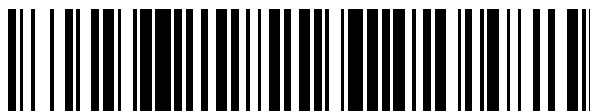


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 575**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.06.2013 PCT/FI2013/050716**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2014 WO14001648**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2013 E 13809410 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 2867372**

54 Título: **Método para determinar la presencia de agentes patógenos que causan diarrea**

30 Prioridad:

27.06.2012 FI 20125730
27.06.2012 US 201261664959 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.06.2019

73 Titular/es:

MOBIDIAG OY (100.0%)
Keilaranta 16
02150 Espoo, FI

72 Inventor/es:

ANTIKAINEN, JENNI y
KIRVESKARI, JUHA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 716 575 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para determinar la presencia de agentes patógenos que causan diarrea

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere al campo de la detección de agentes patógenos que causan diarrea a partir de muestras de un paciente, alimentos o medioambientales. Particularmente, la presente invención proporciona un método de ensayo basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de agentes patógenos que causan diarrea, particularmente especies de ECET y *Campylobacter*. La presente invención proporciona además materiales tales como cebadores, parejas de cebadores y sondas para uso en el método de la invención. Preferiblemente, el método de la invención es un ensayo con PCR en tiempo real (RT-PCR) múltiple para una determinación rápida de agentes patógenos clínicamente importantes, relacionados con la diarrea del viajero.

Antecedentes de la invención

15 La diarrea es un problema de salud importante a nivel mundial que causa morbilidad, pero también mortalidad, en especial de lactantes en los países en desarrollo. La diarrea es el problema más referido por los viajeros y está causada generalmente por una contaminación de los alimentos o el agua. En la mayoría de los casos la diarrea del viajero es leve y de corta duración, pero existen infecciones graves con dolor abdominal, diarrea con sangre y septicemia.

20 Las causas de la diarrea aguda de los viajeros son muchas y variadas. Además de las bacterias diarreicas clásicas, tales como *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella* y *Yersinia* también están asociadas con la diarrea del viajero cepas diarreicas de *E. coli*. (*E. coli* enterohemorrágica; ECEH, *E. coli* enterotoxigénica; ECET, *E. coli* de adhesión y borrado; ECA/E o *E. coli* enteroagregativa; ECEA, *E. coli* enteropatógena; ECEP, *E. coli* productora de verocitotoxina; ECVT, *E. coli* enterohemorrágica; ECEH, *E. coli* enteroinvasiva; ECEI). Una infección con *Salmonella* puede causar una enfermedad clínica variable partiendo de una infección leve subclínica, o conducir a una infección sistémica grave, fiebre tifoidea. *Salmonella* sp. invade al hospedador a través de las células epiteliales del colon, especialmente las células M utilizando un sistema de secreción de tipo III. También son capaces de sobrevivir dentro de fagosomas de macrófagos, y evitar el sistema inmune del hospedador por varias vías (Coburn et al., 2007). *Campylobacter jejuni* y *coli* están entre algunos de los agentes patógenos fecales humanos predominantes de la gran familia de *Campylobacter* que causan diarrea acuosa, fiebre y normalmente dolor abdominal fuerte. Se tienen que analizar a través de medios de diagnóstico para diferenciarlas de las otras especies de *Campylobacter* no asociadas con la diarrea. Son capaces de invadir el revestimiento del epitelio del colon y replicarse intracelularmente y causar apoptosis (Poly y Guerry, 2008; Allos, 2001). *Yersinia enterocolitica* y *pseudotuberculosis* albergan un plásmido de virulencia que contiene proteínas de adhesión e invasión relevantes, tales como YadA (Bottone, 1999, El Tahir et al., 2001). En *Y. enterocolitica* se requiere un plásmido de virulencia para causar una enfermedad clínica, mientras que *Y. pseudotuberculosis* tiene factores de virulencia genómicos adicionales. *Yersinia pestis* es el agente patógeno de la peste, que alberga factores de virulencia genómicos y tres plásmidos de virulencia que son todos ellos necesarios para causar una enfermedad clínica (Bottone, 1999). Los agentes patógenos tradicionales también están asociados con síntomas de inicio tardío, tales como la artritis reactiva, sacroileítis y uveítis anterior aguda.

40 El *Vibrio cholerae* es un agente patógeno ambiental altamente virulento que habita en aguas libres en algunos de los países tropicales, especialmente causando epidemias en zonas de catástrofe. Normalmente causa una diarrea acuosa masiva que lleva a la muerte del paciente si no es reanimado suficientemente. El factor de virulencia esencial es la toxina del cólera, que consiste en dos subunidades A y B. La toxina del cólera es capaz de unirse irreversiblemente a las proteínas G en las células epiteliales del colon responsables de la absorción de líquido y electrolitos, causando una secreción continua no voluntaria en el lumen intestinal (Nelson et al., 2009).

45 *Shigella* y ECEI están muy relacionadas genéticamente. Ambos organismos invaden el epitelio del colon a través de los genes localizados en el plásmido de virulencia pINV que codifican, por ejemplo, las proteínas Ipa y su regulador de la transcripción invE (Lan y Reeves, 2002; Parsot, 2005). ECEA muestra un patrón de adherencia característico para las células Hep-2 a través de fimbrias específicas codificadas por genes que se encuentran en el plásmido bajo la regulación de AggR (Flores y Okhuysen, 2009). ECEP se caracteriza por poseer una isla de patogenicidad denominada el locus de borrado de enterocito (LEE). Esta isla contiene genes tales como *eae* para la adherencia íntima de las cepas de ECEP a las células epiteliales intestinales. ECEP se diferencia de ECEH por la capacidad de las cepas de ECEH para producir las toxinas de tipo shiga I y II codificadas por los genes *stx1* y *stx2*. Estas citotoxinas causan una inflamación aguda en el intestino lo que conduce a dolor abdominal y diarrea con sangre. Además, la infección con ECEH puede conducir a complicaciones secundarias poco frecuentes pero graves, tales como el síndrome urémico hemolítico (SUH) (Chen y Frankel, 2005; Karch et al., 2005). El desafío de los ensayos con PCR múltiple es identificar variantes de ECEH, de modo que no haya una reacción cruzada con especies de *Shigella*/ECEI, ya que los genes diana que expresan toxinas en estas bacterias son muy similares.

