTG ATG GAT	38			58% $\Delta G = -0.80$
L- 01- 54 -10	149	TGCCGGATT CCC TCT GAT GGG TAG GTT AATCCCGGCA	18	8	10	58% $\Delta G = -19.2$
-50	150	CCC TCT GAT GGG TAG GTT				
-100	151	AAC CTA CCC ATC AGA GGG	37			57% $\Delta G = -0.80$
L- 01- 55 -10	152	GCCGCCGGCGT TTC AAA TCA AAA CCA TGC GGT TTC TCGCCCGGCGC	24	15	9	38% $\Delta G = -20.0$
-50	153	TTC AAA TCA AAA CCA TGC GGT TTC				
-100	154	GAA ACC GCA TGG TTT TGA TTT GAA	47			62% $\Delta G = -9.42$
L- 01- 56 -10	155	TGCCGGATT GGA AGA AGC TTG CTT CTT TGC AATCCCGGCA	21	11	10	48% $\Delta G = -20.3$
-50	156	GGA AGA AGC TTG CTT CTT TGC				
-100	157	GCA AAG AAG CAA GCT TCT TCC	40			53% $\Delta G = -1.80$
L- 01- 57 -10	158	CGCTC GCT GCC TCC CGT AGG AGT GAGCG	18	6	12	67% $\Delta G = -23.5$
-50	159	GCT GCC TCC CGT AGG AGT				
-100	160	ACT CCT ACG GGA GGC AGC	28			71% $\Delta G = -0.94$

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	SEQ.ID. NO:	Secuencia 5'3'	Longitud AT	Contenido AT	Contenido GC	Diana delta Gs -21±/-2 kcal/mol
L- 01- 58 -10 -50 -100						
L- 01- 59 -10 -50 -100	161 162 163	ACGCTC CAC CAT GAA GCA ACC CGT GAGCGT CAC CAT GAA GCA ACC CGT ACG GGT TGC TTC ATG GTG	18 30	8	10	56% ΔG = -19.5 60% -0.50
L- 01- 60 -10 -50 -100	164 165 166	ACCGGCTA TT CCG ATA ATA CGC GGT ATLAGC GGGT TT CCG ATA ATA CGC GGT ATT AGC GCT AAT ACC GCG TAT TAT CGG AA	23 35	13	10	43% ΔG = -21.4 51% ΔG = -1.18
L- 01- 61 -10 -50 -100	167 168 169	CGGTGCTC TA ATA CGC GGT ATT AGC GAC AG AGAGCACCG TA ATA CGC GGT ATT AGC GAC AG CT GTC GCT AAT ACC GCG TAT AT	22 39	12	10	45% ΔG = -20.3 56% ΔG = -1.76
L- 01- 62 -10 -50 -100	170 171 172	ACGCCGGCGT AGG TTA TTA ACC TCA TCG CCT TCGCCAGCGT AGG TTA TTA ACC TCA TCG CCT AGG CGA TGA GGT TAA TAA CCT	21 40	12	9	43% ΔG = -19.8 63% ΔG = -0.92
L- 01- 63 -10 -50 -100	173 174 175	GGAAGGGATAT AGG TTA TTA ACC TCA CTC CCT TCC AGG TTA TTA ACC TCA CTC CCT TCC GGA AGG GAG TGA GGT TAA TAA CCT	24 35	13	11 16	46% ΔG = -20.7 46% ΔG = -1.02

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	SEQ.ID. NO:	Secuencia 5'-3'		Longitud	Contenido AT	Contenido GC	Diana delta Gs -21+/-2 kcal/mol
L- 01- 64 -10	176	CGC TCAT TCA ACG GAA GCT CGT TCG ATGAGCG	Sonda/diana Híbrido	22	11	11	50% ΔG = -21.5
-50	177	TCAT TCA ACG GAA GCT CGT TCG					
-100	178	CGAAC GAGCTTCCGT TGAATGA	Baliza	31			48% ΔG = -0.95
L- 01- 65 -10					0		
-50							
-100							
L- 01- 66 -10					0		
-50							
-100							
L- 01- 67 -10					0		
-50							
-100							
L- 01- 68 -10					0		
-50							
-100							
L- 01- 69 -10					0		
-50							
-100							
L- 01- 70 -10					0		
-50							
-100							
L- 01- 71 -10					0		
-50							
-100							
L- 01- 72 -10					0		
-50							
-100							
L- 01- 73 -10					0		
-50							
-100							

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	SEQ.ID. NO:	Secuencia 5'3'		Longitud AT	Contenido GC	Diana delta Gs -21 +/- 2 kcal/mol
L- 01- 74 -10 -50 -100				0		
L- 01- 75 -10 -50 -100				0		
L- 01- 76 -10 -50 -100	179 180 181	TGCCGGATT ATC TGA CCG TCC CAG GTT AATCCGGCA ATC TGA CCG TCC CAG GTT AAC CTG GGA CCG TCA GAT	Sonda/diana Híbrido Baliza	18 37	8 10	56% ΔG = -19.9 57% ΔG = -0.80
L- 01- 77 -10 -50 -100	182 183 184	ACGCTC ATA AGA TGT GGC GCA TGC GAGCGT ATA AGA TGT GGC GCA TGC GCA TGC GCC ACA TCT TAT	Sonda/diana Híbrido Baliza	18 30	9	50% -19.3 57% -0.84
L- 01- 78 -10 -50 -100	185 186	Por determinar ATT GCT AAC CTC GCT CGA TCG AGC GAG GTT AGC AAT		0		-19.0 -0.40
L- 01- 79				0		
L- 01- 80 -10 -50 -100	187 188 189	GGC GTC ACA CCG G AT ACG TAGTGCTACGCC GGC GTC ACA CCG G AT ACG CCGT ATC CCG TGT GAC GCC	Sonda/diana Híbrido Baliza	18 30	6 12	67% ΔG = -20.8 63% ΔG = -0.84
L- 01- 81 -10 -50 -100	190 191 192	ACTC GGC TTC ATG CCA ACA GTC GAGT GGC TTC ATG CCA ACA GTC GAC TGT TGG CAT GAA GCC	Sonda/diana Híbrido Baliza	21 25	11 10	57% -20.2 56% -0.45

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	SEQ.ID. NO:	Secuencia 5'-3'		Longitud AT	Contenido	Contenido GC	Diana delta Gs kcal/mol
L- 01- 82 -10	Baliza	193	GACAC CAT AAG ATG CCG AGC GAG GTGTC	18	8	10	58% -19.2
-50	Sonda	194	CAT AAG ATG CCG AGC GAG	28			57% -0.11
-100	Diana	195	CTC GCT CGG CAT CTT ATG		0		
L- 01- 83							
L- 01- 84					0		
L- 01- 85 -10	Baliza	196	ACCGCCGGCGT AAGA CGA CTC GTC ATCACC I TCGCCAGCGGT	20	10	10	50% ΔG = -20.3
-50	Secuencia de la sonda	197	A AGA CGA CTC GTC ATC ACC T	42			67% ΔG = -1.13
-100	Diana	198	A GGT GAT GAC GAGTCG TCT T				
L- 01- 86 -10	Baliza	199	GCGCCGGCGT GGC AGA TTC CTA GGCATT ACT TCGCCAGCGGC	21	11	10	48% ΔG = -21.2
-50	Secuencia de la sonda	200	GGC AGA TTC CTA GGC ATT ACT				
-100	Diana	201	AGT AAT GCC TAG GAA TCT GCC	44		30	68% ΔG = -1.65
L- 01- 87 -10	Baliza	202	AGCTC TGC GCT TTT GTG TAC GGG GCI GAGCT	21	10	11	57% -25.3
-50	Sonda	203	TGC GCT TTT GTG TAC GGG GCT	31			58% -0.34
-100	Diana	204	AGC CCC GTA CAC AAA AGC GCA				
L- 01- 88 -10	Baliza		No requerido, competidor no etiquetado	18	7	11	61% -18.8
-50	Sonda	205	G TGCA TTT GTG TAC GGG GC				
-100	Diana	206	AGC CCC GTA CAC AAA AGC GCA				
L- 01- 89 -10	Baliza	207	CGCTC CTT CAC CTA CGT GTC AGC G GAGCG	19	8	11	58% -21.1
-50	Sonda	208	CTT CAC CTA CGT GTC AGC G	29			66% -0.78
-100	Diana	209	C GCT GAC ACG TAG GTG AAG				

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	SEQ.ID. NO:	Secuencia 5'-3'		Longitud AT	Contenido GC	Diana delta Gs kcal/mol
L- 01- 90 -10	Baliza	No requerido, competidor no etiquetado	Sonda/diana Híbrido	20	10	50% $\Delta G = -9.6$
-50	Sonda Diana	T CAC CTA CAT ATC AGC GTG C	Baliza			-0.26
-100		C GCT GAC ACG TAG GTG AAG A				
L- 01- 91 -10	Baliza	?	Sonda/diana Híbrido	18	9	50%
-50	Sonda Diana	GTT TAC CTG TGT GAC TGC	Baliza			
-100		0				
L- 01- 92 -10	Baliza	TGCCGGATT CTT CAC CTA CGT GTC	Sonda/diana Híbrido	19	11	58% $\Delta G = -21.1$
-50	Secuencia de la sonda	AGC G AATCCCGCA				
-100	Diana	CTT CAC CTA CGT GTC AGC G	Baliza	38		58% $\Delta G = -0.69$
L- 01- 93 -10		C GCT GAC ACG TAG GTG AAG				
-50				0		
-100						
L- 01- 94 -10	Baliza	GCCGCCGGCGT CG AGA CTC TAG CTT	Sonda/diana Híbrido	20	11	55% $\Delta G = -21.8$
-50	Secuencia de la sonda	GCC AGT TCGCCAGCGGC				
-100	Diana	CG AGA CTC TAG CTT GCC AGT	Baliza	43		72% $\Delta G = -1.76$
L- 01- 95 -10	Baliza	ACT GGC AAG CTA GAG TCT CG	Sonda/diana Híbrido	24	14	58% $\Delta G = -20.7$
-50	Secuencia de la sonda	TGCCGGATT TTC TCG TCC GTT CGC				
-100	Diana	TCG ACT TGC AATCCCGCA	Baliza	43		58% $\Delta G = -0.22$
		TTC TCG TCC GTT CGC TCG ACT TGC				
		GCA AGT CGA GCG AAC GGA CGA GAA				

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	SEQ.ID. NO:	Secuencia 5'-3'	Longitud	Contenido AT	Contenido GC	Diana delta Gs -21 +/- 2 kcal/mol
L- 01- 96 -10	222	GCAAC TT TCG CAC ATC AGC GTC AGT T GC	21	11	10	48% $\Delta G = -20.9$
-50	223	TT TCG CAC ATC AGC GTC AGT T				
-100	224	A ACT GAC GCT GAT GTG CGA AA	28			54% $\Delta G = -0.84$
L- 01- 97 -10	225	CCC TCT ACC ACA CTC TAG TCG GGT AGA GGG	21	9	12	52% $\Delta G = -21.2$
-50	226	CCC TCT ACC ACA CTC TAG TCG				
-100	227	CGA CTA GAG TGT GGT AGA GGG	30			57% $\Delta G = -1.63$
L- 01- 98 -10	228	GCCGCCGCGT ACT CCT ACC AAC GTT CTT CTC	21	10	11	48% $\Delta G = -20.5$
-50	229	ACT CCT ACC AAC GTT CTT CTC				
-100	230	GAG AAG AAC GTT GGT AGG AGT	45			67% $\Delta G = -0.79$
L- 01- 99 -10	231	GGCCTTC GCC GTC CCT TTC TGG TTA GTT GAAGGCC	21	10	11	52% $\Delta G = -22.3$
-50	232	GCC GTC CCT TTC TGG TTA GTT				
-100	233	AAC TAA CCA GAA AGG GAC GGC	35			60% $\Delta G = -1.15$
L- 01- 100 -10	234	GCGT TAA GCA AAT GTC ATG CAA CAT CTA CTTAAGC	25	17	8	32% $\Delta G = -20.4$
-50	235	T TAA GCA AAT GTC ATG CAA CAT CTA				
-100	236	TAG ATG TTG CAT GAC ATT TGC TTA A	38			39% $\Delta G = -0.64$

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	SEQ.ID. NO:	Secuencia 5'-3'	Sonda/diana	Longitud AT	Contenido GC	Diana delta Gs -21+/-2 kcal/mol
L- 01- 101 -10	237	TGCCTTC GAG CAA TTG CCC CTT TTA AAT TAC GAAGGCA	Sonda/diana Híbrido	24	15	38% $\Delta G = -20.0$
-50	238	GAG CAA TTG CCC CTT TTA AAT TAC				
-100	239	GTA ATT TAA AAG GGG CAA TTG CTC	Baliza	38		45% $\Delta G = -1.01$
L- 01- 102 -10	240	ACGCTC GTT CCC CAA CTC CCT ACT GAGCGT	Sonda/diana Híbrido	18	8	56% -20.2
-50	241	GTT CCC CAA CTC CCT ACT	Baliza	30		60% -0.78
-100	242	AGT AGG GAG TTG GGG AAC				
L- 01- 103 -10	243	ACTC CCC CTT GTG TAA GGC AGG GAGI	Sonda/diana Híbrido	24	13	54% -21.4
-50	244	CCC CTT GTG TAA GGC AGG	Baliza	28		54% -0.61
-100	245	CCT GCC TTA CAC AAG GGG				
L- 01- 104 -10	246	ACGCTC CCC ACT TTG GTC CGA AGA GAGCGT	Sonda/diana Híbrido	18	8	56% -19.6
-50	247	CCC ACT TTG GTC CGA AGA	Baliza	30		60% -0.68
-100	248	TCT TCG GAC CAA AGT GGG				

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Tm diana: 71±3 °C	Td (Suggs et al) 48-60	Resultados Blast RNA	Resultados directos emparejamiento sonda I (16S solamente)	Resultados directos emparejamiento sonda II (16S solamente)	Resultados directos emparejamiento sonda III (16S solamente)
L- 01- 1 -10 -50 -100	71.6 65.9	62		41 Acinetobacter (651/1392)	Moraxellaceae (665/2066)	No clasificado Moraxellaceae (6/31)
L- 01- 2 -10 -50 -100	72.2 69.8	62	Acinetobacter_baumannii_X81667	Moraxellaceae (23/2142)		
L- 01- 3 -10 -50 -100						
L- 01- 4 -10 -50 -100						
L- 01- 5 -10 -50 -100	70.8 63.3	62				
L- 01- 6 -10 -50 -100	70.0 67.8	58				
L- 01- 7 -10 -50 -100	69.4 63.1	68				

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Tm diana: 71+/- 3 oC	Td (Suggs et al) 48- 60	Resultados Blast RNA	Resultados directos emparejamiento sonda I (16S solamente)	Resultados directos emparejamiento sonda II (16S solamente)	Resultados directos emparejamiento sonda III (16S solamente)
L- 01- 8 -10 -50 -100	68.9 66.6	56				
L- 01- 9 -10 -50 -100	68.6 68.0	56				
L- 01- 10 -10 -50 -100	70.2 66.7	62	34 B burgdorferi / 100 Borrelia	89 B burgdorferi / 245 Borrelia		
L- 01- 11 -10 -50 -100	69.8 65.9	62	B. pertussis, Parapertussis, B. bronchiseptica, Bordetella avium	0	0	0
L- 01- 12 -10 -50 -100	69.6 68.0	66		Burkholderiaceae (1867/2900)		
L- 01- 13 -10 -50 -100	69.0 69.0	64		Burkholderiaceae (78/2900)		

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Tm diana: 71±3 oC	Td (Suggs et al) 48- 60	Resultados Blast RNA	Resultados directos emparejamiento sonda I (16S solamente)	Resultados directos emparejamiento sonda II (16S solamente)	Resultados directos emparejamiento sonda III (16S solamente)
L-	68.8 69.0	62		Burkholderiaceae (3/2900)		
L- 01- 14	-10 -50 -100	54		Burkholderiaceae (23/2900)		
L- 01- 15	-10 -50 -100	58		Burkholderiaceae, B pyroclinea		
L- 01- 16	-10 -50 -100	56		Burkholderiaceae (23/2900)		
L- 01- 17	-10 -50 -100	58		Burkholderiaceae (1/2900)		

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	T _m diana: 71±3 °C	T _d (Suggs et al) 48-60	Resultados Blast RNA	Resultados directos emparejamiento sonda I (16S solamente)	Resultados directos emparejamiento sonda II (16S solamente)	Resultados directos emparejamiento sonda III (16S solamente)
L- 01- 18 -10	69,6	58		Burkholderiaceae (143/2900)		
	67,1					
L- 01- 19 -10 -50 -100		0				
L- 01- 20 -10 -50 -100	57 68,3 67,4	50 52				
L- 01- 21 -10 -50 -100	63,6 67,4 67,8	52 56				
L- 01- 22 -10 -50 -100	77,8 68,5 68,0	66 56				
L- 01- 23 -10 -50 -100	70,1 72,7 58	58				
L- 01- 24 -10 -50 -100	72,7 57,7 62,7	48				
L- 01- 25 -10 -50 -100	57,7 62,7					

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	T _m diana: 71±3 °C	T _d (Suggs et al) 48-60	Resultados Blast RNA	Resultados directos emparejamiento sonda I (16S solamente)	Resultados directos emparejamiento sonda II (16S solamente)	Resultados directos emparejamiento sonda III (16S solamente)
L- 01- 26 -10	72,6	60				
-50	67,8					
-100						
L- 01- 27 -10	69,8	58				
-50	67,8					
-100						
L- 01- 28 -10	63,6	54				
-50	62,7					
-100						
L- 01- 29 -10	61,9	54				
-50						
-100						
L- 01- 30 -10	67,3	54				
-50	62,5					
-100						
L- 01- 31 -10	68,2	56				
-50	64,3					
-100						
L- 01- 32 -10	72,2	60				
-50	67,6					
-100						
L- 01- 33 -10	65,8	54				
-50	65,7					
-100						

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Tm diana: 71±3 oC	Td (Suggs et al) 48- 60	Resultados Blast RNA	Resultados directos emparejamiento sonda I (16S solamente)	Resultados directos emparejamiento sonda II (16S solamente)	Resultados directos emparejamiento sonda III (16S solamente)
L- 01- 34 -10 -50 -100	68.3 66.2	58	26/26 @ 40			
L- 01- 35 -10 -50 -100	70.8 66.4	66	1/3 @ 48 Otras especies no clínicas			
L- 01- 36 -10 -50 -100	68.2* 65.9 C	60	7/7 @ 40			
L- 01- 37 -10 -50 -100	74.0 C 69.5 C	58	8/11 @ 34; 3 no clínica			
L- 01- 38 -10 -50 -100	70.2 C 69.9 C	60	17/24 @ 40; 3 C fennica; 1 C solomi; 1 C spp; 2 Genes eucariotas no cultivados			

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Tm diana: 71±/- 3 oC	Td (Suggs et al) 48- 60	Resultados Blast RNA	Resultados directos emparejamiento sonda I (16S solamente)	Resultados directos emparejamiento sonda II (16S solamente)	Resultados directos emparejamiento sonda III (16S solamente)
L- 01- 39 -10	71.5 C	56	51/55 @40			
-50	70.0 C					
-100						
L- 01- 40 -10	69.5°C	62	4/11 @42			
-50	66.9°C					
-100						
L- 01- 41 -10						
-50						
-100						
L- 01- 42 -10	69.0	64	Solo Citrobacter freundli y Pseudomonas aeruginosa @	0	0	0
-50	65.9		Puntuación completa			
-100						
L- 01- 43 -10	69.4	64				
-50	65.6					
-100						
L- 01- 44 -10	69.4	66	Solo C-diff @Puntuación completa	Clostridium_difficile_X73450	Clostridiaceae (18/8924)	
-50	68.0					
-100						

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Tm diana: 71±3 °C	Td (Suggs et al) 48- 60	Resultados Blast RNA	Resultados directos emparejamiento sonda I (16S solamente)	Resultados directos emparejamiento sonda II (16S solamente)	Resultados directos emparejamiento sonda III (16S solamente)
L- 01- 45 -10	73.1	60				
-50	65.2					
-100						
L- 01- 46 -10	69.1	62	Solo Clostridium perfringens con puntuación completa	Clostridiaceae (49/7851)		
-50	67.6					
-100						
L- 01- 47 -10	69.3	56	Solo Clostridium perfringens con puntuación completa	Clostridiaceae (49/7851)		
-50						
-100	63.6					
L- 01- 48 -10	71.3	64	Solo Clostridium tetani con puntuación completa	Clostridiaceae (1/8924)		
-50						
-100	70.9					
L- 01- 49 -10						
-50						
-100						
L- 01- 50 -10	70.2	62	92 Enterobacteriaceae	0	0	0
-50	65.9					
-100						
L- 01- 51 -10	70.7	58	101 Enterobacteriaceae	Enterobacteriaceae (1857/5527) Incluyendo Proteus (24/90); Providencia (17/35)		
-50						
-100	68.2					

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Tm diana: 71±/- 3 oC	Td (Suggs et al) 48- 60	Resultados BlastRNA	Resultados directos emparejamiento sonda I (16S solamente)	Resultados directos emparejamiento sonda II (16S solamente)	Resultados directos emparejamiento sonda III (16S solamente)
L- 01- 52 -10 -50 -100	69.7 66.7	84	101 Enterobacteriaceae	Enterobacteriaceae (2863/5527) sin Proteus&Providencia		
L- 01- 53 -10 -50 -100	69.5 68.2	58	18 Enterococci	genus Enterococcus (425/847)		
L- 01- 54 -10 -50 -100	67.7 68.2	56	only E. faecalis con puntuación completa	Enterococcus (193/803) Los otros 600 son mayoritariamente E. no faecalis no clasificados		
L- 01- 55 -10 -50 -100	67.7 64.0	66	5 faecium y 1 faecalis con puntuación completa	64/157 son faecium solo 1 faecalis	0	0
L- 01- 56 -10 -50 -100	68.8 67.2	62	18 E.coli & EHEC/39 el resto total es solo Haemophilus parvus, Mannheimia glucosida.		0	0
L- 01- 57 -10 -50 -100	75.1 67.7	60				