55 La giardiasis es una infección del intestino delgado causada por *Giardia lamblia* (también conocida como *G. intestinalis*), un protozoo flagelado. La giardiasis es la enfermedad protozoaria patógena citada más frecuente en todo el mundo. Los viajeros son el grupo de mayor riesgo para una infección con giardiasis, especialmente aquellos que viajan a países en desarrollo. La giardiasis se propaga a través de la vía fecal-oral. La mayoría de las personas

contraen la enfermedad por la ingestión de agua o alimentos contaminados, o por no lavarse las manos después de tocar algo contaminado con quistes de *Giardia*. Las tasas de prevalencia de giardiasis oscilan entre 2-7% en los países desarrollados y entre 20-30% en la mayoría de los países en desarrollo. El CDC estima que hay un alza de 2,5 millones de casos de giardiasis anualmente. Los síntomas más comunes de una infección con *Giardia* incluyen diarrea con una duración de más de 10 días, dolor abdominal, flatulencia, distensión abdominal, vómitos y pérdida de peso. La giardiasis se diagnostica tradicionalmente mediante la detección de quistes o trofozoítos en las heces, trofozoítos en el intestino delgado o mediante la detección de antígenos de *Giardia* en las heces.

Actualmente, la rutina para el diagnóstico de una diarrea se basa principalmente en métodos de cultivo tradicionales e inmunoensayos, que son tanto laboriosos como de larga duración. Solo están disponibles para las especies de *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella* y *Yersinia*, así como para *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH), mientras que para otras especies importantes de *E. coli* diarreogénica no existe un método de cultivo, incluyendo ECET, ECEP, ECEA y ECEI. En los últimos años, se han publicado métodos basados en el ADN para el diagnóstico de *E. coli* diarreogénica (Antikainen et al., 2009; Aranda et al., 2004, Brandal et al., 2007; Guion et al., 2008; Kimata et al., 2005; Müller et al., 2007; Vidal et al., 2005; Vidal et al., 2004).

ECET provoca una diarrea acuosa mediante la producción de enterotoxinas termolábiles (LT) y/o termoestables (ST) [2-3]. ECET es considerada tradicionalmente como la causa más común de diarrea del viajero (Qadri et al., 2005). La presente invención está dirigida particularmente a mejorar la detección de ECET en ensayos por RT-PCR múltiple. La presente invención proporciona dos parejas de cebadores y sondas específicas para la enterotoxina termoestable de ECET codificada por el gen *est* y una pareja de cebadores y una sonda específica para la enterotoxina termolábil de ECET codificada por el gen *elt*. Estos cebadores y sondas se diseñan para amplificar esas secuencias diana en dichos genes, lo que hace posible una detección eficaz de variantes globales de ECET. Un problema adicional era que el gen diana *est* incluye múltiples elementos repetitivos y era difícil encontrar regiones conservadas suficientemente largas tanto para los cebadores como para la sonda.

La presente invención se dirige además a la mejora de la detección de la diarrea causada por especies de *Campylobacter* en ensayos con RT-PCR múltiple. La invención proporciona parejas de cebadores y sondas para el gen *rimM* de *C. jejuni* y el gen *gyrB* gn de *C. coli*. Con esos cebadores y sondas, *Campylobacter* que causa diarrea se puede identificar de forma distintiva de otra *Campylobacter* no patógena y otros agentes patógenos que causan diarrea. Se requeriría una combinación de dos dianas genómicas diferentes para resolver el problema.

En el documento WO2005/005659, se describe un método para detectar simultáneamente bacterias que causan diarrea, tales como los grupos de *E. coli*: ECET (*E. coli* enterotoxigénica), ECAVE (*E. coli* de adhesión y borrado), ECEP (*E. coli* enteropatógena), ECVT (*E. coli* productora de verocitotoxina) y ECEI (*E. coli* enteroinvasiva); y *Shigella* spp. El método es un ensayo con PCR múltiple en tiempo real y el ADN molde se aísla directamente a partir de una muestra de heces. De forma similar a la presente invención, el documento WO2005/005659 se dirige también al problema de detectar *E. coli* patógena para humanos con el fin de proporcionar una distinción entre los grupos patógenos de *E. coli* y otros agentes patógenos que causan diarrea. Sin embargo, las secuencias diana en los genes *est* y *elt* de ECET son diferentes en la presente invención de las dianas descritas en el documento WO2005/005659. Además, la presente invención proporciona una cobertura de variantes de ECET globales mediante el uso de tres parejas de cebadores y sondas específicas, mientras que el documento WO2005/005659 en la Tabla 3 da a conocer cuatro parejas de cebadores para el mismo fin. La Tabla 8 de la presente memoria descriptiva muestra que las variantes de ECET se pueden detectar mediante el uso de las tres parejas de cebadores de la presente invención.

En el documento WO2005/083122 se describe un método para la detección y la cuantificación de bacterias enteropatógenas en una muestra fecal, incluyendo especies de *Shigella*, especies de *Salmonella*, especies de *Campylobacter*, *Escherichia coli* enterohemorrágica o *Escherichia coli* que produce verocitotoxina, *Vibrio cholerae*, y *Clostridium perfringens*. El método es un ensayo con PCR en tiempo real basado en sondas TaqMan®.