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Tm diana: 71+/- 3 oC	Td (Suggs et al) 48- 60	Resultados Blast RNA	Resultados directos emparejamiento sonda I (16S solamente)	Resultados directos emparejamiento sonda II (16S solamente)	Resultados directos emparejamiento sonda III (16S solamente)
L- 01- 58 -10 -50 -100						
L- 01- 59 -10 -50 -100	68 66.2 68.1	56				
L- 01- 60 -10 -50 -100	70.6 69.1	66	Haemophilus_influenzae_F_U32708	Pasteurellaceae (283/2293)		
L- 01- 61 -10 -50 -100	69.2 70.9	64	Haemophilus_influenzae_F_U32708	Pasteurellaceae (278/2293)		
L- 01- 62 -10 -50 -100	68.1 66.1	60	Klebsiella_pneumoniae_Y17656	Enterobacteriaceae (32/5830)		
L- 01- 63 -10 -50 -100	69.3 68.3	70	Klebsiella_oxyloca_Y17655	Enterobacteriaceae (20/8874)		

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Tm diana: 71+/- 3 oC	Td (Suggs et al) 48- 60	Resultados Blast RNA	Resultados directos emparejamiento sonda I (16S solamente)	Resultados directos emparejamiento sonda II (16S solamente)	Resultados directos emparejamiento sonda III (16S solamente)
L- 01- 64 -10 -50 -100 66.6	70.4	66	Lactobacillus_brevis_X61134	Lactobacillaceae (38/2674)		
L- 01- 65 -10 -50 -100		0				
L- 01- 66 -10 -50 -100		0				
L- 01- 67 -10 -50 -100		0				
L- 01- 68 -10 -50 -100		0				
L- 01- 69 -10 -50 -100		0				
L- 01- 70 -10 -50 -100		0				
L- 01- 71 -10 -50 -100		0				
L- 01- 72 -10 -50 -100		0				
L- 01- 73 -10 -50 -100		0				

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Tm diana: 71+/- 3 °C	Td (Suggs et al) 48-60	Resultados BlastRNA	Resultados directos emparejamiento sonda I (16S solamente)	Resultados directos emparejamiento sonda II (16S solamente)	Resultados directos emparejamiento sonda III (16S solamente)
L- 01- 74 -10 -50 -100		0				
L- 01- 75 -10 -50 -100		0				
L- 01- 76 -10 -50 -100	69.2 68.2	56	Solo Legionella con puntuación completa	78 Legionella only		
L- 01- 77 -10 -50 -100	67.5 67.3	54				
L- 01- 78 -10 -50 -100	67.1 64.3	0				
L- 01- 79		0				
L- 01- 80 -10 -50 -100	70.4 66.2	60	La secuencia 23S de Proteus no se encuentra en la base de datos; el resultado más próximo es E. coli con una puntuación de 28 (de 36)	0	0	0
L- 01- 81 -10 -50 -100	69 65.5	62				

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Tm diana: 71±/- 3 oC	Td (Suggs et al) 48- 60	Resultados Blast RNA	Resultados directos emparejamiento sonda I (16S solamente)	Resultados directos emparejamiento sonda II (16S solamente)	Resultados directos emparejamiento sonda III (16S solamente)
L- 01- 82 -10	67,5					
-50	63.2					
-100						
L- 01- 83		0				
L- 01- 84		0				
L- 01- 85 -10	69.1	60				
-50	67.4					
-100						
L- 01- 86 -10	70.5	62				
-50						
-100	69.4					
L- 01- 87 -10	77.6	64				
-50	64.1					
-100						
L- 01- 88 -10	66.4	58				
-50						
-100						
L- 01- 89 -10	70.8	60				
-50	68.0					
-100						

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Tm diana: 71±3 oC	Td (Suggs et al) 48-60	Resultados Blast RNA	Resultados directos emparejamiento sonda I (16S solamente)	Resultados directos emparejamiento sonda II (16S solamente)	Resultados directos emparejamiento sonda III (16S solamente)
L- 01- 90 -10 -50 -100	48 64.0	60				
L- 01- 91 -10 -50 -100		54				
L- 01- 92 -10 -50 -100	70.4	60	9 <i>Salmonella</i> , 1 <i>Y enterolytica</i> , ningún otro resultado	0	0	0
L- 01- 93 -10 -50 -100	67.4	0				
L- 01- 94 -10 -50 -100	71.6	62	<i>Serratia marcescens</i> _AF124042	opened, click to collapse genus <i>Serratia</i> (249/544) (hits/total searched)		
L- 01- 95 -10 -50 -100	69.9	76	12 <i>Staph aureus</i> w puntuación completa ningún otro	77 de 171 (<i>Staur</i> coge 78 / 269 y es por lo tanto menos específico)		

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Tm diana: 71 $\pm$ 3 oC	Td (Suggs et al) 48- 60	Resultados Blast RNA	Resultados directos emparejamiento sonda I (16S solamente)	Resultados directos emparejamiento sonda II (16S solamente)	Resultados directos emparejamiento sonda III (16S solamente)
L- 01- 96 -10 -50 -100	70.2 Tm = 66.4 $\pm$ 0.4°C	62		Staphylococcaceae (1230/2473)		
L- 01- 97 -10 -50 -100	70.5 70.8	66				
L- 01- 98 -10 -50 -100	69.1 65.7	64	Streptococcus agalactiae, Streptococcus difficile @ puntuación completa	Streptococcaceae (96/7045)		
L- 01- 99 -10 -50 -100	72.7 69.9	64	Streptococcus_criao_X58316	Lactobacillales (337/12134)		
L- 01- 100 -10 -50 -100	68.4 65.9	66	Streptococcus_mitis_D38482			

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	T _m diana: 71±3 °C	T _d (Suggs et al) 48-60	Resultados Blast RNA	Resultados directos emparejamiento sonda I (16S solamente)	Resultados directos emparejamiento sonda II (16S solamente)	Resultados directos emparejamiento sonda III (16S solamente)
L- 01- 101 -10 -50 -100	67.9 67.7	66	Streptococcus_pyogenes_AF076028	Streptococcaceae (95/7045)		
L- 01- 102 -10 -50 -100	69,1 68.3	56				
L- 01- 103 -10 -50 -100	71,8 67.5	70				
L- 01- 104 -10 -50 -100	68,1 67.0	56				

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Referencia para la secuencia afín
L- 01- 1 -10 -50 -100	Wagner M., Erhart R., Manz W., Amann R., Lemmer H., Wedi D. and Schliefer K.-H. (1994). Appl. Environ. Microbiol. 60: 792-800.
L- 01- 2 -10 -50	Nuevo
L- 01- 3 -10 -50 -100	
L- 01- 4 -10 -50 -100	
L- 01- 5 -10 -50 -100	Nuevo
L- 01- 6 -10 -50 -100	Nuevo
L- 01- 7 -10 -50 -100	Nuevo

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Referencia para la secuencia afín
L- 01- 8 -10 -50 -100	Nuevo
L- 01- 9 -10 -50 -100	See also Patent 4977251 11.12.1990: DNA Sonden für die Detektion von Bacteroides Spezies (expired) Manz W., et al. (1996). Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. Microbiol. 142: 1097-1106.
L- 01- 10 -10 -50 -100	Hammer et al, Microbiology (2001), 147, 1425-1436.
L- 01- 11 -10 -50 -100	Jürgen Bohnert, Barbara Hübner, Konrad Botzenhart, Int. J. Hyg. Environ. Health 203, 77-82 (2000)
L- 01- 12 -10 -50 -100	Nuevo
L- 01- 13 -10 -50 -100	Nuevo: según Govan esto debería cubrir, B. pyrocina, stabilis, multivorans, cepacia, ambitoria

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Referencia para la secuencia afín
L-	Nuevo: según Govan esto debería cubrir, <i>B. dolosa</i> , <i>cancepacie</i> , <i>Vietnamensis</i> , <i>anthina</i>
L- 01- 14 -10 -50 -100	Nuevo: solo <i>B. copacia</i> y <i>tropicalis</i>
L- 01- 15 -10 -50 -100	Nuevo: coge <i>B. pyrodina</i> , <i>stabilis</i> y <i>ambifaria</i>
L- 01- 16 -10 -50 -100	Nuevo: según Govan esto debería cubrir, <i>B. doloda anthinia</i>
L- 01- 17 -10 -50 -100	Nuevo: según Govan esto debería cubrir, <i>B. multivorans</i>

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles		Referencia para la secuencia afín
L- 01- 10	-10 -50 -100	Nuevo: según Govan, éste debería cubrir, <i>B. cenocepacia</i> and <i>viethamiensis</i>
L- 01- 10	-10 -50 -100	Presentación de Poppert en Jena, diapositivas disponibles, y Sven Poppert, Andreas Essig, Reinhard Marre, Michael Wagner, and Matthias Horn, 2002. Detection and differentiation of chlamydiae by fluorescence in situ hybridization (FISH). Appl. Environ. Microbiol. 68; 4081-4089
L- 01- 20	-10 -50 -100	Presentación de Poppert en Jena, diapositivas disponibles, y Sven Poppert, Andreas Essig, Reinhard Marre, Michael Wagner, and Matthias Horn, 2002. Detection and differentiation of chlamydiae by fluorescence in situ hybridization (FISH). Appl. Environ. Microbiol. 68; 4081-4089
L- 01- 21	-10 -50 -100	Presentación de Poppert en Jena, diapositivas disponibles, y Sven Poppert, Andreas Essig, Reinhard Marre, Michael Wagner, and Matthias Horn, 2002. Detection and differentiation of chlamydiae by fluorescence in situ hybridization (FISH). Appl. Environ. Microbiol. 68; 4081-4089
L- 01- 22	-10 -50 -100	Presentación de Poppert en Jena, diapositivas disponibles, y Sven Poppert, Andreas Essig, Reinhard Marre, Michael Wagner, and Matthias Horn, 2002. Detection and differentiation of chlamydiae by fluorescence in situ hybridization (FISH). Appl. Environ. Microbiol. 68; 4081-4089
L- 01- 23	-10 -50 -100	Presentación de Poppert en Jena, diapositivas disponibles, y Sven Poppert, Andreas Essig, Reinhard Marre, Michael Wagner, and Matthias Horn, 2002. Detection and differentiation of chlamydiae by fluorescence in situ hybridization (FISH). Appl. Environ. Microbiol. 68; 4081-4089
L- 01- 24	-10 -50 -100	Presentación de Poppert en Jena, diapositivas disponibles, y Sven Poppert, Andreas Essig, Reinhard Marre, Michael Wagner, and Matthias Horn, 2002. Detection and differentiation of chlamydiae by fluorescence in situ hybridization (FISH). Appl. Environ. Microbiol. 68; 4081-4089
L- 01- 25	-10 -50 -100	Applied and Environmental Microbiology, August 2002, p. 4081-4089, Vol. 68, No. 8

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Referencia para la secuencia afín
L- 01- 26 -10 -50 -100	Applied and Environmental Microbiology, August 2002, p. 4081-4089, Vol. 68, No. 8
L- 01- 27 -10 -50 -100	Applied and Environmental Microbiology, August 2002, p. 4081-4089, Vol. 68, No. 8
L- 01- 28 -10 -50 -100	Applied and Environmental Microbiology, August 2002, p. 4081-4089, Vol. 68, No. 8
L- 01- 29 -10 -50 -100	Applied and Environmental Microbiology, August 2002, p. 4081-4089, Vol. 68, No. 8
L- 01- 30 -10 -50 -100	Applied and Environmental Microbiology, August 2002, p. 4081-4089, Vol. 68, No. 8
L- 01- 31 -10 -50 -100	Applied and Environmental Microbiology, August 2002, p. 4081-4089, Vol. 68, No. 8
L- 01- 32 -10 -50 -100	Applied and Environmental Microbiology, August 2002, p. 4081-4089, Vol. 68, No. 8
L- 01- 33 -10 -50 -100	Applied and Environmental Microbiology, August 2002, p. 4081-4089, Vol. 68, No. 8

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Referencia para la secuencia afín
L- 01- 34 -10	Nuevo
-50	
-100	
L- 01- 35 -10	Nuevo
-50	
-100	
L- 01- 36 -10	Nuevo
-50	
-100	
L- 01- 37 -10	Nuevo
-50	
-100	
L- 01- 38 -10	Nuevo
-50	
-100	

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Referencia para la secuencia afín
L- 01- 39 -10	Nuevo
-50	
-100	
L- 01- 40 -10	Nuevo
-50	
-100	
L- 01- 41 -10	Nuevo
-50	
-100	
L- 01- 42 -10	DISERTACIÓN INAGURAL Qiang Fang, zu Tübingen, C:\Aktenkoffer\paper\FISH\23s-probe for Salmonella.pdf
-50	
-100	
L- 01- 43 -10	Derivado de Meier H., Amann R., Ludwig W. and Schleifer K.-H. (1999). Specific oligonucleotide probes for in situ detection... Syst. Appl. Microbiol. 22: 186-196. This detects Firmicutes. TGG AAG ATT CCC TAC TGC ccap, Clavel T., Borrmann D., Braune A., Doré J. and Blaut M. (2006). Occurrence and activity of human intestinal bacteria that activate dietary lignans. Anaerobe: In press , 5'- CTC GGA CAT TAC TGC CCG CG -3'
-50	
-100	
L- 01- 44 -10	Nuevo
-50	
-100	

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Referencia para la secuencia afín
L- 01- 45 -10	Derivado de Meier H., Amann R., Ludwig W. and Schleifer K.-H. (1999). Specific oligonucleotide probes for in situ detection... Syst. Appl. Microbiol. 22: 186-198. This detects Firmicutes. TGG AAG ATT CCG TAC TGC crap. Clavel T., Bormann D., Braune A., Doré J. and Blaut M. (2006). Occurrence and activity of human intestinal bacteria that activate dietary lignans. Anaerobe: In press, 5'- CTC GGA CAT TAC TGC CCG CG -3'
L- 01- 46 -10	Röner S. G. E. and Stackebrandt E. (1994). Identification of Clostridium perfringens by 16S and 23S rRNA oligonucleotide probes. Syst. Appl. Microbiol. 17: 425-432.
L- 01- 47 -10	Röner S. G. E. and Stackebrandt E. (1994). Identification of Clostridium perfringens by 16S and 23S rRNA oligonucleotide probes. Syst. Appl. Microbiol. 17: 425-432.
L- 01- 48 -10	Nuevo
L- 01- 49 -10	Nuevo
L- 01- 50 -10	Derivado de Jürgen Böhner, Barbara Hübner, Konrad Botzenhart Int. J. Hyg. Environ. Health 203, 77-82 (2000)
L- 01- 51 -10	Derivado de Ootsubo M., Shimizu T., Tanaka R., Sawabe T., Tajima K., Yoshimizu M., Ezura Y., Ezaki T. and Oyalizu H. (2002). Oligonucleotide probe for detecting Enterobacteriaceae by in situ hybridization. J. Appl. Microbiol. 93: 60-68.

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Referencia para la secuencia afín
L- 01- 52 -10 -50 -100	Derivado de Kempf V. A., Trebesius K. and Autenrieth I. B. (2000). Fluorescent in situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. J. Clin. Microbiol. 38: 830-838.
L- 01- 53 -10 -50 -100	Derivado de Wang R., Beggs M., Robertson L. and Cerniglia C. (2002). Design and evaluation of oligonucleotide-microarray method for the detection of human intestinal bacteria in fecal samples. FEMS Microbiol. Lett. 213: 175-182.
L- 01- 54 -10 -50 -100	Derivado de Behr T., Koob C., Schedl M., Mehlen A., Meier H., Knopp D., Frahm E., Obst U., Schleifer K., Niesner R. and Ludwig W. (2000). A nested array of rRNA targeted probes for the detection and identification of enterococci by reverse hybridization. Syst. Appl. Microbiol. 23: 563-572.
L- 01- 55 -10 -50 -100	NUEVO, partiendo de la secuencia de Wangy moviéndose hacia 5' paso a paso y corriendo BLAST
L- 01- 56 -10 -50 -100	Derivado de Wang R., Beggs M., Robertson L. and Cerniglia C. (2002). Design and evaluation of oligonucleotide-microarray method for the detection of human intestinal bacteria in fecal samples. FEMS Microbiol. Lett. 213: 175-182.
L- 01- 57 -10 -50 -100	Amman review 1995

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Referencia para la secuencia afín
L- 01- 58 -10 -50 -100	Nuevo
L- 01- 59 -10 -50 -100	Comparar secuencia: Patente 5654418 05.08.1997 von Sheiness (Becton Dickinson and Company): Nucleic acid probes useful for detecting microorganisms associated with vaginal infections. Verfahren zur Detektion von Mikroorganismen die mit vaginalen Krankheiten assoziiert sind, z.B. Gardnerella vaginalis, Trichomonas vaginalis und Candida albicans. Beispiel für ein Krankheitsbild und den entsprechenden SONDENSATZ.
L- 01- 60 -10 -50 -100	Nuevo solapamiento de 6 bases con Haeinf-I
L- 01- 61 -10 -50 -100	Nuevo, sin solapamiento
L- 01- 62 -10 -50 -100	Nuevo
L- 01- 63 -10 -50 -100	Nuevo

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Referencia para la secuencia afín
L- 01- 64 -10 -50 -100	Derivado de Blasco L., Ferrer S. and Pardo I. (2003). Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for in situ identification of wine lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 225: 115-123.
L- 01- 65 -10 -50 -100	
L- 01- 66 -10 -50 -100	
L- 01- 67 -10 -50 -100	
L- 01- 68 -10 -50 -100	
L- 01- 69 -10 -50 -100	
L- 01- 70 -10 -50 -100	
L- 01- 71 -10 -50 -100	
L- 01- 72 -10 -50 -100	
L- 01- 73 -10 -50 -100	

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Referencia para la secuencia afín
L- 01- 74 -10 -50 -100	
L- 01- 75 -10 -50 -100	
L- 01- 76 -10 -50 -100	Dorothee Grimm,1 Hilde Merkert,1 Wolfgang Ludwig,2 Karl-Heinz Schieffer,2 Jörg Hacker,1 and Bettina C. Brandt1* Appl Environ Microbiol. 1998 July; 64(7): 2688-2690.
L- 01- 77 -10 -50 -100	Wang, R.-F., Cao, W.-W. and Johnson, M. G. (1991). Development of a 16S rRNA-based oligomer probe specific for <i>Listeria monocytogenes</i> . Appl. Environ. Microbiol. 57, 3666-3670.
L- 01- 78 -10 -50 -100	
L- 01- 79	
L- 01- 80 -10 -50 -100	Derivado de DISERTACIÓN INAGURAL , Qiang Fang, zu Tübingen, C:\Aktenkoffer\paper\FISH123s-probe for <i>Salmonella</i> .pdf
L- 01- 81 -10 -50 -100	Nuevo

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Referencia para la secuencia afín
L- 01- 82 -10 -50 -100	Nuevo
L- 01- 83	
L- 01- 84	
L- 01- 85 -10 -50 -100	Nuevo
L- 01- 86 -10 -50 -100	Nuevo
L- 01- 87 -10 -50 -100	Salmonella spp. in foods by fluorescent in situ hybridization with 23S rRNA probes: a comparison with conventional culture methods. J Food Prot. 2003 May;86(5):723-31 *Fang Q, Brockmann
L- 01- 88 -10 -50 -100	Salmonella spp. in foods by fluorescent in situ hybridization with 23S rRNA probes: a comparison with conventional culture methods. J Food Prot. 2003 May;86(5):723-31 *Fang Q, Brockmann
L- 01- 89 -10 -50 -100	Salmonella spp. in foods by fluorescent in situ hybridization with 23S rRNA probes: a comparison with conventional culture methods. J Food Prot. 2003 May;86(5):723-31 *Fang Q, Brockmann

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Referencia para la secuencia afín
L- 01- 90 -10 -50 -100	Salmonella spp. in foods by fluorescent in situ hybridization with 23S rRNA probes: a comparison with conventional culture methods. J Food Prot. 2003 May;66(5):723-31 *Fang Q, Brockmann
L- 01- 91 -10 -50 -100	Salmonella spp. in foods by fluorescent in situ hybridization with 23S rRNA probes: a comparison with conventional culture methods. J Food Prot. 2003 May;66(5):723-31 *Fang Q, Brockmann
L- 01- 92 -10 -50 -100	Salmonella spp. in foods by fluorescent in situ hybridization with 23S rRNA probes: a comparison with conventional culture methods. J Food Prot. 2003 May;66(5):723-31 *Fang Q, Brockmann
L- 01- 93 -10 -50 -100	Nuevo
L- 01- 94 -10 -50 -100	Nuevo
L- 01- 95 -10 -50 -100	Derivado de Urakawa H., Fantroussi, S. E., Smidt, H., Smoot, J. C., Tribou, E. H., Kelly, J. J., Noble, P. A., Stahl, D. A. (2003). Optimization of single-base-pair mismatch discrimination in oligonucleotide microarrays. Appl. Envir. Microbiol. 69: 2848-2856.

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Referencia para la secuencia afín
L- 01- 96 -10 -50 -100	Derivado de Urakawa H., Fantroussi, S. E., Smidt, H., Smoot, J. C., Tribou, E. H., Kelly, J. J., Noble, P. A., Stahl, D. A. (2003). Optimization of single-base-pair mismatch discrimination in oligonucleotide microarrays. Appl. Envir. Microbiol. 69: 2848-2856.
L- 01- 97 -10 -50 -100	Nuevo
L- 01- 98 -10 -50 -100	Nuevo
L- 01- 99 -10 -50 -100	Nuevo
L- 01- 100 -10 -50 -100	Nuevo

Tabla I (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Referencia para la secuencia afín
L- 01- 101 -10 -50 -100	Nuevo
L- 01- 102 -10 -50 -100	Comparar secuencia: Patente 5728522 17.03.1998 von Del Vecchio (Research Corporation Technologies): Oligonucleotides and nucleic acids for the detection of Ureaplasma urealyticum. Test für die PCR-Detektion von Ureaplasma urealyticum
L- 01- 103 -10 -50 -100	
L- 01- 104 -10 -50 -100	Comparar secuencia: Patente 5593831 14.01.1997 von Shah (Amoco Corporation): Nucleic acid probes for the detection of Yersinia enterocolitica: Nukleinsäure Sonden, die an die rRNA von Y. enterocolitica binden nicht aber an die rRNA von non-Yersinia enterocolitica für die Detektion von Yersinia enterocolitica in Nahrungsmitteln und anderen Proben. Karlheinz Trebesius et al., Journal of Clinical Microbiology, September 1998, p. 2557-2564, Vol. 36, No. 9

Tabla 2

Número de código de diagnóstico de los bucles	Organismo diana	Secuencia 5'-3'	LongitudContenido GC	En cont. GC	¿Adecuado PNA? Palíndromos sec.inversa/ repeticiones/ horquilla	Final
L- 01- 1	-10 <i>Acinetobacter</i>	TGCCGGATT ACCATCCTC TCC CAT	39 54%	si	no	no
	-50	ACT CTA AATCCGGCA				
	-100	ACC ATC CTC TCC CAT ACT CTA	21 10 48%	si	si	no
L- 01- 2	-10 <i>Acinetobacter baumannii</i>	TAG AGT ATG GGA GAG GAT GGT	30 21 70%	no	no	no
	-50	GC GCG TC CGG TAG CAA GCT ACC				
	-100	TTC CGCGC	20 11 55%	si	no	no
		TC CGG TAG CAA GCT ACC TTC				
L- 01- 3	-10 <i>Adinomyces</i>	GAA GGT AGC TTG CTA CCG GA				
	-50 spp.					
L- 01- 4	-10 <i>Aspergillus spp</i>					
	-50					
	-100					
L- 01- 5	-10 <i>Aspergillus flavus</i>	CCGCCGGCGT AC AGA GTT CGT GGT	41 29 71%	no	si	no
	-50	GTC TCC TC GCCCAGCGG				
	-100	AC AGA GTT CGT GGT GTC TCC	20 11 55%	si	no	no
L- 01- 6	-10 <i>Aspergillus fumigatus</i>	GGA GAC ACC ACG AAC TCT GT	23 15 65%	no	si	no
	-50	ggtc gcc tac aga gca ggt gcc g				
	-100	gcc tac aga gca ggt gcc	18 11 61%	no	no	si
L- 01- 7	-10 <i>Aspergillus niger</i>	gtc acc tgc tct gla ggc				
	-50	ctciga a ctg att gcc ttc aat caa ctc agag	32 13 41%	si	si	no
	-100	a ctg att gcc ttc aat caa ctc aga	25 9 36%	si	si	no
L- 01- 8	-10 <i>Aspergillus terreus</i>	tct gag ttp att gaa tgc aat cag t				
	-50	TCCGTC tga tgc caa aga atc aca ctc aga	36 17 47%	si	si	no
	-100	GACGGA				

Tabla 2 (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Organismo diana	Secuencia 5'3'	2		Longitud	Contenido GC	En cont. GC	<3 bases autocor.	4 purinas en fila	Longitud en fila (max:18)	Palíndromos sec.inversa/ repeticiones horquilla	Final
			GC	Contenido GC								
-50		tga ttg caa aga atc aca ctc aga	Sonda/Híbrido diana	24	9	38%	Si	no	Si	no	no	no
-100		tct gag tgt gat tct ttg caa tca										
L- 01- 9	Bacteroides/Prevotella	GCDCGCGGAT CCA ATG TGG GGG ACC TTC TAGCCACGGC	Baliza	39		74%	no		no	no	no	no
-50		CCA ATG TGG GGG ACC TTC	Sonda/Híbrido diana	17	11	59%	Si	no	no	Si	no	no
-100		GAA GGT CCC CCA CAT TGG										
L- 01- 10	Borrelia burgdorferi	TGCCGGATT CA TGC TTA AGA CGG ACT GCC AATCCCGGCA	Baliza	39		56%	Si		Si	no	no	no
-50		CA TGC TTA AGA CGC ACT GCC	Sonda/Híbrido diana	20	11	50%	Si	no	no	no	no	no
-100		GGC AGT GCG TCT TAA GCA TG										
L- 01- 11	Bordetella pertussis	TGCCGGATT CAG CAC TCT GCA AAG ACG AAA AATCCCGCA	Baliza	40		53%	Si		Si	no	no	no
-50		CAG CAC TCT GCA AAG ACG AAA	Sonda/Híbrido diana	21	10	48%	Si	no	no	no	no	no
-100		TTT CGT CTT TGC AGA GTG CTG										
L- 01- 12	Burkholderia cepacia	ACCGCTC TTT CTT TCC GGA CAA AAG TGC TTT GAGCGCT	Baliza	39		51%	Si		no	no	no	no
-50	Complejo = Opción I	TTT CTT TCC GGA CAA AAG TGC TTT	Sonda/Híbrido diana	24	9	38%	Si	no	no	no	no	no
-100		AAA GCA CTT TTG TCC GGA AAG AAA										
L- 01- 13	Burkholderia cepacia	CGCCTTC AGA ACC AAG GAT TTC TTT CCG G GAAGCG	Baliza	36		56%	Si		no	no	no	no
-50	Complejo, dos balizas = Opción II	AGA ACC AAG GAT TTC TTT CCG G	Sonda/Híbrido diana	22	10	45%	Si	no	no	no	no	no
-100		CCG GAA AGA AAT CCT TGG TTC T										
L-		ACGCA AGAGCCAAGTTTCTTCCG CTTGCGT	Baliza	34		50%	Si		Si	no	no	no
		AGA GCC AAG GTT TTC TTT CCG	Sonda/Híbrido diana	21	10	48%	Si	no	Si	no	no	no
		CGG AAA GAA AAC CTT GGC TCT										

Tabla 2 (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Organismo diana	Secuencia 5'-3'	3	Longitud GC	En cont. GC	<3 bases autocom. en fila	4 purinas en fila	Longitud (max:18)	Palíndromos sec.inversa/ repeticiones/ horquilla	Final
L- 01- 14 -10 -50 -100	Burkholderia cepacia	ACGCTC G TCA TCC CCC GGC CAT GAGCGT G TCA TCC CCC GGC CAT ATG GCC GGG GGA TGA C	Baliza Sonda/Híbrido diana	28 16 11 29	68% 69% 69%	no no no	no no no	no Si no	no no no	no no no
L- 01- 15 -10 -50 -100	Burkholderia pyrocinia / stabilis/ambifaria	CGCTC CGT CAT CCC CCG GCT ATA GGAGCG CGT CAT CCC CCG GCT ATA TAT AGC CCG GGG ATG ACG	Baliza Sonda/Híbrido diana	29 18 11 29	61% 61% 72%	no no no	no no no	Si no no	no no no	no no no
L- 01- 16 -10 -50 -100	Burkholderia dolosa/anthina	CGCTC GT CAT CCC CCG GCT GTA GAGCGG GT CAT CCC CCG GCT GTA TAC AGC CCG GGG ATG ACG	Baliza Sonda/Híbrido diana	29 17 11 41	72% 65% 73%	no no no	no no no	no Si no	no no no	no no no
L- 01- 17 -10 -50 -100	Burkholderia multivorans	GCCGCCGGCGT CGT CAT CCC CCG ATC GTA TCGCCAGCGG CGT CAT CCC CCG ATC GTA TAC GAT CCG GGG ATG ACG	Baliza Sonda/Híbrido diana	18 11 18 11 41	61% 61% 76%	no no no	no no no	Si no no	no no no	no no no
L- 01- 18 -10 -50 -100	Burkholderia cenocepacia/Miel tuberculosis	ACT GTA TCGCCAGCGG CGT CAT CCC CCG ACT GTA TAC AGT CCG GGG ATG ACG GCC CTA AGC GTC CTT CCA	Baliza Sonda/Híbrido diana	18 11 18 11 18 11	81% 81% 61%	no no no	no no no	Si no no	no no no	no no no
L- 01- 19 -10 -50 -100	Campylobacter (pathogenic thermophiles)	ACGCTC GAA GTG TAA GCA ACT AAA T GAGCGT GAA GTG TAA GCA ACT AAA T ATT AGT TGC TTA CAC TTC	Baliza Sonda/Híbrido diana	31 19 30	45% 32% 53%	Si Si Si	Si no no	no no no	no no no	no no no
L- 01- 21 -10	Campylobacter jejuni	ACGCTC AGC TAA CCA CTT ATA CCG GAGCGT	Baliza	30	53%	Si	Si	no	no	no

Tabla 2 (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Organismo diana	Secuencia 5'3'	Longitud GC	Contenido GC	En cont. GC	<3 bases purinas en fila	Longitud purinas en fila (max.18)	Palíndromos sec. inversa/ repeticiones horquilla	Final
-50		AGC TAA CCA CTT ATA CCG	18	8	44%	Si	no	Si	no
-100		CGG TAT AAG TGG TTA GCT							
L- 01- 22	Cp. <i>upsaliensis</i>	CCGCTC CGT GTG TCG CCC TAG GCG TA GAGCGG	32	72%	no	no	no	no	no
-50		CGT GTG TCG CCC TAG GCG TA	20	13	65%	no	no	no	no
-100		TA CGC CTA GGG CGA CAC ACG							
L- 01- 23	Cp coll	CCGCTC TCG ATG GCA TCA GGG GTT GAGCGG	30	67%	no	no	no	no	no
-50		TCG ATG GCA TCA GGG GTT	18	10	56%	Si	no	Si	no
-100		AAC CCC TGA TGC CAT CGA							
L- 01- 24	Cp coll -comp	not required, competitor is not labelled							
-50		TCG ACG GCA TCA GGG GTT	18	11	61%	no	no	Si	no
-100		AAC CCC TGA TGC CGT CGA							
L- 01- 25	Chlamydia	ACGCCGGCGT TAG CTG ATA TCA CAT AGA TCGCCGCGT	39	59%	Si	no	Si	no	no
-50		TAG CTG ATA TCA CAT AGA	18	6	33%	Si	no	Si	no
-100		TCT ATG TGA TAT CAG CTA							
L- 01- 26	Chlamydiae	TCGCCGGCGT CTT TCC GCC TAC ACG CCC TCGCCAGCGA	41	73%	no	no	no	no	no
-50		CTT TCC GCC TAC ACG CCC	18	12	67%	no	no	Si	no
-100		GGG CGT GTA GGC GGA AAG							
L- 01- 27	Chlamydiales	TCGCCGGCGT CCT CCG TAT TAC CGCAGC TCGCCAGCGA	41	71%	no	no	no	no	no
-50		CCT CCG TAT TAC CGC AGC	18	11	61%	no	no	Si	no
-100		GCT CGC GTA ATA CCG AGG							
L- 01- 28	Chlamydia	ACGCCGGCGT CTA ACT TCG CTT TCC GCC TCGCCAGCGT	39	64%	no	no	no	no	no

Tabla 2 (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Organismo diana	Secuencia 5'-3'	5		En cont. GC	<3 bases autocor.	4 purinas en fila	Longitud (max.18)	Palíndromos sec.inversa/ repeticiones/ horquilla	Final
			d	Contenido GC						
-50		CTA ACT TTC CTT TCC GCC	18	9	50%	si	no	si	no	no
-100		GGC GGA AAG GAA AGT TAG								
L- 01- 29	Chlamydia pneumoniae	TCCACCGGCGT CTC TTC CTC AAC	41	61%	no	no	si	no	no	no
-50		CGA AAG TCGCCAGTGA								
-100		CTC TTC CTC AAC CGA AAG	18	9	50%	si	no	si	no	no
-100		CTT TCG GTT GAG GAA GAG								
L- 01- 30	"Chlamydia psittaci" group	TCAGCCGCGT AAG GCA AAA CCA	41	61%	no	no	si	no	no	no
-50		ACT CCC TCGCCAGCTGA								
-100		AAG GCA AAA CCA ACT CCC	18	9	50%	si	no	si	no	no
-100		GGG AGT TGG TTT TGC CTT								
L- 01- 31	Subgroup of the Parachlamydiae	CCGCCGCGT TCG GTT TTC TCG GCC	39	69%	no	no	no	no	no	no
-50	Parachlamydiae	TAC TCGCCAGCGG								
-100		TCC GTT TTC TCC GCC TAC	18	10	50%	si	no	si	no	no
-100		GTA GGC GGA GAA AAC GGA								
L- 01- 32	Chlamydia sep.	TCCGCCGCGT GCT CCC CTT GCT	42	69%	no	no	no	no	no	no
-50		ITC GCG TCGCCAGCGGA								
-100		GCT CCC CTT GCT TTC GCG	18	12	61%	no	no	si	no	no
-100		CGC GAA AGC AAG GGG AGC								
L- 01- 33	Chlamydia trachomatis	ACGCTC TCG GAT GCC CAA ATA TCG	30	57%	si	no	no	no	no	no
-50		GAGCGT								
-100		TCG GAT GCC CAA ATA TCG	18	9	50%	si	no	si	no	no
-100		CGA TAT TTG GGC ATC CGA								
L- 01- 34	Candida albicans	GG aa tgg cta ccc aga agg aaa CCATTCC	29	15	52%	si	no	no	no	no
-50		aa tgg cta ccc aga agg aaa								
-100		ttt cct tct tgg tag cca tt	20	9	45%	si	si	no	no	no

Tabla 2 (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Organismo diana	Secuencia 5'-3'	6	Contenido GC	En cont. GC	<3 bases purinas en fila autocor.	4 purinas en fila	Longitud (max 18)	Palíndromos sec. inversa/ repeticiones/ horquilla	Final
L- 01- 35 -10	Candida krusei	CCGCTC tgt att agc tct aga ttt cca cgg GAGCGG	Baliza	36/ 19/ 53%	Si	no	Si	no	no	no
-50		tgt att agc tct aga ttt cca cgg	Sonda/Híbrido diana	24/ 9/ 38%	Si		no	no	no	no
-100		cgg tgg aaa tct aga gct aat aca								
L- 01- 36 -10	Candida dubliniensis	GTITGcc cog aaa gag taa ctt gca GGCAAAC	Baliza	32/ 16/ 50%	Si	no	no	no	no	no
-50		cc cog aaa gag taa ctt gca	Sonda/Híbrido diana	20/ 10/ 50%	Si		no	no	no	no
-100		tgc aag tta ctc ttt cgg gg								
L- 01- 37 -10	Candida glabrata	GCGCGCGCGT gg cca ccc agg ccc aaa TCGCCACGCGG	Baliza	40/ 32/ 80%	no	no	no	no	no	no
-50		gg cca ccc agg ccc aaa	Sonda/Híbrido diana	17/ 12/ 71%	no		no	Si	no	no
-100		ttt ggg cct ggg tgg cc								
L- 01- 38 -10	Candida parapsilosis	GCGCGCGCGT gc caa aaa ggc tag cca gaa TCGCCACGCGG	Baliza	43/ 30/ 70%	no	no	no	no	no	no
-50		gc caa aaa ggc tag cca gaa	Sonda/Híbrido diana	20/ 10/ 50%	Si		no	no	no	no
-100		ttc tgg cta gcc ttt ttg gc								
L- 01- 39 -10	Candida spp	ACGC gct tgg ctg gcc ggt c GCGT	Baliza	16/ 12/ 75%	no		no	Si	no	no
-50		tg acc ggc cag cca agc	Sonda/Híbrido diana	24/ 18/ 75%	no	no	no	no	no	no
-100		gct tgg ctg gcc ggt c		44/ 28/ 64%	no	no	Si	no	no	no
L- 01- 40 -10	Candida tropicalis	ACGCGCGCGT tac gca tca gaa aga tgg acc TCGCCACGCGT	Baliza							
-50		tac gca tca gaa aga tgg acc	Sonda/Híbrido diana	21/ 10/ 49%	Si		no	no	no	no
-100		GGT CCA TCT TTC TGA TGC GTA								
L- 01- 41 -10	Candida lusitanae		Baliza							
-50			Sonda/Híbrido diana							
-100										

Tabla 2 (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Organismo diana	Secuencia 5'-3'	Longitud GC	En cont. GC	<3 bases autocor.	4 purinas en fila	Longitud (max.18)	Palíndromos sec.inversa/ repeticiones horquilla	Final
L- 01- 42	-10 <i>Citrobacter freundii</i>	TGCCGGATT C TAC TTG TTA GGI GAC TGC GT AATCCCGCA C TAC TTG TTA GGT GAC TGC GT	40	53%	SI	no	SI	no	no
-50			21	11	SI		no	no	no
-100		AC GCA GTC ACC TAA CAA GTA G							
L- 01- 43	-10 <i>Clostridium botulinum</i>	TCCTG TAG T GC CGT TTC ATG CGA AAC TAC AA GA	33	42%	SI	no	no	no	no
-50		GC CGT TTC ATG CGA AAC TAC AA	22	10	SI		no	no	no
-100		TT GTA GTT TCG CAT GAA ACG GC							
L- 01- 44	-10 <i>Clostridium difficile</i>	GCCGCCGCGT CGAAG TAA ATC GCT CAA CTT GCA TCGCCAGCGGC	46	30	no	no	SI	no	no
-50		CGA AGT AAA TCG CTC AAC TTG CA	23	10	SI		no	no	no
-100		TGC AAG TTG AGC GAT TTA CTT CG							
L- 01- 45	-10 <i>Clostridium spp</i>	CGCTCA CAC CCG TCC GCC GGT AAT GAGCG	29	69%	no	no	no	no	no
-50		CAC CCG TCC GCC GGT AAT	18	12	no		no	SI	no
-100		ATT AGC GGC GGA CGG GTG							

Tabla 2 (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Organismo diana	Secuencia 5'3'	Longitud GC	Cont. GC	<3 bases autocom.	4 purinas en fila	Longitud (max.18)	Palíndromos sec.inversa/ repeticiones/ horquilla	Final
L- 01- 46 -10	<i>Clostridium perfringens</i>	GCGCGGCGT GATT GCT CCI TTG GTT GAA TGA TG TCGCCAGCGGC G ATT GCT CCT TTG GTT GAA TGA TG CA TCA TTC AAC CAA AGG AGC AAT C	44	68%	no	si	no	no	no
-50			21	10	48%	si	no	no	no
-100									
L- 01- 47 -10	<i>Clostridium perfringens</i>	ACGCTC GGT TGA ATG ATG ATG CCA T GAGCGT GGT TGA ATG ATG ATG CCA TCT TT	31	52%	si	si	no	no	no
-50			19	9	42%	si	no	no	no
-100									
L- 01- 48 -10	<i>Clostridium tetani</i>	AA AGA TGG CAT CAT TCA ACC GCGGAC CT GTG TTA CTC ACC CGT CCG C CT GTG TTA CTC ACC CGT CCG	27	18	52%	si	no	no	no
-50			20	12	42%	si	no	no	no
-100									
L- 01- 49 -10	<i>Cryptococcus neoformans</i>	CGG ACG GGT GAG TAA CAC AG							
-50									
-100									
L- 01- 50 -10	<i>Enterobacteriaceae</i>	TGCGGGATT TT CGT GTT TGC ACA GTG CTG T AATCCCGGCA TT CGT GTT TGC ACA GTG CTG T	40	53%	si	si	no	no	no
-50			21	10	48%	si	no	no	no
-100									
L- 01- 51 -10	<i>Enterobacteriaceae</i>	A CAG CAC TGT GCA AAC ACG AA TGCGGGATT TCT CGC GAG GTC GCT TCT AATCCCGGCA TCT CGC GAG GTC GCT TCT	27	16	59%	si	no	no	no
-50			18	11	61%	no	no	si	no
-100									
L- 01- 52 -10	<i>Enterobacteriaceae</i>	AGA AGC GAC CTC GCG AGA TGCGGGATT CCC CCW CTT TGG TCT TGC GA AATCCCGGCA CCC CCW CTT TGG TCT TGC GA	39	59%	si	no	no	no	no
-50			20	12	60%	no	no	no	no

Tabla 2 (continuación)

9

Número de código de diagnóstico de los bucles	Organismo diana	Secuencia 5'-3'	Longitud GC	Contenido GC	En cont. GC	<3 bases purinas en fila	4 purinas en fila	Longitud repetición (max.18)	Palíndromos sec. inversa/ repeticiones horquilla	Final
-100 L- 01- 53	Enterococci	TC GCA AGA CCA AAG WGG GGG TGCCGGATT ATC CAT CAG CGA CAC CCG AATCCCGGCA	38	58%	Si	no	no	no		no
-50		ATC CAT CAG CGA CAC CCG	18	61%	no	no	no	Si		no
-100 L- 01- 54	Enterococcus faecalis	CGG GTG TCG CTG ATG GAT TGCCGGATT CCC TCT GAT GGG TAG GII AATCCCGGCA	37	57%	Si	no	Si	no		no
-50		CCC TCT GAT GGG TAG GTT	18	56%	Si		no	Si		no
-100		AAC CTA CCC ATC AGA GGG								

Tabla 2 (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Organismo diana	Secuencia 5'-3'	Longitud GC	Contenido GC	En cont. GC	<3 bases autocor.	4 purinas en fila	Longitud (max.18)	Palíndromos sec.inversa/ repeticiones/ horquilla	Final
L- 01- 55	-10 Enterococcus faecium	GCCGCCGGCGT TTC AAA TCA AAA	47	62%	no	no	si	no	no	no
		CCA TGC GGT TTC TCGCCAGCGC								
		TTC AAA TCA AAA CCA TGC GGT TTC	24	9	38%	si	no	no	no	no
L- 01- 56	-100	GAA ACC GCA TGG TTT TGA TTT GAA								
		GGCGCGGATT GGA AGA AGC TTG CTT	40	53%	si	no	si	no	no	no
		CTT TGC AATCCCGCA								
L- 01- 57	-100	GGA AGA AGC TTG CTT CTT TGC	21	10	48%	si	no	no	no	no
		GCA AAG AAG GAA GCT TCT TCC								
		CGCTC GCT GCC TCC CGT AGG AGT	28	71%	no	no	no	no	no	no
L- 01- 58	-100	GAGCG								
		GCT GCC TCC CGT AGG AGT	18	12	67%	no	no	no	si	no
		ACT CCT ACG GGA GGC AGC								
L- 01- 59	-100	ACGCTC CAC CAT GAA GCA ACC CGT	30	60%	no	no	no	no	no	no
		GAGCGT								
		CAC CAT GAA GCA ACC CGT	18	10	56%	si	no	si	no	no
L- 01- 60	-100	ACG GGT TGC TTC ATG GTG								
		ACCGCTA TCCGATAATA CGC	35	51%	si	no	no	no	no	no
		GGTATTAGC GGGT								
L- 01- 61	-100	TT CCG ATA ATA CGC GGT ATT AGC	23	10	43%	si	no	no	no	no
		GCT AAT ACC GCG TAT TAT CGG AA								
		CGGTGCTC TATA CGC GGT ATT	39	56%	si	no	no	no	no	no
L- 01- 62	-100	AGC GAC AG AGAGACCG								
		AGC GAC AG AGAGACCG								
		AGC GAC AG AGAGACCG								