En el documento WO2007/056463, se describe un método que comprende la amplificación de una muestra con una pluralidad de parejas de cebadores específicos de agentes patógenos, para generar amplicones de tamaños distintos a partir de cada una de las parejas de cebadores específicos de agentes patógenos. El método utiliza técnicas de PCR múltiple y en tiempo real. El método se puede utilizar para la detección de especies de *Salmonella*, especies de *Campylobacter*, *Escherichia coli* diarreogénica, *Vibrio cholerae*, especies de *Yersinia* tales como *Yersinia pestis* y *Giardia lamblia*.

En el documento WO2005/090596, se describe un ensayo para detectar microorganismos y, en particular bacterias, basándose en pruebas multigenotípicas de ADN bacteriano procedente de muestras humanas, animales o medioambientales. El método también se puede utilizar como una técnica de PCR en tiempo real múltiple usando sondas TaqMan®. El método se puede utilizar para la detección de especies de *Salmonella*, especies de *Campylobacter*, *Escherichia coli* diarreogénica, *Vibrio cholerae*, especies de *Yersinia* tales como *Yersinia pestis*.

En el documento US2004/0248148, se describe un enfoque de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con nucleasa 5' para la cuantificación de coliformes totales, *E. coli*, *E. coli* toxigénica O157:H7, *M. aeruginosa* toxigénica (hepatotoxinas de microcistina), *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium parvum*. El ensayo con PCR múltiple

también se puede utilizar para una detección simultánea de dos o más agentes patógenos.

En el documento WO02/070728, se describe un ensayo que se basa en un diseño de 'multisonda' en el que un solo conjunto de secuencias altamente conservadas, codificadas por el gen de 16S rRNA sirve como pareja de cebadores, y se utiliza en combinación con una secuencia interna altamente conservada, la sonda universal y una región variable interna, la sonda específica de especie. El sistema en tiempo real identifica de forma fiable 14 especies bacterianas comunes.

Los documentos CN101113471, CN101245384 y CN101235410 describen métodos de PCR para la detección rápida de agentes patógenos que causan diarrea a partir de muestras de alimentos.

Fukushima et al., 2003, describen un ensayo de PCR en tiempo real para la detección de 17 especies de agentes patógenos transmitidas por los alimentos o el agua, directamente a partir de una muestra de heces. Los niveles de detección eran de aproximadamente 10^5 bacterias patógenas por gramo de heces, por lo tanto, el protocolo para una muestra de heces con menos de 10^4 bacterias patógenas por gramo de heces, requiere una etapa de enriquecimiento durante la noche para lograr una sensibilidad adecuada.

Hidaka et al., 2009, describen una PCR múltiple en tiempo real para una detección exhaustiva de *E. coli* diarreaica. Este método es especialmente para la detección de bacterias patógenas a partir de una muestra de alimentos, tal como una muestra de carne.

Wang et al., 1997, describen un protocolo para la detección con PCR de 13 especies de agentes patógenos transmitidos por alimentos en los alimentos.

Existen algunos kits comerciales disponibles para la detección de agentes patógenos diarreicos basados en PCR múltiple, por ejemplo, xTAP GPP de Luminex y Diarrhea ACE Detection de Seegene. Ambos sistemas utilizan PCR múltiple como medio para amplificar ciertas secuencias de nucleótidos específicas de un organismo pero la detección final se basa en un análisis en otro aparato diferente. El medio utilizado para la detección tiene un impacto sobre el diseño del amplicón, el cebador y la sonda debido a los diferentes requerimientos de los formatos de detección. Además, no se describen secuencias de genes o amplicones usadas en la presente invención para la detección de ECET o *Campylobacter*.

La cantidad de agentes patógenos que causan diarrea es grande y un método de prueba para la diarrea debería identificarlos de manera óptima. Tener una reacción PCR por especie puede ser engorroso, ya que el número de muestras analizadas es normalmente elevado. Sería óptimo detectar múltiples especies con una reacción. En una configuración de PCR, la alternativa más obvia es la amplificación con PCR 'múltiple'. En la PCR múltiple, varios conjuntos de oligonucleótidos, cada uno diseñado para amplificar una especie/grupo de especies, están incluidos en el mismo recipiente de reacción y cada conjunto de oligonucleótidos se emplea para amplificar el ADN de su agente patógeno respectivo durante la misma reacción PCR. En esta invención, se describe un método basado en la PCR para una detección rápida de agentes patógenos clínicamente importantes, relacionados con la diarrea del viajero, particularmente ECET y/o *Campylobacter*. La presente invención describe cebadores y sondas diseñados para secuencias diana conservadas en variantes globales de ECET y *Campylobacter*. Estos cebadores y sondas son compatibles para un uso en cualquier RT-PCR múltiple para determinar la presencia de múltiples agentes patógenos que causan diarrea, ya que los sitios diana son únicos para ECET y *Campylobacter*.

La PCR múltiple presenta un desafío para la cuantificación del ADN del agente patógeno (qPCR): los diferentes amplicones compiten por los mismos componentes de la reacción PCR (por ejemplo, ADN polimerasa y MgCl₂) y esto puede comprometer la naturaleza cuantitativa de la reacción entre muestras y, especialmente, de comparaciones cuantitativas entre muestras. Se conoce comúnmente en la técnica que existe un sesgo en las eficacias de la amplificación entre diferentes cantidades o longitudes del molde, de modo que, por ejemplo, amplicones cortos se ven favorecidos en detrimento de los más largos.

Al mismo tiempo, se deben evitar reacciones cruzadas no deseadas de combinaciones de conjuntos de oligos múltiples. También hay que recordar que hay que comprobar un cebado erróneo de cualquier otra secuencia presente en la muestra.

Encontrar secuencias adecuadas de cebadores y de sondas para la detección de un grupo diverso de microbios patógenos puede que diste mucho de ser trivial, especialmente en el diseño de configuraciones múltiples en donde todos los amplicones y los moldes deben ser amplificados con una eficacia igual (por ejemplo, Giardia). Muchas de las especies están relativamente estrechamente relacionadas, por lo que es difícil localizar secuencias que son únicas para cada especie. También, debido a que hay un número significativo de variantes globales, es difícil identificar regiones conservadas globalmente o una combinación de un conjunto mínimo de regiones para detectar todas las variantes conocidas (por ejemplo, para ECEH, ECET, Yersinia patógena, Campylobacter patógena y Shigella/ECEI). Algunos genes poseen elementos estrechamente relacionados repetidos, complejos, lo que es un reto desde el punto de vista del diseño de un amplicón, especialmente cuando se diseñan amplicones para PCR múltiple. Por ejemplo, debido a los elementos repetitivos y a variantes menores, ECET no se puede detectar empleando solamente un amplicón.

La matriz de la muestra, que en el diagnóstico de la diarrea es comúnmente una muestra de heces o de alimentos, es probable que contenga una gran cantidad de inhibidores de la PCR. Esto reduce la eficacia de la amplificación de la reacción PCR y, por lo tanto, se espera que la optimización sea aún más cuidadosa desde la etapa de diseño del amplicón para verificar que todos los moldes y el número de copias se amplifican igualmente pero también de forma suficientemente eficaz. Por lo tanto, se requiere un diseño de los oligonucleótidos que permita una eficacia elevada de la PCR (de manera óptima, lo más cercana posible al 100%). El método de detección usado puede afectar también a la eficacia de amplificación y/o al sesgo.

Los presentes inventores han localizado ahora regiones de secuencias de ADN que son muy adecuadas para una amplificación y cuantificación específica y sensible de agentes patógenos que causan diarrea, particularmente ECET y *Campylobacter*. Por consiguiente, se han diseñado en la presente invención cebadores óptimos y sondas para PCR cuantitativa y se han validado para la identificación y cuantificación de agentes patógenos que causan diarrea. Los amplicones se han diseñado para sean tan específicos que se puedan combinar entre sí en cualquier conjunto múltiple. Naturalmente, un requisito previo para ello es que todos los amplicones descritos también se hayan diseñado para amplificar en las mismas condiciones de reacción y ciclación.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona método de ensayo basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de agentes patógenos que causan diarrea, particularmente especies de ECET y *Campylobacter*. La presente invención proporciona además materiales tales como cebadores, parejas de cebadores y sondas para uso en el método de la invención. Particularmente, la presente invención proporciona un método para determinar la presencia de agentes patógenos que causan diarrea en una muestra biológica que comprende las etapas de:

i) poner en contacto la muestra o el ácido nucleico aislado a partir de la misma con parejas de cebadores en un ensayo de PCR múltiple que comprende dos o más reacciones de PCR distintas, en donde los cebadores de dichas parejas de cebadores amplifican cualquiera de los amplicones tal y como se definen en SEQ ID NOS: 55-72, preferiblemente SEQ ID NOS: 61-63 y 65-68, al menos en parte;

ii) realizar una reacción en cadena de la polimerasa con mezclas de reacción obtenidas a partir de la etapa i) de manera que las secuencias diana de agentes patógenos que causan diarrea se amplifican específicamente si dichas secuencias están presentes en la muestra; y

iii) detectar la presencia de secuencias diana amplificadas en la mezcla de reacción, en donde la presencia de cualquiera de las secuencias diana es indicativa de la presencia de agentes patógenos que causan diarrea en la muestra.

Dicha muestra biológica puede ser una muestra de heces, una muestra de alimentos, tal como una muestra de carne, o cualquier muestra ambiental. La muestra se puede enriquecer antes de la etapa i).

Preferiblemente, las parejas de cebadores en la etapa i) del método se seleccionan a partir del grupo que consiste en las parejas de cebadores A) a R), más preferiblemente G) a I) y K) a N), que comprende o consisten en al menos uno de los siguientes oligonucleótidos:

A) cebador directo: 5'GCGTTCTTATGTAATGACTGCTGAAG-3' (SEQ ID NO: 1),

cebador inverso: 5'-AGAAATTCTTCTACACGAACAGAGTC-3' (SEQ ID NO: 2);

B) cebador directo: 5'-TGCATCCAGAGCAGTTCTGC-3' (SEQ ID NO: 3),

cebador inverso: 5'-CGGCGTCATCGTATACACAGG-3' (SEQ ID NO: 4);

C) cebador directo: 5'-CCAGGCTTCGTACAGTTGC-3' (SEQ ID NO: 5),

cebador inverso: 5'-CAGTGAAC TACCGTCAAAGTTATTACC-3' (SEQ ID NO: 6);

D) cebador directo: 5'-GCTCTTCGGCACAAGTAATATCAAC-3' (SEQ ID NO: 7),

cebador inverso: 5'-TCTATTTTAAATTCGGTGAAGCAAACG-3' (SEQ ID NO: 8);

E) cebador directo: 5'-TGGTCCATCAGGCATCAGAAGG-3' (SEQ ID NO: 9),

cebador inverso: 5'-GGCAGTGCGGAGGTCATTTG-3' (SEQ ID NO: 10);

F) cebador directo: 5'-TGCTTTTATAGGACATCCCTGATACTTTC-3' (SEQ ID NO: 11),

cebador inverso: 5'-TATCTACTCTTGATGCCAGAAAAGTAGC-3' (SEQ ID NO: 12);