Tabla 2 (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Organismo diana	Secuencia 5'-3'	Longitud GC	En cont. GC	<3 bases purinas en fila	Longitud repetición (max.18)	Palíndromos sec. inversa/ repeticiones horquilla	Final
-50		TA ATA CGC GGT ATT AGC GAC AG	22 10 45%	Si	no	no	no	no
-100		CT GTC GCT AAT ACC GCG TAT AT						
L- 01- 62	Klebsiella pneumoniae	ACGCCGCGT AGG TTA TTA ACC TCA TCG CCT TCGCCAGCGT	40 63%		no	no	no	no
-50		AGG TTA TTA ACC TCA TCG CCT	21 9 43%	Si	no	no	no	no
-100		AGG CGA TGA GGT TAA TAA CCT						
L- 01- 63	Klebsiella oxytoca	GGAAGGGATAT AGG TTA TTA ACC TCA CTC CCT TCC	35 16 46%	Si	no	no	no	no
-50		AGG TTA TTA ACC TCA CTC CCT TCC	24 11 46%	Si	Si	no	no	no
-100		GGA AGG GAG TGA GGT TAA TAA CCT						
L- 01- 64	Lactobacillus brevis	CGC TCAT TCA ACG GAA GCT CGT TCG ATGAGCG	31 48%	Si	no	no	no	no
-50		TCAT TCA ACG GAA GCT CGT TCG	22 11 50%	Si	Si	no	no	no
-100		CGAAC GAGCTTCGGT TGAATGA						
L- 01- 65	Mycobacterium avium							
-100								
L- 01- 66	Mycobacterium bovis							
-50								
-100								
L- 01- 67	Mycobacterium chelonae							
-50								
-100								
L- 01- 68	Mycobacterium fortuitum							
-50								
-100								
L- 01- 69	Mycobacterium goodii							
-50								

Tabla 2 (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Organismo diana	Secuencia 5'-3'	12.		Longitud GC	Contenido GC	En cont. GC	<3 bases autocom. en fila	4 purinas en fila	Longitud (max:18)	Palíndromos sec.inversa/ repeticiones/ horquilla	Final
L- 01- 70	-100 Mycobacterium -50 intracellulare -100											
L- 01- 71	-100 Mycobacterium -50 kansasii -100											
L- 01- 72	-100 Mycobacterium -50 mageritense -100											
L- 01- 73	-100 Mycobacterium -50 smegmatis -100											
L- 01- 74	-100 Mycobacterium -50 tuberculosis -100											
L- 01- 75	-100 Mycobacterium -50 xenopi -100											
L- 01- 76	-100 Legionella -50 pneumophila -100	TGCCGGATT ATC TGA CCG TCC CAG GTT AATCCGGCA ATC TGA CCG TCC CAG GTT	Baliza		37	57%	SI	no	SI	no	no	no
L- 01- 77	-100 Listeria -50 monocytogenes -100	AAC CTG GGA CCG TCA GAT ACGCTC ATA AGA TGT GGC GCA TGC GAGCGT ATA AGA TGT GGC GCA TGC	Baliza		18 10	56%	SI	no	no	SI	no	no
L- 01- 78	-100 Mycoplasma -50 hominis -100	GCA TGC GCC ACA TCT TAT TBD ATT GCT AAC CTC GCT CGA TCG AGC GAG GTT AGC AAT	Baliza		30	57%	SI	no	no	no	no	no
			Sonda/Híbrido diana		18 9	50%	SI	no	no	SI		

Tabla 2 (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Organismo diana	Secuencia 5'-3'	13		Longitud contenido GC	En cont. GC	<3 bases purinas autocom. en fila	4 purinas en fila (max 18)	Palíndromos sec. inversa/ repeticiones/ horquilla	Final
			Baliza	Sonda/Híbrido diana						
L- 01- 79	<i>Nocardia</i> spp.		Baliza	Sonda/Híbrido diana						
L- 01- 80	<i>Proteus mirabilis/vulgaris</i>	GGC GTC ACA CCG G AT ACG TAGTGCTACGCC	Baliza	Sonda/Híbrido diana	30	63%	no	no	no	no
-50		GGC GTC ACA CCG G AT ACG			18	67%	si	no	si	no
-100		CCGT ATC CGG TGT GAC GCC								
L- 01- 81	<i>Pneumocystis</i>	ACTC GGC TTC ATG CCA ACA GTC GAGT	Baliza	Sonda/Híbrido diana	25	56%	si	no	no	no
-50	-1	GGC TTC ATG CCA ACA GTC			21	57%	si	no	si	no
-100		GAC TGT TGG CAT GAA GCC								
L- 01- 82	<i>Pneumocystis</i>	GACAC CAT AAG ATG CCG AGC GAG GTGTC	Baliza	Sonda/Híbrido diana	28	57%	si	no	no	no
-50	2	CAT AAG ATG CCG AGC GAG			18	56%	si	no	si	no
-100		CTC GCT CGG CAT CTT ATG								
L- 01- 83	<i>Propionibacterium</i> acnes									
L- 01- 84	<i>Propionibacterium</i> spp (other than <i>Passer</i>)									
L- 01- 85	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ACCGCCGGCGT AAGA CGA CTC GTC ATCACCT TCGCCAGCGGT AAGA CGA CTC GTC ATC ACC T	Baliza	Sonda/Híbrido diana	42	67%	no	no	si	no
-50		A GGT GAT GAC GAGTCG TCT T			20	50%	si	no	no	no
-100		GCCGCCGGCGT GGCAGA TTC CTA GGCATTACT TCGCCAGCGGC GGCAGA TTC CTA GGC ATT ACT	Baliza	Sonda/Híbrido diana	44	68%	no	no	si	no
L- 01- 86	<i>Pseudomonas</i> spp				21	48%	si	no	no	no
-50										

Tabla 2 (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Organismo diana	Secuencia 5'3'	14	Longitud GC	Contenido GC	En cont. GC	<3 bases autocor.	4 purinas en fila	Longitud repeticiones (max:18)	Palíndromos sec.inversa/ horquilla	Final
L- 01- 87 -100	Salmonellen	AGT AAT GCC TAG GAA TCT GCC AGCTC TGC GCT TTT GIG TAC GGG GCT GAGCT	Baliza	31	58%	Si	no	no	no	no	no
-50		TGC GCT TTT GTG TAC GGG GCT	Sonda/Híbrido diana	21	57%	Si		no	no	no	no
L- 01- 88 -100	Salmonellen 331 Komp	AGC CCC GTA CAC AAA AGC GCA not required, competitor is not labelled	Baliza								
-50		G TGCA TTT GTG TAC GGG GC	Sonda/Híbrido diana	18	61%	no		no	Si	no	no
L- 01- 89 -100	Salmonellen	AGC CCC GTA CAC AAA AGC GCA CGCTC CTT CAC CTA CGT GTC AGC G GAGCG	Baliza	29	66%	no	no	Si	no	no	no
-50		CTT CAC CTA CGT GTC AGC G	Sonda/Híbrido diana	19	59%	Si		no	no	no	no
L- 01- 90 -100	Salmonellen	C GCT GAC ACG TAG GTG AAG not required, competitor is not labelled	Baliza								
-50		T CAC CTA CAT ATC AGC GTG C	Sonda/Híbrido diana	20	50%	Si	no	Si	no	no	no
L- 01- 91 -100	Salmonellen	C GCT GAC ACG TAG GTG AAG A	Baliza								
-50			Sonda/Híbrido diana								
L- 01- 92 -100	Salmonella	TGCCGGATT CTT CAC CTA CGT GTC AGCG AATCCGGCA	Baliza	38	58%	Si	no	Si	no	no	no
-50		CTT CAC CTA CGT GTC AGC G	Sonda/Híbrido diana	19	58%	Si		no	no	no	no
L- 01- 93 -100	Serratia spp	C GCT GAC ACG TAG GTG AAG	Baliza								
-50			Sonda/Híbrido diana								

Tabla 2 (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Organismo diana	Secuencia 5'-3'	Longitud GC	Contenido GC	En cont. GC	<3 bases purinas autocom. en fila	4 purinas en fila	Longitud repeticiones/ horquilla (max.18)	Palíndromos sec.inversa/ repeticiones/ horquilla	Final
-100	L-01-84	Serratia marcescens	43	72%	no	no	si	no	no	no
-50		CGT GCC AGT TCGCCAGCGGC CG AGA CTC TAG CTT GCC AGT	20	11	55%	si	no	no	no	no
-100		ACT GGC AAG CTA GAG TCT CG								

Tabla 2 (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Organismo diana	Secuencia 5'-3'	Longitud		En cont. GC	<3 bases purinas autocom.	4 purinas en fila	Longitud en fila (max.18)	Palíndromos sec.inversa/ repeticiones/ horquilla	Final
			GC	Contenido GC						
L- 01- 95	-10 <i>Staphylococcus aureus</i>	TGCGGGATT TTC TCG TCG GTT CGC TCG ACT TGC AATCCCGGCA	43	58%	SI	no	SI	no		no
-50		TTC TCG TCG GTT CGC TCG ACT TGC	24	58%	SI		no	no		no
-100		GCA AGT CGA GCG AAC GGA CGA GAA								
L- 01- 96	-10 <i>Staphylococcus aureus</i>	GCAAC TT TCG CAC ATC AGC GTC AGT T GC	28	54%	SI	no	SI	no		no
-50		TT TCG CAC ATC AGC GTC AGT T	21	48%	SI		SI	no		no
-100		A ACT GAC GCT GAT GTG CGA AA								
L- 01- 97	-10 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	CCG TCT ACC ACA CTC TAG TCG GGT AGA GGG	30	57%	SI	no	no	no		no
-50		CCC TCT ACC ACA CTC TAG TCG	21	52%	SI		no	no		no
-100		CGA CTA GAG TGT GGT AGA GGG								
L- 01- 98	-10 <i>Streptococcus agalactiae</i>	GCGCGGCGT ACT CCT ACC AAC GTT CTT CTC TCGCCACGGC	45	67%	no	no	SI	no		no
-50		ACT CCT ACC AAC GTT CTT CTC	21	48%	SI		no	no		no
-100		GAG AAG AAC GTT GGT AGG AGT								
L- 01- 99	-10 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	GGCCTTC GCC GTC CCT TTC TGG TTA GTT GAAGGCC	35	60%	no	no	no	no		no
-50		GCC GTC CCT TTC TGG TTA GTT	21	52%	SI		no	no		no
-100		AAC TAA CCA GAA AGG GAC GGC								
L- 01- 100	-10 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	GCGT TAA GCA AAT GTC ATG CAA CAT CTA CTTAACGC	38	39%	SI	no	SI	no		no
-50		T TAA GCA AAT GTC ATG CAA CAT CTA	25	32%	SI		SI	no		no
-100		TAG ATG TTG CAT GAC ATT TGC TTA A								
L- 01- 101	-10 <i>Streptococcus pyogenes</i>	TGCCCTC GAG CAA TTG CCC CTT TTA AAT TAC GAAGGCA	38	45%	SI	no	no	no		no

Tabla 2 (continuación)

Número de código de diagnóstico de los bucles	Organismo diana	Secuencia 5'-3'	Longitud GC	Contenido GC	En cont. GC	<3 bases purinas en fila	Longitud en fila (max:18)	Palíndromos secuenciales repetitivos horquilla	Final
-50 -100		GAG CAA TTG CCC CTT TTA AAT TAC GTA ATT TAA AAG GGG CAA TTG CTC	24	9 38%	Si		no	no	no
L- 01- 102 -10	Ureaplasma urealyticum	ACGCTC GTT CCC CAA CTC CCT ACT GAGCGT	30	60%	no	no	no	no	no
-50 -100		GTT CCC CAA CTC CCT ACT AGT AGG GAG TTG GGG AAC	18 10	50%	Si		no	Si	no
L- 01- 103 -10	Urogenital- Peptostreptococcus	ACTC CCC CTT GIG TAA GGC AGG GAGT	28	54%	Si	no	no	no	no
-50 -100		CCC CTT GTG TAA GGC AGG CCT GCC TTA CAC AAG GGG	24 11	54%	Si		no	no	no
L- 01- 104 -10	Yersinia enterocolitica	ACGCTC CCC ACT TTG GTC CGA AGA GAGCGT	30	60%	no	no	Si	no	no
-50 -100		CCC ACT TTG GTC CGA AGA TCT TCG GAC CAA AGT GGG	18 10	56%	Si		no	Si	no

Tabla 3 Lista de sondas baliza que funcionan en condiciones idénticas a las de la Tabla 1 y poseen condiciones físicoquímicas muy similares		
Organismo diana	Nombre de la baliza	Secuencia 5'-3'
<i>Acinetobacter spp.</i>	B-Acibact-1	TGCCGGTT <u>TTAGGCCAGATGGCTGCC</u> AATCCCGGCA
<i>Aspergillus fumigatus</i> ,	Aspfum	CCGG <u>CCC CCG AGA GGT</u> GAT ACA T GCCGG
<i>Aspergillus niger</i> ,	Aspnig	CCGGC <u>AAT TAC AAT GCG</u> GAC TCC GAA G CCGG
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ,	B;Klepne-2	ACGCCGGCGT <u>AGG TTA</u> <u>TTA ACC TCA TCG CCT</u> TCGCCAGCGT
<i>Mycobacterium avium</i> Complex,	B.Mycav	CCC <u>GGT GTT GAT ATA</u> <u>AGG CAG GTG</u> CCGGG
<i>Mycobacterium chelonae</i> ,	B-Mchel	CCCGG <u>CA TGA AGT GTG</u> <u>TGG TCC TAT</u> CCGGG
<i>Mycobacterium fortuitum</i> ,	B-Mfort	CCCGG <u>TGA AGC GCG</u> <u>TGG TCA TAT TC</u> CCGGG
<i>Mycobacterium gordonae</i> ,	B-Mgord	CCCGG <u>TGT GTC CTG TGG</u> <u>TCC TAT TC</u> CCGGG
<i>Mycobacterium intracellulare</i> ,	B-Mintra	CCCGG <u>AC ATG CGT CTA</u> <u>AAG GTC CTA</u> CCGGG
<i>Mycobacterium kansasii/gastri</i> ,	B-Mkan	CCCGG <u>TA GAG CTG AGA</u> <u>CGT ATC GAT C</u> CCGG

<i>Mycobacterium malmøense</i> ,	B-Mmalm	CCG CG CCA CTG AAA CGC CCT ATT CGCGG
<i>Mycobacterium smegmatis</i> ,	B-Msmeg	CCCGG CAC GTC GAG GGC TCT GAC CCGGG
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex,	B-Mtb-compl	CCA CCG GAG AGG AAA AGG AGG TGG
<i>Mycobacterium xenopi</i> ,	B-Mxen	CCGCG C CGC TAC CAA ACG CTT TC GCGG
<i>Shigella</i> (alguna <i>E. coli</i>),	B-Shig	CCGGG tca ccc tgt atc gca cgc ct CCCGG
<i>Staphylococcus aureus</i> ,	B-Staphau	TGCCGGATT TTC TCG TCC GTT CGC TCG ACT TGC AATCCCGCA
<i>Streptococcus agalactiae</i> ,	B-Straga-2	GCCGCCGGCGT ACT CCT ACC AAC GTT CTT CTC TCGCCAGCGGC
<i>Streptococcus pyogenes</i> ,	B-Strpyo-C	TGCCTTC GAG CAA TTG CCC CTT TTA AAT TAC GAAGGCA
<i>Citrobacter freundii</i> ,	Citfreu-WI	CCCGGT CGC TTC ATT ACG CTA TGT ATC C ACCGGG
<i>Streptococcus pyogenes</i> ,	B-Strpyo-D	CGCTC GAG CAA TTG CCC CTT TTA AAT TAC GAGCG
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ,	B-Strepne-2	CCGT TAA GCA AAT GTC ATG CAA CAT CTA CTTA ACGG
<i>Streptococci</i> , F111	B-Strept-2	CGCCTTC GCC GTC CCT TTC TGG TTA GTT GAAGGCG
<i>Streptococcus agalactiae</i> ,	B-Straga-3	CCGCT ACT CCT ACC AAC GTT CTT CTC AGCGG
<i>Serratia marcescens</i> ,	B-Sermarc	CCGCTC CG AGA CTC TAG CTT GCC AGT GAGCGG
<i>Pseudomonas</i> spp.,	B-Psspp	CGCTC GGC AGA TTC CTA GGC ATT ACT GAGCG
<i>Staphylococci</i> ,	B-Staphspp-2	CCAAC TT TCG CAC ATC AGC GTC AGT T GG

Salmonella,	B-Sal 1686	<u>CGCTC CTT CAC CTA CGT</u> <u>GTC AGC G</u> GAGCG
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ,	B- Psaer D	CCCGG <u>A AGA CGA CTC</u> <u>GTC ATC AGC T</u> CCGGG
<i>Legionella pneumophila</i> ,	B-Legpne	CC GG <u>ATC TGA CCG TCC</u> <u>CAG GTT</u> CC GG
<i>Klebsiella oxytoca</i> ,	B-Kleboxy	CCGAGGT <u>AGG TTA TTA</u> <u>ACC TCA CTC CCT TCC</u> TCGG
<i>Staphylococcus aureus</i> ,	B-Staur-W1	CCCCT <u>CAA GCT TCT CGT</u> <u>CCG TTC G</u> A GGGG
<i>Listeria monocytogenes</i> ,	Lismon	CCTA <u>GCA TGC GCC ACA</u> <u>TCT TAT CA</u> GCTAGG
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ,	B-Klepne-3	CAGGCTT <u>AGG TTA TTA</u> <u>ACC TCA TCG CCT</u> G
<i>Haemophilus influenzae</i> ,	B-Haeinf	CCCGG <u>CC GCA CTT TCA</u> <u>TCT ICC GAT</u> CCGGG
<i>Burkholderia</i> spp.,	B-Burk. Spp	CCCGG <u>CCA GTC ACC AAT</u> <u>GCA GTT CC</u> CCGGG

<i>Burkholderia cepacia</i> & <i>Burkholderia cenocepacia</i> ,	B-Burcep-cen WI	CCT <u>GCC TA TGT ATT CAG</u> <u>CCA TGG</u> CAGG
<i>Burkholderia mali</i> & <i>Burkholderia pseudomallei</i> ,	B-Burpseumal WI	GGGCC <u>T CGC CTC ACT</u> <u>AGA CCT ATG</u> CCGGG
<i>Burkholderia vietnamensis</i> ,	B-Burviet WI	CCCGG <u>T CGC TTC TCT</u> <u>GGA CCT ATG</u> CCGGG
<i>Burkholderia multivorans</i> ,	B-Burmult WI	CCCGG <u>CTT CAC CCT TCC</u> <u>AGC GCA</u> CCGGG
<i>Burkholderia gladioli</i> ,	B-Burgla WI	CCAGC <u>GG TAC GGT CAC</u> <u>TGT TAA ACT</u> GCTGG
<i>Acinetobacter</i> spp,	B-Acibact-2	CCGTAG <u>ACC ATC CTC</u> <u>TCC CAT ACT CTA</u> CGG
<i>Acinetobacter baumannii</i> ,	B-Acinbaum-3	C <u>CG CTA GGT CCG GTA</u> <u>GCA AGC</u> GG
<i>Aspergillus flavus</i> ,	B-Aspfla-3	CGGCC <u>TAC ATT CCG GGA</u> <u>GCC TTT G</u> GCCG
<i>Aspergillus terreus</i> ,	Aspter	CCGAT <u>CAG ACA CCC CGC</u> <u>CCC ATA</u> GATCGG
<i>Bacteroides/Prevotella</i> ,	B-BacPrev	CCGCG <u>GT GTC TCA GTT</u> <u>CCA ATG TGG G</u> CGCGG
<i>Borrelia burgdorferi</i> + <i>garinii</i> + <i>afzelii</i> + <i>valaisiana</i> ,	B-Borcompi	CCCGG <u>GGT AAC AGA TAA</u> <u>CAA GGG TTG</u> CCCGGG
<i>Bordetella pertussis</i> ,	B-Borper	CCGGG <u>CTC CCC ACA CTT</u> <u>TCG TGC A</u> CCCGG

<i>Escherichia coli</i> ,	B-Ecol-II	CCG <u>GCA AAG AAG CAA</u> <u>GCT TCT TCC</u> CCGG
<i>Gardnerella vaginalis</i> ,	Garvag	CCGCTC <u>CAC CAT GAA</u> <u>GCA ACC CGT</u> GAGCGG
Eu-bacteria,	B-Eub-338	CCGCGT <u>GCT GCC TCC</u> <u>CGT AGG AGT</u> CGCGG
<i>Enterococcus faecium</i> ,	B-Encoc-lum	C <u>TTC AAA TCA AAA CCA</u> <u>TGC GGT TTC</u> ATTGAAG
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ,	B-Sternal-2	CCCGGA <u>CCC TCT ACC</u> <u>ACA CTC TAG TCG</u> CCGGG
<i>Enterococcus faecalis</i> ,	B-Encoc-alis-1	CAACCA <u>CCC TCT GAT</u> <u>GGG TAG GTT</u> G
Enterococci,	B-Entcoc	CCCGG <u>CATC CAT CAG</u> <u>CGA CAC CCG CCG</u> GG
Enterobacteriaceae,	B-Entero-1247	CCCGG <u>TCT CGC GAG GTC</u> <u>GCT TCT</u> CCGGG
<i>Clostridium perfringens</i> ,	B-Cloper-Cp2-10	GCATCA <u>G ATT GCT CCT</u> <u>TTG GTT GAA TGA TG</u> C