G) cebador directo: 5'-AAAATTGCAAATCCGTTTAACTAATC-3' (SEQ ID NO: 13),

ES 2 716 575 T3

cebador inverso: 5'-GACTGACTAAAAGAGGGGAAAG-3' (SEQ ID NO: 14);

H) cebador directo: 5'-TCCTGAAAGCATGAATAGTAGC-3' (SEQ ID NO: 15),

cebador inverso: 5'-TTATTAATAGCACCCGGTACAAG-3' (SEQ ID NO: 16);

I) cebador directo: 5'-CCGGCAGAGGATGGTTACAG-3' (SEQ ID NO: 17),

5 cebador inverso: 5'-TTGATTGATATCCCTGAGATATATTGTG-3' (SEQ ID NO: 18);

J) cebador directo: 5'-GGAAGCAATACATATCTTAGAAATGAACTC-3' (SEQ ID NO: 19),

cebador inverso: 5'-TCGGACAAGTCAAGCATCTAC-3' (SEQ ID NO: 20);

K) cebador directo: 5'-GAGTGAAAAAGATTTTGTTCAGTTG-3' (SEQ ID NO: 21),

cebador inverso: 5'-AAAAGTCGCTCAGGTTATGC-3' (SEQ ID NO: 22);

10 L) cebador directo: 5'-AGTGCCTGAACCTCAATTTG-3' (SEQ ID NO: 23),

cebador inverso: 5'-TCGATAGGATTTTCTTCAAATATTTAC-3' (SEQ ID NO: 24);

M) cebador directo: 5'-GTTTGGTACAGTTTATGGCATTTCAC-3' (SEQ ID NO: 25),

cebador inverso: 5'-CATGGCAATATCAACAATACTCATCTTAC-3' (SEQ ID NO: 26);

N) cebador directo: 5'-CAGGAGCATGAGGTTACAGTATG-3' (SEQ ID NO: 27),

15 cebador inverso: 5'-TCTCTGGCCCCGCACAATG-3' (SEQ ID NO: 28);

O) cebador directo: 5'-GGGCTACAGAGATAGATATTACAGTAACTTAG-3' (SEQ ID NO: 29),

cebador inverso: 5'-CCACGGCTCTTCCCTCCAAG-3' (SEQ ID NO: 30);

P) cebador directo: 5'-TTCCGGTCGATCCTGCC-3' (SEQ ID NO: 31),

cebador inverso: 5'-GTTGTCCTGAGCCGTCC-3' (SEQ ID NO: 32);

20 Q) cebador directo: 5'-AGACGATCCAGTTTGTATTAG-3' (SEQ ID NO: 33),

cebador inverso: 5'GGCATCCTAACTCACTTAG-3' (SEQ ID NO: 34); y

R) cebador directo: 5'-TCTGGAAAACAATGTGTTC-3' (SEQ ID NO: 35),

cebador inverso: 5'-GGCATGTCGATTCTAATTC-3' (SEQ ID NO: 36).

25 Los amplicones amplificados preferidos en los organismos diana se indican en la Tabla 6. No obstante, una persona experta en la técnica sabe que esas secuencias de amplicones varían de forma natural en cepas relacionadas. Esa variación menor se puede tener en cuenta al diseñar cebadores adecuados para amplificar dicho amplicones en el método de la presente invención. Preferiblemente, en el método se amplifica al menos una secuencia de 20, 25, 30 o 35 nucleótidos de longitud de cada uno de los amplicones diana, seleccionados a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 55-72, preferiblemente SEQ ID NOS: 61-63 y 65-68.

30 El método de la invención se caracteriza por que la presencia de la secuencia diana amplificada, es decir, el producto, de cada una de las parejas de cebadores A) a R) en la reacción de PCR en la etapa iv), indica la presencia de agentes patógenos que causan diarrea en la muestra, del modo siguiente:

- el producto de la pareja de cebadores A) o B) indica la presencia de ECEH;
- el producto de la pareja de cebadores C) indica la presencia de ECEH/ECEP;
- 35 - el producto de la pareja de cebadores D) indica la presencia de *Salmonella*;
- el producto de la pareja de cebadores E) o F) indica la presencia de *Shigella*/ECEI;
- el producto de la pareja de cebadores G), H) o I) indica la presencia de ECET;
- el producto de la pareja de cebadores J) indica la presencia de ECEA;
- el producto de la pareja de cebadores K) indica la presencia de *Campylobacter jejuni*;

ES 2 716 575 T3

- el producto de la pareja de cebadores L) indica la presencia de *Campylobacter coli*;
- el producto de la pareja de cebadores M) indica la presencia de *Yersinia enterocolitica/pseudotuberculosis*;
- el producto de la pareja de cebadores N) indica la presencia de *Yersinia pseudotuberculosis/pestis*;
- el producto de la pareja de cebadores O) indica la presencia de *Vibrio cholerae*;
- 5 - el producto de la pareja de cebadores P) indica la presencia de *Giardia lamblia*;
- el producto de la pareja de cebadores Q) indica la presencia de *Entamoeba histolytica*; y
- el producto de la pareja de cebadores R) indica la presencia de *Cryptosporidium* sp.

10 Preferiblemente, cada cebador de dichas parejas de cebadores es menor de 35, 40, 45, 50 o 55 nucleótidos de longitud, y más preferiblemente, menos de 50 nucleótidos de longitud. Cada uno de los presentes cebadores también se puede definir como que consiste en al menos 10 nucleótidos contiguos presentes en una secuencia de cebador seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1-36.

15 Una realización específica de la invención es llevar a cabo dicho método como una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real y, en ese caso, las sondas de ácidos nucleico que comprenden o que consisten en las siguientes secuencias se utilizan específicamente con cada una de las parejas de cebadores A) a R), preferiblemente G) a I) y K) a N).

- la sonda para la pareja de cebadores A): 5'-TCCATGATARTCAGGCAGGACACTACTCAACCTTCC-3' (SEQ ID NO:37)
- la sonda para la pareja de cebadores B): 5'-TTGTCACTGTCACAGCAGAAGCCTTACGC-3' (SEQ ID NO:38)
- 20 - la sonda para la pareja de cebadores C): 5'-AGATTAACCTCTGCCGTTCCATAATGTTGTAACCA-3' (SEQ ID NO:39)
- la sonda para la pareja de cebadores D): 5'-CCAAACCTAAAACCAGTAAAGGCGAGCAGC-3' (SEQ ID NO:40)
- 25 - la sonda para la pareja de cebadores E): 5'-TCACTCCCGACACGCCATAGAAACGCATTT-3' (SEQ ID NO:41)
- la sonda para la pareja de cebadores F): 5'-ACAAACAGCAAAAGAGCATAGCATCCGAGAACT-3' (SEQ ID NO:42)
- la sonda para la pareja de cebadores G): 5'-CAAATAICCGTGAAACAACATGAC-3' (SEQ ID NO:43)
- la sonda para la pareja de cebadores H): 5'-AGGATTACAACAAATTCACAGCAGT-3' (SEQ ID NO:44)
- 30 - la sonda para la pareja de cebadores I): 5'-AGCAGGTTTCCCACCGGATCACCA-3' (SEQ ID NO:45)
- la sonda para la pareja de cebadores J): 5'-TCCGTATATTATCATCAGGCATCCTTTAGGCGT-3' (SEQ ID NO:46)
- la sonda para la pareja de cebadores K): 5'-AAGACCCACAGTITTACCAAGTTTT-3' (SEQ ID NO:47)
- la sonda para la pareja de cebadores L): 5'-AACITGCTCTTTATGTGCGT-3' (SEQ ID NO:48)
- 35 - la sonda para la pareja de cebadores M): 5'-CCTGGATAAGCGAGCGACGTATTCTCTATGC-3' (SEQ ID NO:49)
- la sonda para la pareja de cebadores N): 5'-AAACCAAAGCCGCCACACCACAG-3' (SEQ ID NO:50)
- la sonda para la pareja de cebadores O): 5'-AACCTGCCAATCCATAACCATCTGCTGCTG-3' (SEQ ID NO:51)
- 40 - la sonda para la pareja de cebadores P): 5'-ACGAAGCCATGCATGCCCGCT-3' (SEQ ID NO:52)
- la sonda para la pareja de cebadores Q): 5'-ACAAAATGGCCAATTCATTCAATGAA-3' (SEQ ID NO:53)
- la sonda para la pareja de cebadores R): 5'-CCTCCTAATCCAGAATGCCTCCAG-3' (SEQ ID NO:54)

La temperatura de fusión, T_m , de algunas de las sondas (tales como sondas para las parejas de cebadores G), H), K) y L)) se incrementa preferiblemente en al menos 5 grados °C mediante la adición de nucleótidos modificados. La cantidad de nucleótidos modificados en una sonda es 1, 2, 3 o preferiblemente 4. Los nucleótidos subrayados en la lista anterior son nucleótidos modificados, en donde cada uno incrementa la T_m de la sonda. El nucleótido modificado puede ser un nucleótido LNA (Exiqon A/S), "minor groove binder" (MGB®), SuperBase o ácido nucleico peptídico (PNA) o cualquier otra modificación que incrementa la T_m de la sonda.

Preferiblemente, las sondas anteriores comprenden las secuencias tal y como se definen y tienen menos de 40, 45, 50 o 55 nucleótidos de longitud, y más preferiblemente, menos de 50 nucleótidos de longitud. Cada una de las sondas presentes también se pueden definir como que consisten en al menos 10 nucleótidos contiguos presentes en una secuencia de una sonda seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 37-54.

El método de la invención se basa en una técnica de PCR múltiple, en donde las parejas de cebadores se dividen en reacciones de PCR distintas. Como pauta general, el ensayo múltiple se debe diseñar de modo que los agentes patógenos que aparecen más frecuentemente (por ejemplo, Antikainen et al., 2009) están en diferentes reacciones múltiples.

En una realización, la invención proporciona cebadores de nucleótidos que comprenden o que consisten en cualquiera de las secuencias de cebadores procedentes de las parejas de cebadores G) a I) y K) a N), tal y como se han definido anteriormente.

En otra realización, la invención proporciona parejas de cebadores de nucleótidos que comprenden o que consisten en las secuencias procedentes de cualquiera de las parejas de cebadores G) a I) y K) a N) tal y como se han definido anteriormente.

En una realización adicional, la invención proporciona sondas de nucleótidos que comprenden o que consisten en cualquiera de las secuencias de las sondas tal y como se han definido anteriormente.

La presente invención se dirige preferiblemente a un método para determinar la presencia de agentes patógenos que causan diarrea en una muestra, en donde la presencia de al menos los agentes patógenos ECET, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* se comprueba en dicha muestra. Otros agentes patógenos diana pueden ser *Yersinia enterocolitica/pseudotuberculosis* y *Yersinia pseudotuberculosis/pestis*.

La presente invención se refiere además a la utilización de cebadores de nucleótidos, parejas de cebadores o sondas tal y como se han definido anteriormente, para la determinación de la presencia de agentes patógenos que causan diarrea en una muestra.

La presente invención también proporciona kits para la detección de la presencia de agentes patógenos que causan diarrea en una muestra. Un kit de ese tipo comprende parejas de cebadores seleccionadas a partir del grupo que consiste en las parejas de cebadores A) a R), preferiblemente G) a I) y K) a N), tal y como se han definido anteriormente. El kit puede comprender además una sonda seleccionada a partir de las sondas tal y como se han definido anteriormente. El uso de las parejas de cebadores y las sondas se ha descrito anteriormente y en el Ejemplo a continuación. Preferiblemente, dicho kit comprende medios para una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, tales como sondas marcadas, enzimas polimerasas, tampones y nucleótidos. Preferiblemente, dicho kit es para la detección de la presencia de al menos agentes patógenos de ECET, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en una muestra.