<i>Clostridium</i> spp.,	B-Closp	CCC <u>GG TAC CGT CAT TAT</u> <u>CGT CCC</u> CCGGG
<i>Chlamydia trachomatis</i> ,	ChlraA	CCGC <u>TCG GAT GCC CAA</u> <u>ATA TCGC</u> GG
<i>Candida dubliniensis</i> ,	B-Can-dub	CCCGG <u>C CCG AAA GAG</u> <u>TAA CTT GCA AAA</u> CCGGG
<i>Candida glabrata</i> ,	B-Cangla	CCCGG <u>AGG CAA GGG</u> <u>GCG CAA AA</u> CCGGG
<i>Candida krusei</i> , (<i>Issatchenkia orientalis</i>)	B-Cankru	CCGTGA <u>CCT GCA GCA</u> <u>AGA ACC GAT</u> CACGG
<i>Candida lusitanae</i> , (<i>Clavispora lusitanae</i>)	B.Canlus	CACT <u>G CCG ACT CAG ACC</u> <u>ACG AAA</u> GCAGTG
<i>Candida albicans</i> ,	B-Canalb-3	CCGCG <u>TT TAC ACA GAC</u> <u>CCG GGT CAT</u> CGCGG
<i>Candida tropicalis</i> ,	B-Cantrop	CCTCGG <u>AC ATT CCA ACG</u> <u>CAA TTC TCCTAC</u> CGAGG
<i>Candida parapsilosis</i> ,	B-Can-para	CCCGG <u>CAC ATT TCT TTG</u> <u>CAC TTA TCC TAC</u> CCGGG

<i>Chlamydia pneumoniae</i> ,	B-Chlapneu	CCGGG <u>CTC TTC CTC AAC</u> <u>CGA AAG GT</u> CCGG
<i>Chlamydia psittaci</i> group,	B-S-S-Cps-1414-a-A-18	CCGG <u>AAG GCA AAA CCA</u> <u>ACT CCC AT</u> CCGG
<i>Campylobacter</i> (patógenas termófilas),	B-Ctherm	CCCGG <u>GCC CTA AGC GTC</u> <u>CTT CCA</u> CCGGG
<i>Campylobacter coli</i> ,	B-Cpcoli	CGCTC <u>TCG ATG GCA TCA</u> <u>GGG GTT</u> GAGCG
<i>Campylobacter lari</i> ,	Clari	CCCGG <u>CCC GAA GTG TTA</u> <u>GCA ACT AAA TC</u> GCCGGG
<i>Campylobacter jejuni</i> ,	B-Cjj	CCGGG <u>TA AGC TAA CCA</u> <u>CAC CTT ATA CCG</u> CCGG
<i>Campylobacter upsaliensis</i> ,	B-Cpups	CCCGGGC <u>CGT GTG TCG</u> <u>CCC TAG GCG TA</u> GCCCCGG
<i>Pneumocystis carinii</i> ,	B-Pncarl	CCCTGC <u>TA TCC AGT AAC</u> <u>TGA AAC CGA TGC</u> AGGG
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> ,	B-Myplapn	CCTCCG <u>TGA TAG CTG</u> <u>TTT CCA ACT ACC GGA</u> GG
<i>Cryptococcus neoformans</i> ,	B-Cryneo	CCTGG <u>TAT GAT TCA CCA</u> <u>TAG AGG GCC</u> AGG
EHEC,	B-EHEC	CCCG <u>GT CAC CCC ATA</u> <u>AAA GAG GCT</u> CCGGG
<i>Neisseria meningitidis</i> ,	B-Neimeng	CACCG <u>TTA TCC CCC ACT</u> <u>ACT CCG</u> TG
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ,	B-Neigon	CCCGG <u>ACC CCG CCA</u> <u>ACC AGC TAA</u> CCGGG
<i>Clostridium difficile</i> ,	B-Clodiff	CGGGT <u>CGA AGT AAA TCG</u> <u>CTC AAC TTG CA</u> CCGG
<i>Clostridium botulinum</i> ,	B-Clobot	CG TT <u>GC CGT TTC ATG</u> <u>CGA AAC TAC AA</u> CG
<i>Clostridium tetani</i> ,	B-Clotet	CCGG AA <u>CT GTG TTA CTC</u> <u>ACC CGT CCG</u> G
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> ,	B-Pepan	CCGGC <u>CTT TGA TAT ATC</u> <u>TAC GAT GCC G</u> G
<i>Peptostreptococcus magnus</i> ,	B-pepmag	CCGC <u>CTA ATC CGA AAT</u> <u>GAA TTC TGG CG</u> G

<i>Peptostreptococcus magnus</i> ,	B-pepmag	CCGCC <u>ATG TGT TTC TAC</u> <u>GAT TTT ATG CGG</u> CGG
<i>Peptostreptococcus micros</i> ,	B-Pepmic	CCCGG <u>ACT TTC ATT TCA</u> <u>TTT CCA TTC CCG</u> GG
<i>Enterococcus faecalis</i> ,	B-Encoc-alls-2	CCATCG <u>GCA CTC GGG</u> <u>AGG AAA GAA G</u> CGATGG
<i>Enterococcus faecium</i> ,	B-entfae-1	CGC <u>CCA TGC GGT TTT</u> <u>GAT TGT TAT AC</u> GGGCG
<i>Enterococcus casseliflavus</i> ,	B-Entcas	CCGCG <u>CAA GGG ACG</u> <u>AAC ATT TTA CTC TC</u> GCGG
<i>Enterococcus gallinarum</i> ,	B-entfae-2	CCGCG <u>CAA GGG ATG</u> <u>AAC GTT CTA CTC</u> GCGG
<i>Candida albicans</i> ,	B-Canalb-2	CCCGG <u>TTT CCT TCT GGG</u> <u>TAG CCA TT</u> CCGGG
<i>Morganella morganii</i> (<i>Proteus morganii</i>),	B.Mormorg	CCGG <u>CAA GAC TCT AGC</u> <u>TGA CCA GTA TC</u> GCCGG
<i>Proteus mirabilis</i> ,	B-Protmir	CG <u>CCGATA GTG CAA GGT</u> <u>CCG AAG</u> CGGCG
<i>Proteus vulgaris</i> ,	B-Protvul	CCG <u>CCG TAG ACG TCA</u> <u>TGC GGT A</u> GGCGG
<i>Treponema pallidum</i> ,		CCCGG <u>TCC GCC ACT CTA</u> <u>GAG AAA CG</u> CCGGG
	B-Trepal	
<i>Trichomonas vaginalis</i> ,		CCCGG <u>GAA TGG CGT</u> <u>GCC TCT GAT GA</u> CCGGG
	B-Trivag	
<i>Micrococci</i> ,	B-Micoc	CCCGG <u>ACC TCA CAG TAT</u> <u>CGC AAC C</u> GGG
<i>Lactobacillus brevis</i> ,	B-Lacbre	CGG <u>CCG CGG GAT CAT</u> <u>CCA GAA</u> GGCCG
<i>Yersinia enterocolitica</i> ,	B-Yerent	CCCGG <u>ATC TCT GCT AAA</u> <u>TTT CGT GGA TG</u> CCGGG

<i>Bacillus cereus</i> ,	B-Baccer	CCATAC <u>CAC TCT GCT</u> <u>CCC GAA GG</u> TATGG
<i>Vibrio cholerae</i> ,	B-Vibchol	CTGAT <u>GCA TAT CCG GTA</u> <u>GCG CAA G</u> CATCAG
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ,	B-Vibpara	CCCGG <u>TGC AGC TAT TAA</u> <u>CTA CAC TAC C</u> CCGGG
<i>Cryptosporidium spp.</i> ,	B-Crypt	CCGTA <u>CAT AAG GTG CTG</u> <u>AAG GAG TAA G</u> TACGG
<i>Coxiella burnetii</i> ,	B-Cox	CCGGG <u>ACC CTT GAG AAT</u> <u>TTC TTC CCC</u> GG
<i>Bartonella spp.</i> ,	B-Bart	CCG <u>GCA CAA ATT TCT</u> <u>CTG TGT TAT TCC G</u> CCGG
<i>Enterobacter sakazakii</i> ,	B-Entsak	CCCGG <u>TCT CTG CAG GAT</u> <u>TCT CTG GAT G</u> CCGGG
<i>Enterobacter cloacae</i> ,	B-Entclo	
<i>Enterobacter aerogenes</i> ,	B-Entaer	
<i>Ehrlichia spp.</i> ,	B-Ehrlich	CCGC <u>GCT AAT CTA ACG</u> <u>TAG GCT CAT C</u> GCGG
<i>Rickettsia spp.</i> ,	B-Rickssp	CCGCG <u>CAC TCA CTC GGT</u> <u>ATT GCT GGA T</u> CGCGG
<i>Rickettsia spotted fever complex</i> ,	B-Rickspot	CTA <u>GCC CCA ATT AGT</u> <u>CCG TTC G</u> GCTAG
<i>Rickettsia typhi complex</i> ,	B-Ricktyph	CG <u>CCC GTC TGC CAC</u> <u>TAA TTA ACT A</u> GGGCG
<i>Leishmania spp.</i> ,	B-Leisch	CCCGG <u>AAA AGG CGT TAC</u> <u>GGC CCG</u> G
<i>Toxoplasma gondii</i> ,	B-Toxgan	CCGGC <u>TCC AGG GGA</u> <u>AGA GGC ATG</u> CCGG
<i>Yeast spp.</i> ,	B-Yeast	CCCG <u>GGT ATT TAC ATT</u> <u>GTA CTC ATT CCA A</u> CCGGG
<i>Francisella tularensis</i> ,	B-Frantul	CCAT <u>GCG ACA GCC CGA</u> <u>AAG CCA</u> GCATGG
<i>Lactobacillus spp. A</i> ,	B-lactssp-A	CCC <u>GGA GTT CCA CTG</u> <u>TCC TCT TC</u> CCGGG
<i>Lactobacillus spp. B</i> ,	B-lactssp-B	CCCGG <u>ATC AGT CTC TCA</u> <u>ACT CCG C</u> CCGG
<i>Burkholderia cepacia complex</i>	B-Bcc	CCC <u>GGTGGCAACCCTCTGTTC</u> CCGGG
<i>Staphylococcus aureus</i> ,	B-Staur-3	CCT <u>G CAA GCT TCT</u> <u>CGT CCG TTC GC</u> AGG
<i>Burkholderia ambifaria</i>	B-Burkamp	Pendiente debido a falta de secuencias 23S

<i>Burkholderia antina</i>	B-Burkant	Pendiente debido a falta de secuencias 23S
<i>Burkholderia dolosa</i>	B-Burkdol	Pendiente debido a falta de secuencias 23S
<i>Burkholderia pyrocinia</i>	B-Burkpyrr	Pendiente debido a falta de secuencias 23S
<i>Burkholderia stabilis</i>	B-Burkstab	Pendiente debido a falta de secuencias 23S
<i>Lactobacilli</i> ,		
<i>Candida spp</i> ,	see Yeast	
<i>Lactobacilli</i> ,		
<i>Staphylococcus corosus</i> ,		
<i>Staphylococcus aureus</i> ,	B-Staur	CCCCT CAA GCT TCT CGT CCG TTC G AGGGG
Eu-bacteria,	B-Eub-338	CCGCGT GCT GCC TCC CGT AGG AGT CGCGG
Eu-bacteria,	B-Eub-338	CCGCGT GCT GCC TCC CGT AGG AGT CGCGG
Eu-bacteria,	B-Eub-338	CCGCGT GCT GCC TCC CGT AGG AGT CGCGG
Eu-bacteria,	B-Eub-338	CCGCGT GCT GCC TCC CGT AGG AGT CGCGG

Tabla 4

1/16

Número de código	Organismo diana	Nombre de la sonda	Sondas activas en los kits						Secuencia de la sonda	Secuencia de la diana	rRNA	Alineamiento con E. coli	Puntuación de Fuchs
			Sum	BC, Gram (-)	BC, Gram (+)	Pneumonia	Fibrosis quística	Heces					
1M-01-251	Achromobacter xylosoxidans	B-Achxyl	0						TCC AAT AGT GCA AGG TCT TGC	GCA AGA CCT TGC ACT ATT GGA	16S	209-229	4,3
2M-01-236	Acinetobacter baumannii	B-Acinbaum-IV	0						TT CAC ATC CGA CTT AAT AAG CCG CCT	AGG CGG CTT ATT AAG TCG GAT GTG AA	16S	588 - 610	5,3
3M-01-137	Acinetobacter spp.	B-Acibact-2	0						ACC ATC CTC TCC CAT ACT CTA	TAG AGT ATG GGA GAG GAT GGT	16S	662-672	2,8
4M-01-237	Bacillus cereus group	B-Bacter-II	0						T GCG GTT CAA AAT GTT ATC CCG TAT	ATA CCG GAT AAC ATT TTG AAC CCG A	16S	175 - 205	3,0
5M-01-141	Bacteroides Prevotella	B-BacPrev	0						GT GTC TCA GTT CCA ATG TGG G	CCC A CAT TGG AAC TGA GAC AC	16S	310-329	2,8
6M-01-214	Burkholderia cepacia complex	B-Boc	1					1	GG TTG GCA ACC CTC TGT TCC	GGA ACA GAG GGT TGC CAA CC	16S	1249-1263	2,5
5M-01-165	Campylobacter (Termofilas patógenas)	B-Ctherm	1					1	GCC CTA AGC GTC CTT CCA	TGG AAG GAC GCT TAG GGC	23S	1420-1437	2,0
6M-01-231	Citrobacter freundii	Citfren-Will	1	1					GCC AGT TTC GGA TGC AGT TCC	GGA ACT GCA TCC GAA ACT GGC	16S	628 - 643	5,6
7M-01-176	Clostridium difficile	B-Clodiff	1					1	1CGA AGT AAA TCG CTC AAC TTG CA	TGC AAG TTG AGC GAT TTA CTT CG	16S	62-94	2,6
8M-01-232	Clostridium perfringens	B-Clasper-II	1		1				GAG GTG TTG AAA CCC CCA CAC	GTG TGG GGG TTT CAA CAC CTC	16S	840 - 860	3,7
9M-01-233	Clostridium spp.	B-Claspp	0						CC TTT ACG CCC AGT AAA TCC GG	CC GGA TTT ACT GGG CGT AAA GG	16S	560 - 580	3,0
10M-01-272	Corynebacterium spp	Corssp	0						CC CGG AAT TTC ACA GAC GAC	CTC GTC TGT GAA ATT CCG GG	16S	605 - 625	6,5
9M-01-298	Corynebacterium spp	SB-Corssp	0						CC CGG AAT TTC ACA GAC GAC	GTC GTC TGT GAA ATT CCG GG	16S	600-620	5,0
10M-01-270	E. coli/Shigella	EcoShi	1	1					CAATGACAAAGGTATTACCTTTACTC	GAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTC	16S	455-480	6,0
11M-01-228	EFEC	B-EHEC-II	1						1A GTC ACA CAG ATT GCT CTG TGC	GCA CAG AGC AAT CTG TGT GAC T	23S	540 - 560	3,0

Tabla 4

2/16

#	Número de código	Organismo diana	Nombre de la sonda	Sondas activas en los kits					Secuencia de la sonda	Secuencia de la diana	rRNA	Alineamiento con E.coli	Puntuación de Fuchs
				Sum	BC, Gram (-)	BC, Gram (+)	Pneumonia	Fibrosis quística	Heces				
12	M-01-256	Enterobacter aerogenes + cloacae + intermedia + otros	B-Enthec-II	0						A AGA CTC TAG CCT GCC AGT TTC	GMA ACT GGC AGG CTA GAG TCT T	16S 602-623	5,3
13	M-01-259	Enterobacter sakazakii	SB-EntSak-I	0						CTC CCG CAT CTC TGC AGG A	T CCT GCA GAG ATG CGG GAG	16S 1010 - 1025	5,0
14	M-01-259	Enterobacter sakazakii	SB-EntSak-II	0						CTC CCG CAT CTC TGC AGG A	T CCT GCA GAG ATG CGG GAG	16S 1005-1025	5,5
13	M-01-273	Enterobacteriaceae	Eublae	1	1					AC CGT TTC CAG TAG TTA TCC CCC	GGG GGA TAA CTA CTG GAA ACG GT	16S 143 - 160	3,0
14	M-01-269	Enterococci	Entcoc III	0						C CAT CAG CGA CAC CCG AAA G	C TTT CCG GTG TCG CTG ATG G	16S 227 - 247	4,0
15	M-01-228	Enterococci	B-Entcoc-II	0						TTA AGA AAC CGC CTG CGC TCG CTT	AAG CGA GCG CAG GCG GTT TCT TAA	16S 593 - 618	6,0
16	M-01-182	Enterococcus faecalis	B-Entalis-2	1	1					GCA CTC GGG AGG AAA GAA G	CTT CTT TCC TCC CGA GTG C	16S 69-83	2,3
17	M-01-235	Enterococcus faecium	B-Entlum-II	1	1					GC GCC TTT CAA ATC AAA ACC ATG	CG CAT GGT TTT GAT TTG AAA GGC	16S 200 - 230	4,0
18	M-01-227	Escherichia coli	B-E.coli III	0						G AGC AAG TCG CTT CAC CTA CAT	GAT ATG TAG GTG AAG CGA CTT GCT	23S 1710-1730	4,0
17	M-01-130	Haemophilus influenzae	B-Haeinfl	2	1			1		CC GCA CTT TCA TCT TCC GAT	ATC GGA AGA TGA AAG TGC GG	16S 184-203	2,7
18	M-01-294	Influenza virus	SB-InqLum	1				1		CT TGG ATT CAA GCC CGC CC	GG GCG GGC TTG AAT CCA AG	16S 645-662	4,7
19	M-01-271	K. pneumoniae-5	Kepne-5	0						GTC ACA CCC GAA GGT GCT	AGC ACC TTC GGG TGT GAC	23S 538 - 558	2,3
20	M-01-253	Klebsiella oxytoca	B-Koxy-II	2	1				1	CCATGAGCAAGTCACCTTCACCTTA	TAAGTGAAGTGACTTGCTCATGG	23S 1718 - 1741	4,5
21	M-01-293	Klebsiella pneumoniae	SB-Klepne-6	2	1			1		GTC ACA CCC GAA GGT GCT	AGC ACC TTC GGG TGT GAC	23S 538-556	2,0
22	M-01-294	Klebsiella pneumoniae	B-Klepne-4	0						T CCA AAT CGA CAT CGT TTA CGG	ACG CCG TAA ACG ATG TCG ATT TGG	16S 815-835	3,5

Tabla 4

3/16

#Número de código	Organismo diana	Nombre de la sonda	Sondas activas en los kits					Secuencia de la sonda	Secuencia de la diana	rRNA	Alineamiento con E. coli	Puntuación de Fuchs
			Sum	BC, Gram (-)	BC, Gram (+)	Pneumonia	Fibrosis quística	Heces				
21/M-01-222	<i>Listeria monocytogenes</i>	B-Lmo-II	1			1			G CAT GCG CGA CAC TTT ATC	16S	180 - 203	3,0
22/M-01-280	<i>Mycobacterium avium</i>	SB-Mycav-A	1			1			GCT CGC TCC CAA AAG GG	16S	1400-1490	4,0
23/M-01-291	<i>Mycobacterium avium</i>	SB-Mycav-B	1			1			GCT CCC TCC CAA AAG GG	16S	1490-1490	4,0
24/M-01-175	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	B-Neigon	0						ACC CGC CGA ACC AGC TAA	16S	244-261	3,0
25/M-01-174	<i>Neisseria meningitidis</i>	B-Neimeng	0						TTA TCC CCC ACT ACT CGG	16S	135-152	3,0
26/M-01-295	<i>Pandorea apista</i>	SB-Panapi	1				1		AC CTC GCG GCT TGG CGA	16S	1258-1275	3,2
25/M-01-286	<i>Pandorea spp.</i>	SB-PanappA	1				1		GC CTT GCA GTC AC3 AAT GC	16S	603-652	5,3
26/M-01-285	<i>Pandorea spp. B</i>	SB-PanappB	1				1		C CCC GAG GTA TTA ACC CAG	16S	480-488	5,2
27/M-01-247	<i>Propionibacterium acnes</i>	B-propaen	0						AC CCC ACA AAA GCA GGG CC	23S	540 - 560	3,0
28/M-01-250	<i>Propionibacterium acnes</i>	B-propaen	0						CAC CCC ACA AAA GCA GGG CCT	23S	540 - 560	3,0
29/M-01-188	<i>Proteus mirabilis</i>	B-Protnir	1	1					CCG ATA GTG CAA GGT CCG AAG	16S	207-227	3,5
30/M-01-189	<i>Proteus vulgaris</i>	B-Protvul	1	1					C CGT AGA CGT CAT GCG GTA	16S	174-191	3,3
29/M-01-292	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SB-Pseae-E	3	1		1	1		CCC ACC CGA GGT GCT G	16S	1130-1150	3,5
30/M-01-121	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	B- Pseae D	0						A AGA CGA CTC GTC ATC AGC T	23S	1518-1536	4,0
31/M-01-287	<i>Raistonia spp. A</i>	SB-RaistppA	0						GCA TGA GGC CTT GCG GTC	16S	205-222	4,0
32/M-01-288	<i>Raistonia spp. B</i>	SB-RaistppB	1				1		TCG GTC TTG CAC AAC CGC	16S	585-605	8,0
33/M-01-289	<i>Raistonia spp. C</i>	SB-RaistppC	2				1	1	CTA ATG GCA TCT CTG CTT CGT TAG	16S	1005-1025	5,5
34/M-01-275	<i>S. lugdunensis</i>	Statug	1				1		CA TCC TTT GAC CGC TCT AGA G	16s	1010 - 1030	5,0

Tabla 4

4/16

#	Número de código	Organismo diana	Nombre de la sonda	Sondas activas en los kits					Secuencia de la sonda	Secuencia de la diana	rRNA	Alineamiento con E. coli	Puntuación de Fuchs
				Sum	BC, Gram (-)	BC, Gram (+)	Pneumonia	Fibrosis quística					
33	M-01-120	Salmonella	B-Sal-1088	2	1				1CTT CAC GTA CGT GTC AGC G	C GCT GAC ACG TAG GTG AAG	23S	1705-1724	2,5
34	M-01-238	Serratia marcescens	B-Serratia-II	1	1				CG TAT TAA GCT CAC CAC CTT CCT	AGG AAG GTG GTG AGC TTA ATA CG	16S	445 - 490	3,2
35	M-01-239	Shigella	B-Shig-II	0					AAG TCG GGA TGA CCC CCT TGC	GCA AGG GGG TCA TCC CGA CTT	23S	879 - 895	4,5
36	M-01-248	Shigella	B-Shig-III	0					TGA GCA MAG GTA TTA ACT TTA CTC	GAG TAA AGT TAA TAC CTT TGC TCA	16S	455 - 478	2,0
37	M-01-276	Shigella	B-Shig-III	1					1TGA GCA MAG GTA TTA ACT TTA CTC	GAG TAA AGT TAA TAC CTT TGC TCA	16S	455 - 478	6,0
38	M-01-287	Shigella spp.	B-Shigapp-4	0					AAGTCGGATGACCCCTTGC	GCA AGG GGG TCA TCC CGA CTT	23S	879-895	1,7
37	M-01-119	Staphylococcus	B-Staphapp-2	3	1	1	1	1	TT TCG CAC ATC AGC GTC AGT T	A ACT GAC GCT GAT GTG CGA AA	16S	748-768	4,3
38	M-01-215	Staphylococcus aureus	B-Staur-3	1	1				G CAA GCT TGT COT CCG TTC GC	GC GAA CGG ACG AGA AGC TTG C	16S	66-88	2,5
39	M-01-274	Staphylococcus epidermidis	Stalug	0					C TCT AGA GCG GTC AAA GGA TG	C TCT AGA GCG GTC AAA GGA TG	16S	985 - 1015	5,0
40	M-01-148	Stenotrophomonas maltophilia	B-Sterna-2	3	1	1	1	1	CCC TCT ACC ACA CTC TAG TCG	CGA CTA GAG TGT GGT AGA GGG	16S	647-667	5,0
41	M-01-116	Streptococcus agalactiae	B-Straga-3	1		1			ACT CCT ACC AAC GTT CTT CTC	GAG AAG AAC GTT GGT AGG AGT	16S	445-465	3,0
42	M-01-114	Streptococcus pneumoniae	B-Strepne-2	1		1			T TAA GCA ATG GTC ATG CAA CAT	TAG ATG TTG CAT GAC ATT TGC TTA A	16S	185-200	2,0
41	M-01-249	Streptococcus pneumoniae	B-Strepne-3	2		1	1	1	CT GGT AGT GAT GCA AGT GCA C	G TGC ACT TGC ATC ACT ACC AG	16S	207 - 227	2,6
42	M-01-113	Streptococcus pyogenes	B-Stropy-D	2		1	1		GAG CAA TTG CCC CTT TTA AAT TAC	GTA ATT TAA AAG GGG CAA TTG CTC	16S	194-214	2,0
43	M-01-230	Streptococcus spp.	B-Strept-III	2		1	1		GCA CGT AGT TAG CCG TCC CTT TCT	AGA AAG GGA CCG CTA ACT ACG TGC	16S	508 - 528	4,0
44	M-01-267	Yersinia enterocolitica	B-Yers-III	1					1A GTT ATT GGC CTT CCT CCT CG	C GAG GAG GAA GGC CAA TAA CT	16S	418-436	3,3
45	M-01-221	Yersinia enterocolitica	B-Yers-II	0					C ACA TCC GAT GGC GTG AGG	CCT CAC GCC ATC GGA TGT G	16S	215 - 232	4,7

Tabla 4

5/16

#	Número de código	Organismo diana	Nombre de la sonda	Auxiliar II					Auxiliar I					Secuencia 5'-3' de la baliza
				Secuencia	ΔG	ΔH	ΔS	T _m (°C)	Auxiliar 5' - A-I	ΔG	ΔH	ΔS	T _m (°C)	
1	M-01-251	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-Achyl	GTA GGG CGT ATG CGG TAT TAG	-22,8	-195,5	-514,6	73,3	GAT CCC CTG CTT TCC CCC	-22,5	-183,4	-473,5	73,4	CCCGGGG TCG AAT AGT GCA AGG TCT TGC CCGGG
2	M-01-236	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-Achyl	GTAATCCGATTAA CGCTCGC	-20,0	-194,0	-518,5	68,3	ACGACGCTTTAGG CCGA	-21,7	-164,8	-425,9	72,9	CCGGCG TT CAC ATC CGA CTT AAT AAG CGG CCT CCGCG
3	M-01-137	<i>Acinetobacter spp.</i>	B-Achyl-2	TTC CCA AGT TAA GCT CGG G	-20,8	-174,6	-459,5	69,8	GCT CAC CAG TAT CGA ATG CAA	-21,7	-208,8	-552,3	70,4	CCGTAG AGC ATC CTC TCC CAT ACT CTA CCG
4	M-01-237	<i>Bacillus cereus</i> group	B-Bacter-II	GAGTTATCCAGTC TTATGGG	-20,8	-197,0	-525,2	69,5	TAGCCCGGTTTCC CG	-20,2	-147,0	-377,9	70,6	CCGGGC T GCG GTT CAA AAT GTT ATC CCG TAT GCGCG
5	M-01-141	<i>Bacteroides (Prevotella) sp.</i>	B-Bacter-III	CCTATCCATCGAAG GCTAG	-20,2	-208,9	-562,3	68,2	GGACCTTCCTCTCA GAAAC	-20,8	-189,8	-503,6	69,9	CCGGCG GT GTC TCA GTT CCA ATG TGG G CCGCG
6	M-01-214	<i>Burkholderia cepacia</i> complex	B-Boc	GAGGCGCTACCCAT AAGG	-20,6	-172,8	-454,0	69,9	GACCATGTATGAC GTGT	-17,3	-172,3	-462,4	63,3	CCC GGTGGCAACCTCTGTTC CCGGG
7	M-01-166	<i>Campylobacter (termofilas) patogenicas</i>	B-Cherm	AATATTACCAATTG GCCATCGTCT	-20,2	-208,9	-552,3	68,2	TGGCACACTAATGT TGGTATTGG	-21,0	-208,2	-557,8	69,6	CCCGG GCG GTA AGC GTC GTT CCA CCGGG
8	M-01-231	<i>Citrobacter freundii</i>	Cifreu-WIII	ATTTCACATCCGAC TTGACAGA	-20,0	-203,4	-546,5	68,0	CAGGTTGAGCCCG GGG	-20,3	-161,7	-421,4	70,1	CCGC GCC AGT TTC GGA TGC AGT TCC CCGG
9	M-01-176	<i>Clostridium difficile</i>	B-Clodiff	CAGCGTTTCATCTG AGCC	-20,8	-183,9	-486,2	70,0	TGTGTAGGCAACGC GCG	-20,2	-165,9	-434,3	69,8	CGGOT CGA AGT AAA TCG CTC AAC TTG CA CCG
10	M-01-232	<i>Clostridium perfringens</i>	B-Clodiff-II	GGACTACCAAGGTA TCTAAT	-20,8	-189,9	-504,6	69,4	CTAGTATCATCGTT TACGGCGT	-21,2	-198,8	-523,3	70,3	CCGTC GAG GTG TTG AAA CCC CCA CAC GACGG
11	M-01-233	<i>Clostridium spp.</i>	B-Clodiff	TATTACCGCGCTG CTGG	-21,3	-170,2	-443,6	71,5	ATAAGCTCGCCAC GTAG	-21,2	-174,4	-456,5	71,3	CCG CC TTT ACG CCC AGT AAA TCG GCG CCG
12	M-01-272	<i>Corynebacterium spp</i>	Coropp	TT TAC GCG CAG TAA TTC CCG A	-21,6	-198,5	-527,5	70,8	GTT AAG C ACA AAC CAC CTA CGA GCT C	-20,4	-215,6	-582,0	68,2	CCCGCG CC CCG AAT TTC ACA GAG GAC CCGCG
13	M-01-298	<i>Corynebacterium spp</i>	SB-Coropp	TT TAC GCG CAG TAA TTC CCG A	-21,6	-198,5	-527,5	70,8	GTT AAG C ACA AAC CAC CTA CGA GCT C	-20,4	-215,6	-582,0	68,2	CCCGCG CC CCG AAT TTC ACA GAG GAC CCGCG
14	M-01-270	<i>E. coli/Shigella</i>	EcoShi	AG TAC TTT ACA ACC CGA AGG C	-20,8	-188,8	-501,1	69,7	CGTT CCT CCC CGC TGA A	-21,3	-174,9	-455,2	71,2	CCCTGC CAATGAGCAAGGTATTAACCTTACTG CCGAGG
15	M-01-229	<i>EHEC</i>	B-EHEC-II	CGGTTTCAGGTCT TTTTCACTC	-20,5	-200,8	-564,2	68,6	TCCCACTGCTGTGA CGTACA	-20,9	-191,5	-506,5	69,9	CCGGGC A GTC ACA CAG ATT GCT CTG TGC GCGCG

Tabla 4

E/16

#Número de código	Organismo diana	Nombre de la sonda	Auxiliar II					Auxiliar I					Secuencia 5'-3' de la baliza
			Secuencia	ΔG	ΔH	ΔS	T _m (°C)	Auxiliar 5' - A-I	ΔG	ΔH	ΔS	T _m (°C)	
12M-01-266	Enterobacter aerogenes + cloacae + intermedii + otros	B-Enterob-II	C CGC GGG GAT TTC ACA TCC	-20,9	-175,7	-461,7	70,4	GGA ATT CTA CCC CCC TCT A	-21,5	-184,7	-486,5	71,3	CGCCGGG AAGA CTC TAG CCI GCG AGT TTC CCCC GCG
13M-01-269	Enterobacter sakazaki	SB-EntSak-I	AAG GTT CTT CGC GTT GCA TCG	-21,5	-198,5	-528,5	70,7	TCA GAG TTC CCG AAG GCA GGT	-20,8	-190,8	-506,9	69,7	CCGCCT CTC CCG CAT CTC TGC AGG A AGCGG
14M-01-269	Enterobacter sakazaki	SB-EntSak-II	AAG GTT CTT CGC GTT GCA TCG	-21,5	-198,5	-528,5	70,7	TCA GAG TTC CCG AAG GCA GGT	-20,8	-190,8	-506,9	69,7	CCGCCT CTC CCG CAT CTC TGC AGG A AGCGG
13M-01-273	Enterobacteriaceae	Eubiae	GA CAT TAC TCA CCC GTC CG	-21,0	-169,0	-501,4	69,8	TCC ATC AGG CAG TTT CCC A	-21,3	-182,3	-480,4	70,7	CTCGCG GGT TTC CAG TAG TTA TCC CCG CGCGAG
14M-01-269	Enterococci	Entroc III	GGT TTC GAT TGT TAT ACC GTA TTA	-20,3	-202,5	-543,6	69,2	CG CCT TTC AAA TCA AAA CCA TGC	-21,0	-206,9	-554,6	69,3	CGGC C CAT CAG CGA CAC CCG AAA G GCG
15M-01-228	Enterococci	B-Enteroc-II	AACGGTTGCCACCT ACGTA	-20,7	-181,5	-479,1	70,1	TACGCCCAATTAAT CCGGAC	-20,0	-178,4	-472,0	68,8	CCCGCGG TTA AGA AAC CCG CTG CCG TCG CTT CGCGCGG
16M-01-182	Enterococcus faecalis	B-Entalis-2	ACGCCGCCACGCTT CG	-21,1	-165,6	-430,8	71,5	CGTTCGACTTGCAT GTATTAGGC	-21,9	-207,8	-553,9	71,1	CCATCG GCA CTC GGG AGG AAA GAA G CGATGG
17M-01-236	Enterococcus faecium	B-Entium-II	CCTGTTTCCAAAGTG TTA TCC	-20,0	-186,5	-525,9	68,2	GTTCGATTGTTATA CCGTATTAGCA	-21,1	-221,5	-587,1	69,3	C GC GCC TTT CAA ATC AAA ACC ATG CG CG
18M-01-227	Escherichia coli	B-E.coli III	AGTTACGGCACCAT TTTGCC	-20,2	-184,5	-489,8	68,9	ACCGTGCTCTCTCC CGA	-21,0	-171,6	-448,8	71,1	CGGC G AGC AAG TCG CTT CAC CTA CAT ATC GCG
17M-01-130	Haemophilus influenzae	B-HaeInf	TTTCCCGTCGTTAT CCGCC	-21,4	-185,6	-489,4	71,1	ATACGCGGTATTA GCGACAG	-20,3	-177,3	-467,8	69,4	CCCGG CC GCA CTT TCA TCT TCC GAT CCGG
18M-01-254	Influenza limosus	SB-InqLum	TGA GCG CGG GGC TTT CAC	-23,2	-188,5	-493,3	74,0	G TAT CAA ATG CAG TTC CCA GGT	-23,0	-211,5	-562,3	72,4	CGTAGCG CTTGG ATT CAA GCG GCG DG CGCTACG
19M-01-271	K. pneumoniae-5	Klepne-5	CCCACTGCTTGATC GTACAC	-21,9	-194,5	-514,8	71,3	G GTT TCA GGT TCT TTT TCA CTC C	-22,1	-219,0	-587,5	71,3	CGCCAC GTC ACA CCG GAA GGT GGT GTGGGG
20M-01-253	Klebsiella oxyfoca	B-Kleboxy-II	MGA AGT TAC GGC ACC ATT TTG C	-21,3	-204,0	-544,6	70,1	C CAT CAG CGT GCG TTC TCC	-22,0	-189,7	-499,8	72,1	CGCGCG CCA TGA GCA AGI CAC TTC ACT TA CCGCGG
21M-01-283	Klebsiella pneumoniae	SB-Klepne-6	G GTT TCA GGT TCT TTT TCA CTC C	-22,9	-219,0	-587,5	70,5	CCG ACT GCT TGT ACG TAC AC	-21,8	-184,5	-514,9	71,3	CGTCCGGT GTC ACA CCG GAA GGT GGT GTACGGAG
22M-01-234	Klebsiella pneumoniae	B-Klepne-4	ATCCTGTTTGCTCC CCAC	-20,0	-172,0	-453,0	69,0	GGACTACAGGGTA TCTA	-20,4	-184,9	-520,1	68,9	CGGGG C T CCA AAT CGA CAT CGT TTA CCG CGT GCCCGG

Tabla 4

7/16

#Número de código	Organismo diana	Nombre de la sonda	Auxiliar II					Auxiliar I					Secuencia 5'-3' de la baliza
			Secuencia	ΔG	ΔH	ΔS	Tm (°C)	Auxiliar 5'-A-I	ΔG	ΔH	ΔS	Tm (°C)	
21M-01-222	<i>Listeria monocytogenes</i>	B-Limo-II	TTCCGGAGTTATC CCCAA	-20,8	-186,8	-494,8	70,0	ATTCGGTATTAGCC CCGGT	-20,9	-168,8	-440,8	71,0	CCGGGC G CAT GCG CGA CAC TTT ATC GCGCG
22M-01-280	<i>Mycobacterium avium</i>	SB-Mycavi-A	GGG TGT TAC CGA CTT TCA TGA	-21,8	-207,2	-553,3	70,5	GGT TAG GCC ACT GGC TTC	-21,7	-179,4	-470,4	71,8	CCAGGGT CA GCT CCC ICC GAA AAG G TCGCTGG
23M-01-281	<i>Mycobacterium avium</i>	SB-Mycavi-B	G TGT TAC CGA CTT TCA TGA CGT	-21,8	-203,5	-534,9	70,3	T TAG GCC ACT GGC TTC GG	-21,9	-171,4	-448,9	72,7	CCGGGT GCT CCC TCC CAA AAG GGG ACCGCG
24M-01-175	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	B-Nelgon	GATAGCGCAGGC CCGA	-21,0	-172,5	-451,7	71,1	TCAATATCGGCG CTCG	-20,7	-171,9	-450,7	70,3	CCGG ACC CCG CGA ACC AGC TAA CCGG
25M-01-174	<i>Neisseria meningitidis</i>	B-Nelmerig	CGTCGCCACTCGC CA	-19,9	-165,0	-435,3	68,1	TACGTCGGATATG TTACTCACC	-21,3	-203,3	-542,3	70,3	CACCG TTA TCG GCG ACT ACT CCG TG
26M-01-295	<i>Pandorea spista</i>	SB-Panapi	TGA CGT GTG AAG CCC TAC C	-21,9	-189,9	-501,4	71,4	CCC TGT GTA CCG ACC ATT GTA	-22,7	-203,5	-539,4	72,3	CGTGT AC CTC GCG GCT TGG CGA ACACG
25M-01-296	<i>Pandorea spp.</i>	SB-PansppA	G GGG ATT TCA CAT CCG TCT	-21,2	-190,8	-505,6	70,1	A GTT CCG AGG TTG AGC CC	-22,0	-184,3	-484,3	72,0	CCGGC GC GTT GCA GTC AGC AAT GC CCGCG
26M-01-286	<i>Pandorea spp. B</i>	SB-PansppB	CTT TAC AAC CCG AAG GCC TTC	-21,7	-196,8	-522,3	70,9	AGG ATT TCT TTC CGG ACA AA GTG	-21,9	-213,8	-572,6	70,4	CCGG C CCG GAG GTA TTA ACC CAG CCGG
27M-01-247	<i>Propionibacterium acnes</i>	B-propion	TAA GCA CGC CGC CAG CG	-20,8	-162,5	-422,4	71,1	T TTC CGT TCG ACT TGC ATG TGT	-21,6	-202,1	-537,8	70,9	CCCGG AC CCC ACA AAA GCA GGG CC GGG
28M-01-250	<i>Propionibacterium acnes</i>	B-propion	TAAGCACGCCGCA GC	-22,2	-173,6	-451,1	73,5	TTTCGTTTCGACTT GCATGTGT	-21,6	-202,1	-537,8	70,9	CCGGG CAC CCC ACA AAA GCA GGG CCT CCGCG
29M-01-188	<i>Proteus mirabilis</i>	B-Protmir	GTAGACATTATCG GTATTAGC	-20,2	-200,0	-535,9	68,4	AGCCCTGCTTTGG TCC	-21,2	-169,2	-441,1	71,5	CG CCGATA GTG CAA GGT CCG AAG CCGGC
30M-01-189	<i>Proteus vulgaris</i>	B-Protvul	TTATCCCTCCAT CAGG	-19,9	-175,5	-463,7	68,7	TTAGCCACCGTTTC CAGTAG	-20,4	-153,8	-486,9	69,4	CCG CCG TAG AGC TCA TGC GGT A GGCGG
29M-01-252	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SB-Psaer-E	C TCG TTA CCG GAC TTA ACC CA	-22,1	-197,3	-522,7	71,0	GT AAC TAA GGA CAA GGG TTG CG	-22,8	-202,6	-535,5	72,5	CCCGCATTG GGC ACC CGA GGT GCT G TAGCCCG
30M-01-121	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	B-Psaer D	GAT TTA CCT AAG ATT TCA	-20,7	-212,8	-572,0	68,8	CTC GGC CTT GAAACC CGG	-21,4	-170,2	-443,3	72,1	CCCGG AAGA CGA GTC GTC ATC AGCT CCGCG
31M-01-287	<i>Ralstonia spp. A</i>	SB-RalsppA	GTC GTA TGC GGT ATT AGC TAA TC	-21,7	-207,9	-555,5	70,3	CCC CAC TTT CAG CCT CAG	-21,4	-178,6	-489,1	71,1	CACGT GCA TGA GGC GTT GCG GTC ACGTG
32M-01-288	<i>Ralstonia spp. B</i>	SB-RalsppB	CAG TAA TTC CGA TTA AGC CTT GGA	-22,6	-218,7	-585,2	71,3	CTG CCG ACG CTT TAC GCC	-22,2	-177,3	-482,7	72,9	CGT TCG GTC TTG CAC AAC CCG ACG
33M-01-289	<i>Ralstonia spp. C</i>	SB-RalsppC	A GGT TTT TCG CGT TGCATC GAA	-21,3	-199,3	-531,0	70,0	TGG CAT GTC AAG T CAA GAT TTG	-22,0	-188,0	-485,2	71,8	CCGACGTT CTAT GCA TCT CTG CTT CGTAG CGTCGG
34M-01-275	<i>S. lydenensis</i>	Sulug	G TTG CTT CGA ATT AGA CCA CAT G	-21,9	-215,8	-578,4	70,4	T CAA GAT TTG GTA AGG TTC TTC GC	-22,9	-217,6	-581,0	71,9	CCCGC C TCT AGA GCG GTC AAA GGA TG GCGCG