La presente invención se describe adicionalmente en el siguiente ejemplo, que no pretende limitar el alcance de la invención.

Ejemplo

Materiales y métodos

Muestras de pacientes. Muestras de heces de control se cultivaron en HUSLAB para *Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella*, *Campylobacter* y ECEH con métodos bioquímicos convencionales. Se reclutó un total de 146 viajeros en la Clínica Travel (Medicity, Helsinki, Finlandia) para participar en este estudio durante un período de seis meses. La edad variaba desde 1 a 72 años (media 39,2 años); 84 (57,5%) eran mujeres y 62 (42,5%) eran varones. Los destinos de los viajes fueron Europa para el 7,5%, Asia para el 32,9%, África para el 44,5%, Australia para el 1,4% y América para el 13,7% de los casos.

Los ácidos nucleicos totales se purificaron a partir de las muestras de heces con el kit NucliSENS utilizando la plataforma easyMAG como se describe en Antikainen et al., 2009. Brevemente, hisopos de heces se suspendieron en 100 µl de tampón Tris-EDTA y se purificaron por el método general de la plataforma easyMAG y se eluyeron hasta un volumen de 25 µl. El material eluido (0,5 µl) se utilizó como un molde en la PCR.

Alternativamente, los hisopos se pueden suspender directamente en tampón de lisis. Las muestras se eluyen hasta un volumen de 100 µl y 2 µl de material eluido se utiliza como un molde en la PCR. Este protocolo es adecuado para la

preparación de muestras integradas, totalmente automatizada y las etapas de configuración de placas para la PCR.

Identificación de las cepas aisladas. Las muestras fecales positivas en la PCR para *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter* y ECEH se cultivaron y se identificaron con métodos de diagnóstico normales. Dado que para las cepas de *E. coli* diarreogénica no existe un método de rutina basado en el cultivo, las muestras positivas se analizaron mediante una PCR múltiple desarrollada previamente (Antikainen et al., 2009).

A partir de las muestras en las que no tuvo éxito el aislamiento de cepas bacterianas, los genes correspondientes se amplificaron por separado y se secuenciaron en la Sequence Core Facility en el Haartman Institute (Helsinki, Finlandia) usando los cebadores indicados en la Tabla 1. Las secuencias se identificaron mediante la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Diseño de la PCR en tiempo real. La PCR se diseñó para identificar genes de virulencia específicos, genes específicos de especie o regiones específicas de especie dentro de genes universales establecidos (Tabla 1). Los cebadores y las sondas de la PCR en tiempo real se diseñaron con el programa informático Allele ID and Beacon Designer (Palo Alto, CA) para reconocer los genes diana correctos y sus variantes globales, incluyendo la búsqueda con BLAST y la predicción de la estructura secundaria usando la base de datos del NCBI. La RT-PCR se realizó sobre el sistema de detección Mx3005P (Agilent Technologies, Garden Grove, CA) y las condiciones del termociclado fueron 95°C durante 15 min, 40 ciclos de 94°C durante 1 min y 60°C durante 1 min. La fluorescencia se registró en cada etapa de reasociación. La reacción de 20 µl contenía la mezcla maestra 1 x Qiagen Multitect NoROX (Qiagen, Hilden, Alemania), 1 µl de mezcla de cebador/sonda (Tablas 1 y 2) y 0,5 µl de ADN molde.

Especificidad de la PCR. La especificidad analítica de la PCR se analizó mediante el uso de 249 cepas bacterianas como controles positivos incluyendo cepas de *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Yersinia* y *Vibrio* así como cepas de *E. coli* diarreogénica (Tablas 1 y 2). Las cepas eran originarias del Laboratorio del Hospital Universitario de Helsinki (HUSLAB), el Instituto Nacional de Salud y Bienestar (THL) y un obsequio amable de M. Alexander Schmidt e Inga Benz (Westfälische Wilhelms-Universität de Münster, Alemania), de Isabel Scaletsky (Universidade Federal de São Paulo, Brasil), así como de Lin Thorstensen Brandal (Instituto Noruego de Salud Pública, Noruega). Como controles negativos, se utilizaron 243 cepas bacterianas procedentes de todos los géneros principales, como se describe en Antikainen et al., 2009.

Para el análisis con PCR, se recogieron células bacterianas hasta 100 µl de agua, se hirvieron durante 15 minutos, se centrifugaron un minuto a 13.000 rpm y el material sobrenadante (0,5 µl) se utilizó en reacciones de PCR o el ADN bacteriano se purificó con el kit NucliSENS usando la plataforma de purificación automática de ácido nucleico easyMAG, tal y como indica el fabricante (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia).

Sensibilidad analítica de la PCR. Para analizar la sensibilidad para uso clínico, una mezcla de ADNs que contenía todos los moldes purificados mediante easyMAG para cada amplicón, se diluyó 10 veces y se analizó por PCR. Además, la amplificación de cada informador se analizó por separado en diluciones de 10 veces utilizando una masa bacteriana hervida. Resumiendo, las bacterias se cultivaron en placas de agar, se recogieron en tampón TE y el recuento de bacterias viables se determinó (unidad formadora de colonias (UFC)). Las bacterias se diluyeron 10 veces y se hirvieron durante 15 minutos, se centrifugaron un minuto a 13.000 rpm y el material sobrenadante (0,5 µl) se usó en las reacciones de PCR.