Tabla 4

8/16

#	Organismo diana	Nombre de la sonda	Auxiliar II					Auxiliar I					Secuencia 5'-3' de la baliza
			Secuencia	ΔG	ΔH	ΔS	T _m (°C)	Auxiliar 5' - A-I	ΔG	ΔH	ΔS	T _m (°C)	
33/M-01-120	Salmonella	B-Sal-1666	GGCACCATTITGCC TAGTTC	-20,9	-194,2	-516,5	69,8	TGCTTCTCCGAA GTTAC	-20,0	-178,1	-471,1	68,8	CGCTC CTT CAC CTA CBT GTC AGC G GAGCG
34/M-01-235	Serratia marcescens	B-Serrat-11	ACCGAAGGCCCTTC TTCA	-20,0	-174,6	-461,4	68,9	CTCGCTGAAAGTG CTTTACA	-20,5	-182,5	-513,0	69,1	CC GGG CG TAT TAA GCT CAC CAC CTT CTT CCC GG
35/M-01-239	Shigella	B-Shig-II	CGGAGATGAGTTCA CGAGG	-20,7	-189,0	-501,7	69,6	CGAACAAGTGCTCT ACCCG	-20,3	-181,0	-478,8	69,3	CCGGC AAG TCG GGA TGA CCC CCT TGC GCCGG
36/M-01-245	Shigella	B-Shig-III	TA CTT TAC AAC CCG AAG GCC T	-22,3	-190,1	-500,1	72,8	CCT TCC TCC CCG CTG AAA G	-22,1	-186,2	-489,1	72,4	CCCGGG TGA GCA AAG GTA TTA ACT TTA CTC CCGGG
37/M-01-276	Shigella	B-Shig-III	TA CTT TAC AAC CCG AAG GCC T	-22,3	-190,1	-500,1	72,8	CCT TCC TCC CCG CTG AAA G	-22,1	-186,2	-489,1	72,4	CCCGGG TGA GCA AAG GTA TTA ACT TTA CTC CCGGG
38/M-01-287	Shigella spp.	Sb-Shigp-4	CGGAGATGAGTTCA CGAGG	-20,7	-189,0	-501,7	69,6	CGAACAAGTGCTCT ACCCG	-20,3	-181,0	-478,8	69,3	CCGGC AAG TCG GGA TGA CCC CCT TGC GCCGG
37/M-01-119	Staphylococcus	B-Staphp-2	CGCCACTGGTGTTC CTCC	-22,0	-188,9	-497,5	72,1	ACAGACGAGAAAT CGCCCTT	-21,2	-187,6	-466,9	70,7	CCMAC TTTCG CACATC AGC GTC AGT T GG
38/M-01-215	Staphylococcus aureus	B-Staph-3	CGCCGCGAGCGTT CATC	-20,8	-172,3	-451,4	70,7	TGCACTTGCAATGA TTAGGCA	-19,8	-184,2	-519,7	67,9	CCT G CAA GCT TCT CBT CCG TTC GC AGG
38/M-01-274	Staphylococcus epidermidis	Stafug	CG TTG CTT CGA ATT AAA CCA CAT G	-20,8	-210,3	-505,5	68,7	T CAA GAT TTG GTA AGG TTC TTC G	-20,2	-203,3	-545,2	68,0	CCGGG TCT AGA GGG GTC AGA GGA TG CCGGG
40/M-01-146	Stenotrophomonas maltophilia	B-Stam-2	TCCAGGTTGAGCC CAGG	-22,7	-185,1	-484,6	73,3	CCAGATCCACTG CAGT	-19,4	-173,3	-459,1	67,4	CCCGGA CCG TCT ACC ACA CTC TAG TGG CCGGG
41/M-01-116	Streptococcus galactiae	B-Straga-3	GA AAA CCT TCT TCA CTC ACG C	-21,1	-202,9	-541,7	70,0	TACAACAGAGGCTT TAGCTCC	-20,8	-199,4	-532,3	69,5	CCGCT ACT CBT ACC AAC GTT CTT CTC AGCGG
42/M-01-114	Streptococcus pneumoniae	B-Strept-2	TTCCCAATAGTTATC CCCCGC	-21,2	-194,6	-516,6	70,3	CTCTATGCGGTAT TAGCTATCG	-20,8	-199,4	-532,3	69,5	CCGT TAA GCA AAT GTC ATG CAA CAT CTACA CTTA ACGG
41/M-01-249	Streptococcus pneumoniae	B-Strept-3	YACTGTATGCGGT ATTAGCTATC	-20,7	-198,5	-529,7	69,4	CTTTAAGCAATGT CATGCAATC	-20,3	-225,0	-610,0	67,9	CCGGG CT GBT AGT GAT GCA AGT GGA G CCGGG
42/M-01-113	Streptococcus pyogenes	B-Strpyo-D	CGGTATTAGCTATC GTTTCAATA	-20,4	-200,5	-530,8	68,7	TACATCGGTTAGT CTCTCTTATG	-20,6	-203,8	-545,9	69,1	CCCTC GAG CAA TTG CCG GTT TTA AATTAG GAGCG
43/M-01-230	Streptococcus spp.	B-Strept-III	GGATTTTCCACTCC GACCA	-20,6	-194,1	-517,2	69,3	GGTTAGTTACCCCTC ACTTGGT	-21,0	-189,1	-501,0	70,2	CCGGG GCA CCGT AGT TAG CCG TCC CTT TCT GCCGG
44/M-01-267	Yersinia enterocolitica	B-Yers-III	AGG CCT TCT TCA CAC ACG C	-21,8	-184,8	-486,2	71,7	CT GAA AGT GCT TTA CAA CCC GAA	-21,9	-200,5	-533,0	71,0	CGCGGGG AAG TTA TTG GCC TTG CTC CTC G CCGGG
45/M-01-221	Yersinia enterocolitica	B-Yers-II	TTTGGTCCGAGAC GTTATGC	-20,8	-198,7	-530,1	69,6	CCCAAGGTCCTCC AC	-20,5	-168,7	-435,6	70,3	CCGGG CACA TCC GAT GGC GTG AGG CCGGG

Tabla 4

9/16

#	Número de código	Organismo diana	Nombre de la sonda	Auxiliar III					Auxiliar IV					Longitud del híbrido	Longitud baliza	AT (diana)	GC (diana)	Contenido GC de la baliza	% contenido GC del híbrido	% contenido GC de la baliza
				Secuencia	ΔG	ΔH	ΔS	T _m (°C)	Secuencia	ΔG	ΔH	ΔS	T _m (°C)							
1M-01-251		<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	B-Achxy1	CT AAT CCG ATA TCG GCG GC	-20,2	-179,2	-474,0	69,1	CCG TTA CCC CAC CAA CTA G	-20,5	-177,0	-467,5	69,8	21	32	11	10	21	48%	66%
2M-01-236		<i>Achromobacter baumannii</i>	B-Achbaum-IV	CCAAGTTAAGCTCG GGGAT	-20,6	-176,2	-469,8	69,9	CTCAGCAGTATCGA ATGCAATTC	-20,5	-213,0	-573,6	68,6	26	56	14	12	12	46%	32%
3M-01-137		<i>Achromobacter</i> spp.	B-Achbact-2	AC CCG TAC ACC TGG AAT TCT	-21,8	-189,5	-500,4	71,3	CT CCA GAT CTC TAC GCA TTT C	-20,7	-201,6	-539,7	68,9	21	30	13	8	15	36%	50%
4M-01-237		<i>Beauveria cereus</i> group	B-Bacoe-11	CCGCTTTCATTT CGAACCA	-20,6	-198,9	-530,7	69,5	ATCCATAAGTGACA GCGGAAG	-20,1	-193,7	-517,5	68,4	25	37	15	10	12	40%	32%
5M-01-141		<i>Beckerella/Prevotella</i>	B-BacPrev	CCCGTAGGAGTTTG GACC	-20,4	-180,6	-477,5	69,4	AATATTCCTCAGTG CTGGCT	-20,4	-189,3	-503,3	69,2	21	31	12	9	19	43%	61%
6M-01-214		<i>Burkholderia cepacia</i> complex	B-Bcc	GATTGCTCCCGCT CCGG	-21,0	-182,4	-416,8	71,3	CTACGATCGGTTTT CTGG	-16,9	-160,3	-427,9	62,5	18	28	8	10	20	56%	71%
SM-01-166		<i>Campylobacter</i> (pathogenic thermophiles)	B-Cherm	ATCCGCTAGCCCGC ITA	-20,4	-162,3	-423,0	70,2	GACCTTAGACTAGC ACTTCG	-21,1	-185,6	-520,1	70,1	18	28	7	11	21	61%	75%
6M-01-231		<i>Citrobacter freundii</i>	Citreu-W111	CCTCTACAAGACTC TAGCCT	-21,4	-191,8	-507,8	70,9	TACACCTGGAAATTC TACCCG	-20,8	-195,0	-519,1	69,7	21	29	9	12	23	57%	69%
7M-01-176		<i>Clostridium difficile</i>	B-Clodiff	CCGTCCGCGCTCT TTAC	-20,7	-163,2	-424,5	70,9	GTTACCCACGCGTT ACTCAC	-21,2	-191,2	-506,5	70,6	23	34	13	10	18	45%	53%
8M-01-232		<i>Clostridium perfringens</i>	B-Cloper-11	CGTTAGCGCGGC ACG	-19,8	-154,9	-402,7	69,2	CCGAGCGGGAATAC TTAATG	-20,1	-183,7	-487,5	69,8	21	31	9	12	10	57%	32%
9M-01-233		<i>Clostridium</i> spp.	B-Cloapp	TTATCATCCGCT ACGAC	-20,3	-190,7	-507,8	69,9	CGGGGATTTTCACAT CCGA	-19,6	-182,2	-484,6	67,9	22	28	10	12	16	55%	57%
10M-01-272		<i>Corynebacterium</i> spp	Corspp	GCC TGC ACG CCG GAA GCG	-22,2	-175,3	-456,6	73,1	CAC TCA AGT TAT GCC COT ATC	-20,3	-163,4	-516,2	68,6	20	32	9	11	23	55%	72%
9M-01-268		<i>Corynebacterium</i> spp	SB-Corspp	TGC ACG CCG GAA GTT AAG C	-21,7	-166,3	-491,1	89,6	CA AGT TAT GCC CGT ATC GCC	-21,5	-191,1	-512,0	88,3	20	30	9	11	21	56%	70%
10M-01-270		<i>E. coli/Shigella</i>	EcoShi	CT TCT TCT GCG GGT AAC GT	-19,9	-175,1	-463,0	68,4	GC ACG GAG TTA GCC GGT G	-22,3	-179,1	-467,8	72,9	27	39	18	9	12	33%	31%
11M-01-229		<i>EHEC</i>	B-EHEC-11	ACCGATTATACAAA GGTACGC	-19,5	-191,0	-511,0	67,5	TTGCTACAGAAATATA AGTCGCTG	-20,2	-206,3	-554,6	69,3	22	34	11	11	23	50%	68%

Tabla 4

10/16

Número de código	Organismo diana	Nombre de la sonda	Auxiliar III					Auxiliar IV					Longitud del híbrido	Longitud de la sonda	GC (diana)	GC (diana)	GC (diana)	GC del híbrido	% contenido GC de la sonda
			Secuencia	ΔG	ΔH	ΔS	T _m (°C)	Secuencia	ΔG	ΔH	ΔS	T _m (°C)							
12M-01-256	Enterobacter aerogenes + cloacae + intermedius + others	B-Entbac-II	AA TGC AGT TCC CAG GTT GAG	-20,4	-188,0	-499,8	69,0	G CAT TTC ACC GCT ACA CCT G	-22,6	-194,2	-511,7	72,8	22	36	11	11	27	50%	71%
13M-01-259	Enterobacter sakazakii	SB-EntSak-I	C TT CTC TGG ATG TCA AGA CCA	-21,0	-183,5	-484,6	70,3	AGC CAT GCA GCA CCT GT	-10,7	-173,5	-455,6	70,2	19	32	7	12	24	63%	75%
14M-01-269	Enterobacter sakazakii	SB-EntSak-II	C TT CTC TGG ATG TCA AGA CCA	-21,0	-183,5	-484,6	70,3	AGC CAT GCA GCA CCT GT	-20,7	-173,5	-455,6	70,2	19	31	7	12	24	63%	77%
13M-01-273	Enterobacteriaceae	Eubac	G AGC TTA TGC GGT ATT AGC TAC	-21,8	-202,0	-537,8	70,7	C CCC CTC TTT GGT CTT GC	-21,3	-182,3	-480,4	70,7	21	33	10	11	12	62%	18,96%
14M-01-289	Enterococci	Entoc III	ACC GCG AGT CCA TCC AT	-21,6	-175,7	-459,8	71,7	ACC TCA CCA ACT AGC TAA TCC	-21,6	-199,4	-530,4	70,6	20	28	8	12	20	60%	71%
15M-01-228	Enterococci	B-Entoc-II	GGGGGCTTCACAT CAGAC	-21,9	-197,5	-523,3	71,5	CTCCCGGTTGAGC G	-19,7	-158,0	-412,1	66,0	24	38	11	13	27	54%	71%
16M-01-182	Enterococcus faecalis	B-Entalis-2	TCCTCTTTCCAAATTG AGTGCAA	-20,7	-209,9	-563,9	68,9	ACTCACCCGTCGCG CAC	-20,6	-170,0	-445,3	70,3	19	31	8	11	16	58%	61%
17M-01-236	Enterococcus faecium	B-Entium-II	CCATCAACGACACCC CGAAA	-21,2	-191,4	-507,2	70,6	ATGCACCCGCGGT CCAAT	-21,4	-196,2	-491,4	72,3	25	28	13	12	15	46%	54%
18M-01-227	Escherichia coli	B-E.coli III	CTTGGAC TGATTCAGCTCCA C	-22,1	-216,1	-576,1	71,1	GTTGCAGCCAGCTG GTAT	-20,9	-179,4	-472,3	70,5	25	33	13	12	20	46%	61%
17M-01-130	Haemophilus influenzae	B-HaeInf	GCATGGGGCTCTC AGTC	-22,5	-189,0	-495,0	73,0	CACITGGGCTCATC CTATG	-20,2	-181,6	-481,1	69,0	20	30	9	11	21	55%	70%
18M-01-284	Inquilinus limosus	SB-IngLim	GGG AAT TCC ACC ACC CTC T	-23,2	-196,9	-516,1	73,6	TC TAC GAA TTT CAC CTC TAC ACT	-21,6	-207,4	-554,3	70,3	19	33	7	12	22	63%	67%
19M-01-271	K. pneumoniae-5	Kegne-5	AC CCA TTA TAC AAA AGG TAC GCA	-21,5	-194,6	-516,5	70,5	CT TGC TAC AGA ATA TAA GTC GCT G	-22,1	-214,8	-574,9	70,8	18	30	7	11	23	61%	77%
20M-01-253	Klebsiella oxytoca	B-Kleboxy-II	GG TAT CTT CGA CTG ATT TCA GCT	-22,6	-221,0	-591,0	71,6	TTT TAA TAA ACA GTT GCA GCC AGC T	-22,9	-218,4	-582,6	72,2	23	35	13	10	22	43%	63%
21M-01-293	Klebsiella pneumoniae	SB-Kegne-6	AC CCA TTA TAC AAA AGG TAC GCA	-21,5	-194,6	-516,5	70,5	CT TGC TAC AGA ATA TAA GTC GCT G	-22,1	-214,8	-574,9	70,9	18	34	7	11	23	61%	68%
22M-01-234	Klebsiella pneumoniae	B-Klepne-4	ACGGCTCAAGGGCA CAAC	-21,1	-182,6	-481,4	70,7	CGTTAGCTCCGGAA GCC	-19,5	-164,7	-432,7	68,3	25	37	13	12	24	48%	65%

Tabla 4

11/16

#	Número de código	Organismo diana	Nombre de la sonda	Auxiliar III					Auxiliar IV					Longitud del híbrido	Longitud de la diana	Longitud de la baliza	AT (diana)	GC (diana)	Contenido GC de la baliza	% contenido GC del híbrido	% contenido GC de la baliza
				Secuencia	ΔG	ΔH	ΔS	Tm (°C)	Secuencia	ΔG	ΔH	ΔS	Tm (°C)								
21	M-01-222	<i>Listeria monocytogenes</i>	B-Limo-II	CGAAGCAGCTTTTC	-20,4	-207,7	-558,1	68,6	GCCCATCTGTAAAGC	-22,0	-193,9	-512,3	71,9	19	31	9	10	22	53%	45%	
22	M-01-230	<i>Mycobacterium avium</i>	SB-Mycavi-A	CG CGG ATC CCA CCT TCG A	-22,4	-188,8	-496,5	72,5	CTT GTT ACG ACT TCG TCC CAA T	-21,8	-203,2	-541,4	70,6	18	32	7	11	10	61%	31%	
23	M-01-231	<i>Mycobacterium avium</i>	SB-Mycavi-B	CCG ATC CCA CCT TCG ACA	-21,0	-175,2	-460,1	70,5	GTT ACG ACT TCG TCC CAA TCG	-21,9	-202,3	-538,1	71,0	16	36	4	12	12	75%	33%	
24	M-01-175	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	B-Neigon	CGCCTTGGTGGGC CTTT	-20,7	-182,6	-423,3	71,0	CAGACCGGCTACTGT ATCGT	-21,8	-189,4	-499,4	71,8	18	28	7	11	21	61%	75%	
25	M-01-174	<i>Neisseria meningitidis</i>	B-Neimeng	GGTATTAGCTGATC TTTCATCAG	-22,2	-224,2	-602,0	70,9	TTCCTCTCTCAAGAC GTATGC	-19,6	-198,9	-534,3	67,5	18	25	8	10	14	56%	56%	
26	M-01-235	<i>Pandorea apista</i>	SB-Panapl	G GTT TTC TGG GGT TAG CTC C	-22,8	-198,6	-524,6	72,7	TG CGA TCC GGA CTA CGA TC	-21,8	-191,9	-508,2	70,6	17	27	5	12	18	71%	67%	
25	M-01-236	<i>Pandorea spp.</i>	SB-PansppA	CC CCT CTG CCA TTC TCT A	-21,2	-172,6	-451,7	71,1	TG CTA CAC GTG GAA TTC TAG C	-21,2	-201,3	-537,5	69,7	19	29	8	11	21	58%	72%	
26	M-01-236	<i>Pandorea spp. B</i>	SB-PansppB	TTC TTC CGG TAC CGT CAT CC	-21,9	-186,0	-519,4	71,2	AC GTA GTT AGC CGG TGC TTA	-21,5	-186,7	-492,7	71,1	19	27	8	11	8	58%	30%	
27	M-01-247	<i>Propionibacterium</i>	B-propacn	C AGT CAA GGG CAG GTT ACT C	-21,1	-191,2	-506,8	70,4	AC GTG TTA CTC ACC CGT TCG	-21,1	-191,1	-505,5	70,4	19	27	7	12	20	63%	74%	
28	M-01-250	<i>Propionibacterium</i>	B-propacn	C AGT CAA GGG CAG GTT ACT C	-21,4	-175,8	-460,4	71,5	AC GTG TTA CTC ACC CGT TCG	-21,3	-207,7	-555,9	69,8	21	31	8	13	23	62%	74%	
29	M-01-188	<i>Proteus mirabilis</i>	B-Protmir	GCT AAT CCC ATA TCG GTT CAT	-20,2	-196,7	-525,0	68,6	GGCTTTACCCACC TACTA	-21,6	-177,2	-483,6	72,0	21	28	9	12	19	57%	68%	
30	M-01-189	<i>Proteus vulgaris</i>	B-Protvul	AAG AGC CCC TGC TTT GGT	-20,4	-172,6	-453,6	69,8	CCGATAGCGCAAG GTCCG	-21,4	-179,2	-470,4	71,4	19	27	8	11	19	58%	70%	
29	M-01-292	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SB-Psapr-E	GGC AGT CTC CTT AGA GTG	-20,3	-180,4	-477,8	69,8	C TTC CTC CGG TTT GTT ACC	-21,5	-189,0	-499,8	70,8	16	36	4	12	6	75%	17%	
30	M-01-121	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	B-Paser D	ACCACTTCGTGAT CTAA	-22,0	-217,7	-583,3	70,8	TCTTGGAGCATGG CATC	-20,3	-197,7	-526,2	68,5	20	30	10	10	20	50%	67%	
31	M-01-287	<i>Ralstonia spp. A</i>	SB-RalsppA	ACA TCG GCC GCT CCT ATA	-20,7	-164,9	-430,1	70,5	A CCT CAG CAA CTA GCT AAT CAG	-21,7	-206,1	-550,1	70,5	18	28	6	12	8	67%	29%	
32	M-01-288	<i>Ralstonia spp. B</i>	SB-RalsppB	TT AAG CCC GGG GAT TTC ACA	-21,5	-190,3	-503,0	71,0	T CAC CAA TGC AAT TCC CAG G	-20,9	-184,4	-517,8	69,4	18	24	7	11	4	61%	17%	
33	M-01-289	<i>Ralstonia spp. C</i>	SB-RalsppC	TC CAC TTT CTC TTT CGA GCA C	-21,1	-200,0	-533,9	69,5	G CCA TGC AGC ACC TGT G	-20,9	-181,2	-478,2	70,1	23	39	13	10	10	43%	26%	
34	M-01-275	<i>S. lugdunensis</i>	Stalug	CC GAA GGG GAA GAC TCT AT	-21,0	-183,3	-464,3	70,1	CCA CCT GTC ACT TTG TCC C	-20,9	-190,2	-505,3	69,3	21	31	10	11	10	52%	18,244	

Tabla 4

12/16

#Número de código	Organismo diana	Nombre de la sonda	Auxiliar III					Auxiliar IV					Longitud diana / longitud del híbrido	Longitud ballza	AT (diana)	Contenido GC de la ballza	% contenido GC del híbrido	% contenido GC de la ballza
			Secuencia	ΔG	ΔH	ΔS	Tm (°C)	Secuencia	ΔG	ΔH	ΔS	Tm (°C)						
33M-01-120	Salmonella	B-Sal-1686	TTGAGCTCCRTGAG TAAATCA	-19,9	-189,9	-536,5	67,9	GCTGGTATCTTCGR CTGAC	-21,5	-194,4	-515,2	71,0	19	29	8	11	19	66%
34M-01-238	Serratia marcescens	B-Serratia-II	TGGGAGTAAAGTCA ATTGATGAG	-21,0	-216,0	-581,0	69,3	AGTAGCGGTGCT TCTTC	-20,0	-178,9	-473,6	66,7	26	35	13	13	10	29%
35M-01-239	Shigella	B-Shig-II	GCAGTTGTCATCGG GTTGGT	-22,7	-200,6	-530,1	72,9	CGTGAATACATTCT CCGGTATTC	-21,3	-211,6	-567,1	69,9	21	31	8	13	23	74%
36M-01-248	Shigella	B-Shig-III	G TGC TTC TTC TGC GGG TAA CGT CAA	-20,7	-184,5	-468,1	69,9	GGC TGC TGG CAC GGA GTT AGC CG	-21,1	-163,4	-513,4	70,3	24	35	15	8	19	54%
37M-01-276	Shigella	B-Shig-III	G TGC TTC TTC TGC GGG TAA CGT CAA	-20,7	-184,5	-468,1	69,9	TGG CAC GGA GTT AGC CG	-21,2	-222,6	-600,7	69,1	24	35	15	8	19	54%
38M-01-297	Shigella app.	B-Shig-4	GCAGTTTGCATCGG GTTGGT	-22,7	-200,6	-530,1	72,9	CGTGAATACATTCT CCGGTATTC	-21,3	-211,6	-567,1	69,9	21	31	8	13	23	74%
37M-01-119	Staphylococcus	B-Staph-2	ATCTGTTTGATCC CCACGC	-21,8	-192,1	-507,5	71,8	GTGACTACACGG GTATCTA	-21,9	-193,1	-510,1	71,8	21	28	11	10	15	54%
38M-01-215	Staphylococcus aureus	B-Staph-3	CCGCGCTAACATC AGAGAA	-22,0	-196,0	-518,5	71,8	CCGCGCTAACATC AGAGAA	-21,5	-187,6	-494,9	71,3	21	27	8	13	17	63%
39M-01-274	Staphylococcus epidermidis	Stalug	CC GAA GGG GAA AAC TCT ATC	-20,2	-191,2	-510,1	69,4	CA CCT GTC ACT CTG TCC C	-21,0	-186,5	-499,8	68,9	21	31	10	11	10	18,24%
40M-01-148	Stenotrophomonas maltophilia	B-Stenai-2	ACACGAGGAATTCC GCTA	-18,8	-163,5	-432,4	66,0	TCTACGCATTTCAC TCT	-16,8	-164,7	-441,4	62,2	21	32	9	12	22	69%
41M-01-116	Streptococcus agalactiae	B-Straga-3	A CCG TCA GTT GGT AGA TTT TCC	-20,4	-168,1	-493,8	69,2	CCGTCCCTTCTGG TTAGTT	-21,5	-193,8	-513,0	70,9	21	32	11	10	18	56%
42M-01-114	Streptococcus pneumoniae	B-Strepne-2	TAGTATGCAAGTG CACCTTT	-20,4	-166,1	-493,9	69,2	ACACGCGAGGTCCA TCTGG	-21,5	-193,6	-513,0	70,9	25	33	17	8	16	45%
41M-01-249	Streptococcus pneumoniae	B-Strepne-3	GCT AAT ACA ACG CAG GTC CAT	-21,6	-196,8	-522,0	71,1	G CCG TTA CCC CAG CAA CTA	-22,7	-182,6	-476,5	73,8	21	31	10	11	21	68%
42M-01-113	Streptococcus pyogenes	B-Strepyo-D	ACGAGGTTCATCT CATAGTG	-21,9	-201,4	-534,9	71,4	TA CTCACCACTAGC TAATACA	-21,7	-211,4	-565,2	70,8	24	34	16	9	17	50%
43M-01-230	Streptococcus app.	B-Strept-III	CGTATTACCGCGGC TGCTG	-21,7	-179,7	-470,7	72,1	GACACGCTCGGG ACCTA	-21,3	-178,3	-482,0	71,4	24	36	11	13	25	69%
44M-01-267	Yersinia enterocolitica	B-Yere-III	GT AAC GTC AAT CCA ACA ACG TAT	-21,3	-218,2	-587,5	69,3	CC GGT GCT TGT TCT GCG A	-21,2	-171,8	-449,1	71,2 ^C	21	33	10	11	20	61%
45M-01-221	Yersinia enterocolitica	B-Yere-II	TACTAGCTAATGCC ATCTGGG	-21,4	-199,0	-609,4	70,5	GTGAGCCATTACCG CACC	-21,0	-164,3	-496,5	70,5	19	28	7	12	22	55%

Tabla 4

13/16

#Número de código	Organismo diana	Nombre de la sonda	PM de la Secuencia	Formación de bucle en horquilla @ Condiciones de hibridación				Formación de la horquilla @ lectura				Diana/sonda @ Hibridación				dTm			
				ΔG	ΔH	ΔS	Tm (°C)	ΔG	ΔH	ΔS	Tm (°C)	ΔG	ΔH	ΔS	Tm (°C)				
1M-01-251	Achromobacter xylosoxidans	B-Achxy1	10.697	-1,8	-47,9	-137,5	75,3	-7,6	-66,8	-200,6	59,9	-21,1	-188,2	-528,5	69,7	-19,3	-150,3	-391,0	-5,6
2M-01-236	Acinetobacter baumannii	B-Acinbaum-IV	13.138	-2,4	-53,1	-151,0	78,5	-7,6	-74,5	-226,8	55,3*	-26,9	-238,0	-629,0	77,5	-24,5	-184,9	-478,0	-1,0
3M-01-137	Acinetobacter spp.	B-Achba2	10.143	-1,4	-50,7	-147,0	71,7	-5,0	-50,7	-153,3	57,6	-22,1	-195,9	-518,5	71,6	-20,5	-145,2	-371,5	-0,1
4M-01-237	Bacillus cereus group	B-Baccer-II	12.207	-3,2	-84,1	-241,3	75,5	-10,6	-84,1	-248,9	64,8	-22,9	-217,4	-579,7	72,2	-19,8	-133,3	-338,5	-3,3
5M-01-141	Bacteroides/Prevotell	B-BacPrev	10.420	-1,9	-47,8	-136,7	76,5	-5,2	-44,3	-131,1	64,8	-21,2	-203,9	-544,6	70,0	-17,3	-139,5	-364,3	-9,6
6M-01-214	Burkholderia cepacia complex	B-Boc	9.555	-1,3	-37,1	-106,7	74,7	-4,5	-69,5	-217,9	45,8	-22,9	-198,9	-524,6	73,2	-21,6	-161,6	-417,9	-1,5
5M-01-165	Campylobacter (Termófilas patógenas)	B-Cherm	9.842	-1,6	-38,6	-110,2	77,1	-4,5	-38,6	-114,4	64,2	-21,0	-176,1	-469,1	71,0	-19,4	-136,5	-349,9	-6,1
6M-01-231	Citrobacter freundii	Citfru-WIII	11.252	-2,2	-49,5	-140,9	78,2	-7,5	-49,5	-142,2	75,0	-23,1	-205,5	-543,6	73,2	-20,9	-156,0	-402,7	-5,0
7M-01-176	Clostridium difficile	B-Codiff	11.452	-1,7	-65,8	-191,1	71,1	-5,66	-65,8	-201,6	53,2	-20,8	-204,2	-546,5	69,4	-19,1	-138,4	-355,4	-1,7
8M-01-232	Clostridium perfringens	B-Cloper-II	11.252	-1,5	-73,2	-213,8	69,3	-9,4	-73,2	-216,2	65,4	-23,1	-208,0	-551,0	73,1	-21,6	-134,8	-337,2	3,8
9M-01-233	Clostridium spp.	B-Closp	11.626	-2,6	-78,7	-226,8	73,9	-10,9	-78,7	-229,6	69,6	-22,9	-198,9	-524,6	73,2	-20,3	-120,2	-297,8	-0,7
10M-01-272	Corynebacterium spp	Corspp	10.597	-2,2	-198,2	-141,2	77,4	-9,5	-49,5	-141,2	77,4	-21,6	-196,2	-621,0	70,6	-19,4	0,0	-379,8	-6,8
9M-01-288	Corynebacterium spp	SB-Corspp	10.597	-0,8	-41,5	-121,3	68,9	-7,4	-61,6	-183,6	62,3	-22,4	-199,5	-528,5	71,9	-21,6	-158,0	-407,2	3,0
10M-01-270	E. coli/Shigella	EcoShi	12.684	-1,6	-93,3	-273,5	68,0	-11,5	-93,3	-277,3	63,4	-23,7	-240,1	-646,8	72,1	-22,1	-146,8	-372,3	4,1
11M-01-229	EHEC	B-EHEC-II	11.352	-2,4	-93,4	-271,2	71,2	-12,3	-93,4	-274,6	66,9*	-22,9	-214,8	-572,0	72,4	-20,5	-121,4	-300,8	1,2

Tabla 4

14/16

#	Número de código	Organismo diana	Nombre de la sonda	PM de la Secuencia	Formación de bucle en horquilla @ Condiciones de hibridación				Formación de la horquilla @ lectura				Diana/sonda @ Hibridación								
					ΔG	ΔH	ΔS	T_m (°C)	ΔG	ΔH	ΔS	T_m (°C)	ΔG	ΔH	ΔS	T_m (°C)	T_d (°C)				
	12M-01-266	Enterobacter serogenes + cloacae + intermedia + otros	B-Entbaec-II	11.352	-4,6	-67,0	-196,2	74,2	-12,1	-87,4	-255,0	69,3	-24,1	-212,7	-255,0	74,2	66,0	-19,5	-145,7	-68,8	0,0
	13M-01-259	Enterobacter sakazakii	SB-EntSak-I	10.497	-2,0	-81,0	-253,6	70,6	-11,2	-85,9	-256,5	65,7	-24,6	-223,2	-610,4	74,1	62,0	-22,6	-146,2	-356,8	3,5
	14M-01-269	Enterobacter sakazakii	SB-EntSak-II	10.497	-2,0	-81,0	-255,6	70,6	-11,2	-85,9	-256,4	65,7	-24,6	-229,2	-610,4	74,1	62,0	-22,6	-149,2	-374,8	3,5
	13M-01-273	Enterobacteriaceae	Eubae	10.979	-0,9	-49,5	-145,1	71,8	-6,3	-49,5	-146,4	65,0	-22,3	-200,0	-530,1	71,8	64,0	-21,4	-150,5	-385,0	0,0
	14M-01-269	Enterococci	Entocoe III	10.874	-1,0	-38,8	-112,7	71,0	-5,8	-32,6	-158,4	58,9	-26,9	-245,6	-652,6	76,6	64,0	-25,9	-206,8	-539,9	5,6
	15M-01-228	Enterococci	B-Entococ-II	12.691	-4,6	-65,5	-181,5	87,8	-11,4	-66,4	-268,1	61,5	-27,5	-214,7	-557,8	80,3	74,0	-22,9	-149,2	-376,3	-7,5
	16M-01-182	Enterococcus faecalis	B-Entalis-2	10.220	-1,0	-47,8	-139,4	69,6	-4,7	-47,8	-144,7	57,2	-20,3	-182,9	-494,6	69,2	60,0	-19,5	-137,9	-352,9	-0,2
	17M-01-235	Enterococcus faecium	B-Entlum-II	12.761	-1,3	-43,2	-124,9	72,8	-6,0	-43,2	-125,9	70,0	-24,3	-226,9	-603,9	74,0	74,0	-23,0	-183,7	-479,0	1,2
	18M-01-227	Escherichia coli	B-E.coli III	12.761	-2,4	-49,9	-141,5	79,6	-6,9	-49,9	-145,9	69,0	-25,2	-236,1	-625,5	75,0	74,0	-22,8	-185,2	-484,0	-4,6
	17M-01-130	Haemophilus influenzae	B-Haefr	10.597	-1,2	-37,9	-106,3	73,8	-4,9	-36,7	-170,3	53,9	-19,6	-182,5	-485,6	67,8	62,0	-18,6	-143,8	-373,1	-5,4
	18M-01-294	Inquilinus limosus	SB-Inqlum	10.497	-1,3	-56,9	-166,0	69,6	-9,7	-51,5	-243,1	62,1	-24,0	-195,7	-512,3	75,0	62,0	-22,7	-138,8	-346,3	5,4
	19M-01-271	K. pneumoniae-5	Kiepe-5	9.842	-1,6	-83,3	-273,5	68,0	-11,5	-83,3	-277,3	63,4	-23,7	-240,1	-645,8	72,1	58,0	-22,1	-146,8	-372,3	4,1
	20M-01-253	Klebsiella oxytoca	B-Kieboxy-II	11.452	-2,6	-54,2	-153,7	79,5	-6,3	-76,0	-226,6	58,0	-21,6	-207,9	-555,2	70,5	66,0	-19,0	-153,7	-401,5	-9,0
	21M-01-293	Klebsiella pneumoniae	SB-Kiepe-6	9.842	-1,7	-76,7	-223,8	69,6	-9,1	-76,7	-227,4	62,3	-22,3	-192,1	-603,5	72,2	58,0	-20,6	-115,4	-282,7	2,6
	22M-01-234	Klebsiella pneumoniae	B-Kiepe-4	12.761	-2,5	-49,7	-140,8	79,9	-9,7	-56,3	-263,3	55,2	-25,2	-231,5	-614,9	75,2	74,0	-22,7	-181,8	-474,1	-4,7

Tabla 4

15/16

#	Número de código	Organismo diana	Nombre de la sonda	PM de la Secuencia	Formación de bucle en horquilla @ Condiciones de hibridación				Formación de la horquilla @ lectura				Diana/sonda @ Hibridación							
					ΔG	ΔH	ΔS	T_m (°C)	ΔG	ΔH	ΔS	T_m (°C)	ΔG	ΔH	ΔS	T_m (°C)	ΔG	ΔH	ΔS	T_d (°C)
21	M-01-222	<i>Listeria monocytogenes</i>	B-Limo-II	9.943	-3,7	-58,3	85,1	-9,8	-58,3	-164,3	81,8	-19,0	-178,8	-476,2	66,8	58,0	-120,5	-313,5	-18,3	
22	M-01-290	<i>Mycobacterium avium</i>	SB-Mycavi-A	9.842	-0,6	-46,4	86,2	-5,7	-46,6	-136,7	86,2	-21,4	-176,9	-464,0	71,2	58,0	-130,5	-327,3	5,0	
23	M-01-291	<i>Mycobacterium avium</i>	SB-Mycavi-B	9.368	-2,9	-71,8	78,3	-10,4	-71,8	-204,9	78,3	-21,6	-184,4	-465,9	71,1	56,0	-112,8	-281,0	-5,2	
24	M-01-175	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	B-Neigon	9.842	-1,5	-40,6	74,8	-4,6	-40,6	-116,7	74,8	-21,9	-174,2	-454,0	72,7	58,0	-134,9	-338,9	-0,6	
25	M-01-174	<i>Neisseria meningitidis</i>	B-Neimeng	9.565	-0,7	-41,6	68,4	-4,0	-41,6	-128,0	57,1	-19,1	-169,1	-443,9	67,4	58,0	-131,1	-304,8	-0,4	
26	M-01-295	<i>Pandorea apista</i>	SB-Panapi	9.742	-1,2	-63,0	68,5	-7,9	-63,0	-186,7	64,3	-24,2	-167,2	-485,2	76,1	58,0	-124,2	-301,8	7,6	
25	M-01-296	<i>Pandorea</i> spp.	SB-PanappA	10.220	-3,0	-51,2	82,9	-8,4	-60,2	-175,5	69,9	-23,4	-207,9	-550,4	73,3	60,0	-20,4	-156,7	-406,6	-9,8
26	M-01-286	<i>Pandorea</i> spp. B	SB-PanappB	10.220	-1,1	-33,8	72,0	-8,4	-60,3	-112,4	72,0	-21,7	-164,1	-484,6	71,4	60,0	-20,6	-145,3	-372,2	-0,5
27	M-01-247	<i>Propionibacterium acnes</i>	B-propion	10.487	-2,6	-53,2	78,2	-6,6	-53,2	-157,9	63,8	-25,6	-206,6	-539,4	77,5	62,0	-23,0	-153,4	-388,0	-0,7
28	M-01-250	<i>Propionibacterium acnes</i>	B-propion	11.529	-2,6	-53,2	78,2	-6,6	-53,2	-157,9	63,8	-25,6	-206,6	-539,4	77,5	68,0	-23,0	-153,4	-388,0	-0,7
25	M-01-188	<i>Proteus mirabilis</i>	B-Protmir	11.252	-1,9	-42,4	78,0	-5,1	-42,4	-125,0	66,1	-22,3	-197,9	-523,3	72,2	66,0	-20,9	-157,5	-407,0	-5,0
30	M-01-189	<i>Proteus vulgaris</i>	B-Protvul	10.220	-1,9	-41,5	78,7	-5,1	-72,5	-226,0	47,7	-20,6	-175,0	-460,1	70,1	60,0	-19,2	-143,7	-371,1	-8,1
26	M-01-292	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SB-Psaeir-E	9.365	-2,7	-51,6	80,5	-12,1	-95,1	-261,2	65,0	-21,9	-169,1	-459,2	72,8	56,0	-19,3	-117,5	-293,2	-7,7
30	M-01-121	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	B-Psair D	10.320	-2,0	-43,7	78,8	-5,5	-73,7	-228,7	49,1	-20,4	-182,8	-483,9	69,4	60,0	-18,6	-147,9	-385,0	-9,1
31	M-01-287	<i>Ralstonia</i> spp. A	SB-RalsppA	10.120	-0,4	-38,0	65,7	-5,6	-57,7	-176,5	53,9	-23,9	-199,5	-523,9	74,6	60,0	-23,5	-161,5	-411,7	8,9
32	M-01-288	<i>Ralstonia</i> spp. B	SB-RalsppB	9.842	-0,5	-45,3	65,5	-5,4	-45,3	-135,3	61,7	-22,3	-190,2	-501,1	72,2	58,0	-21,5	-144,9	-367,3	6,7
33	M-01-289	<i>Ralstonia</i> spp. C	SB-RalsppC	11.452	-0,6	-53,1	66,0	-8,0	-90,1	-274,9	54,6	-21,4	-176,9	-464,0	71,2	66,0	-20,8	-123,8	-307,4	6,2
34	M-01-276	<i>S. lugdunensis</i>	Staug	10.975	-2,7	-54,1	79,3	-6,5	-81,1	-245,9	56,7	-23,7	-208,9	-562,6	73,7	64,0	-21,0	-154,8	-399,1	-5,5

Table 4

16/16

					Formación de bucle en horquilla @ Condiciones de hibridación				Formación de la horquilla @ lectura				Diana/sonda @ Hibridación								
	Número de código	Organismo diana	Nombre de la sonda	PM de la Secuencia	ΔG	ΔH	ΔS	Tm (°C)	ΔG	ΔH	ΔS	Tm (°C)	ΔG	ΔH	ΔS	Tm (°C)	Td (Supra et al.)	dAG	dAH	dAS	dTm
	33M-01-120	Salmonella,	B-Sal 1686	10.220	-2.0	-47.5	-135.6	77.1					-5.5	-47.5	-140.9	64.0		-17.7	-131.2	-338.4	-9.0
	34M-01-238	Serratia marcescens,	B-Serratia-II	13.416	-0.1	-37.9	-112.7	83.1					-4.3	-37.9	-113.7	60.1		-22.9	-171.1	-441.5	9.8
	35M-01-239	Shigella	B-Shig-I	11.528	-1.0	-59.8	-176.3	68.0					-9.2	-79.9	-239.5	60.4		-24.5	-142.8	-352.5	9.7
	36M-01-246	Shigella	B-Shig-III	10.897	-1.4	-45.7	-141.0	72.3					-8.7	-73.1	-218.3	61.7		-17.7	-154.4	-407.4	-5.9
	37M-01-276	Shigella	B-Shig-III	10.897	-1.4	-48.7	-141.0	72.3					-8.7	-73.1	-218.3	61.7		-17.7	-154.4	-407.4	-5.9
	38M-01-287	Shigella spp.	Sto-Shlepp-4	11.529	-1.1	-59.8	-175.3	68.0					-9.2	-79.9	-239.5	60.4		-26.6	-163.1	-407.3	11.4
	37M-01-119	Staphylococci	B-Staphlepp-2	10.697	-3.0	-69.8	-189.1	77.4					-7.3	-69.8	-209.6	59.6		-17.9	-118.5	-299.7	-7.2
	38M-01-215	Staphylococcus aureus	B-Staur-3	11.528	-0.8	-38.1	-106.3	69.6					-3.8	-38.1	-108.2	60.5		-23.5	-169.4	-434.8	5.7
	38M-01-274	Staphylococcus epidermidis	Stslug	10.976	-1.0	-43.5	-126.6	72.8					-5.8	-43.5	-126.8	67.1		-22.2	-166.1	-429.4	0.0
	40M-01-148	Streptophomonas melitophila,	B-Stemal-2	11.262	-1.1	-38.0	-109.9	72.6					-4.0	-38.0	-114.1	59.9		-22.2	-167.7	-433.7	1.0
	41M-01-116	Streptococcus agalactiae,	B-Strage-3	10.697	-0.6	-38.8	-114.0	67.3					-3.6	-38.8	-118.2	55.2		-19.9	-156.4	-406.7	1.8
	42M-01-114	Streptococcus pneumoniae,	B-Strepe-2	11.662	-2.1	-60.6	-174.5	74.1					-7.6	-69.9	-276.2	52.3		-18.4	-152.7	-400.4	-5.7
	41M-01-249	Streptococcus pneumoniae,	B-Strepe-3	10.976	-1.3	-54.1	-167.4	70.7					-5.6	-67.2	-208.7	48.9		-20.2	-146.8	-377.3	0.0
	42M-01-113	Streptococcus pyogenes,	B-Strpyo-D	11.552	+1.9	-63.0	-162.3	74.9					-6.5	-60.5	-248.2	51.2		-18.1	-152.1	-399.4	-7.0
	43M-01-230	Streptococcus spp.	B-Strepd-III	12.061	-2.9	-48.5	-135.6	84.0					-6.9	-40.8	-136.8	72.6		-23.5	-176.7	-458.8	-6.5
	44M-01-267	Yersinia enterocolica	B-Yers-III	10.975	-1.4	-54.6	-159.1	74.1					-7.4	-71.2	-216.2	56.2		-22.2	-144.5	-324.5	0.0
	45M-01-221	Yersinia enterocolica,	B-Yers-II	10.497	-3.5	-47.4	-130.8	89.3					-9.0	-72.7	-215.7	63.9		-17.7	-140.7	-366.7	-16.7