Sensibilidad y especificidad clínicas. La especificidad y sensibilidad clínicas se analizaron con muestras clínicas (n = 119) que se sabía que eran positivas para *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Yersinia* o ECEH mediante un método de cultivo de rutina en HUSLAB. Además, se analizaron 65 muestras de cultivo negativas.

Resultados

Validación del método de PCR en tiempo real. El ensayo de PCR en tiempo real fue optimizado y validado utilizando las cepas de referencia incluyendo 249 cepas positivas y 243 cepas pertenecientes a otros géneros principales (Tabla 5). Todas las cepas de control positivo se identificaron correctamente y no se obtuvo ninguna amplificación falsa positiva. Por lo tanto, el ensayo alcanzó un 100% de especificidad analítica.

La especificidad y la sensibilidad clínicas se analizaron a partir de muestras fecales obtenidas de diagnósticos de rutina. Las muestras de rutina positivas para *Salmonella* (n = 50), *Campylobacter* (n = 50), *Yersinia* (n = 4) y *Shigella* (n = 6), así como ECEH (n = 9), se analizaron con PCR y todas menos una se pudieron amplificar correctamente (Tabla 5). Además, se analizaron 64 muestras negativas de cultivos y ninguna era positiva para *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia* o *Shigella*. Las cepas de *E. coli* diarreogénica no se pudieron identificar con ese método ya que no existe un método de cultivo. Por lo tanto, la sensibilidad clínica del ensayo era del 99,2% y la especificidad clínica era del 100%.

La sensibilidad analítica de la PCR se definió diluyendo 10 veces la mezcla de ADN de molde analizada con PCR. La sensibilidad con 40 ciclos de amplificación era de 0,1 ng/ml para ECEH y *Salmonella* y para las demás la sensibilidad era de 1 ng/ml. Además, la sensibilidad se midió a partir del ADN obtenido hirviendo la cepa bacteriana. En ese ensayo, el límite de detección era de 5-50 UFC para cada reacción. Esos resultados representan la menor concentración requerida para una identificación correcta (>90% positiva).

Validación clínica de la PCR. El método de PCR en tiempo real se utilizó en el análisis de las muestras fecales de 146 viajeros antes y después del viaje al extranjero. Los datos se presentan en las Tablas 3 y 4. Todas las muestras eran positivas con el control interno; no se detectó una inhibición de la PCR. De las muestras anteriores al viaje, solo tres (2,1%) eran positivas y estas eran positivas para ECEA. A partir de esas muestras, se aisló la cepa de *E. coli* que proporcionaba un resultado coincidente con la PCR. Los hallazgos más comunes eran cepas de *E. coli* diarreogénica (ECEP; 41,1%, ECEA; 38,4%, ECET; 18,5%, ECEH; 7,5%), seguidas por *Campylobacter* (4,1%), *Salmonella* (2,1%) y *Shigella*/ECEI (1,4%).

Todas las muestras positivas para *Campylobacter*, *Yersinia*, *Shigella*, *Salmonella* o ECEH se confirmaron como positivas, ya sea mediante un cultivo o mediante una secuenciación del producto de la PCR. Se encontraron dos o más resultados a partir de 45 pacientes.

Secreción de especies de E. coli diarreogénica. La cinética de las ECD (*E. coli* diarreogénica) se estudió a partir de 60 pacientes que no habían viajado al extranjero en los dos meses del período de seguimiento. Se llegó a los mismos resultados en siete de las 60 muestras (cuatro veces ECEA, dos veces ECEP), se encontraron resultados diferentes de los que se habían hallado previamente en cinco pacientes, pero todos ellos habían viajado al extranjero durante el período de seguimiento, mientras que las otras muestras del seguimiento eran negativas. Esta cinética está en consonancia con otros agentes patógenos de *Enterobacteriaceae* descritos anteriormente.

Se detectó un norovirus en 5,5% de los pacientes, lo que sugiere que las bacterias son agentes patógenos predominantes en la diarrea del viajero.

Discusión

Este es el primer estudio de seguimiento sistemático para analizar todos los agentes patógenos principales asociados con la diarrea del viajero, usando los nuevos métodos moleculares. El diseño del estudio permitió a los inventores realizar un seguimiento de las consecuencias de viajar a países tropicales, caso por caso, ya que estaba disponible una muestra normal de antes del viaje estuviera disponible. El logro más importante del estudio era que todos los agentes patógenos principales dentro del grupo de pacientes se podían identificar usando métodos modernos directos, lo que elimina los sesgos inherentes en comparación con los resultados procedentes de diferentes estudios. Como era de esperar, en los países con una higiene elevada, como Finlandia, había una prevalencia muy baja de agentes patógenos diarreicos en los individuos sanos (2,1%). En franco contraste, los inventores fueron capaces de identificar un agente patógeno en el 74% de los pacientes sintomáticos, lo que es probablemente la mejor estimación de pacientes con diarrea del viajero realizada hasta la fecha, lo que confirma que prácticamente todos los agentes patógenos son importados, y que no pertenecen a la flora normal de los pacientes finlandeses. Todos los agentes patógenos diarreicos eran más frecuentes en los pacientes sintomáticos que en los individuos asintomáticos, incluyendo todas las especies de *E. coli* diarreogénica, lo que sugiere que todos ellos son agentes patógenos diarreicos relevantes, y no solo un reflejo de una alteración de la flora normal. De las muestras procedentes de pacientes sintomáticos, un 26% eran negativas para todos los agentes patógenos bacterianos estudiados. Este estudio está en consonancia con otros estudios recientes que sugieren que las especies de *E. coli* diarreogénica son los agentes patógenos bacterianos más predominantes en los pacientes con diarrea del viajero.

El estudio incluye todos los agentes patógenos bacterianos principales, con exclusión de *Aeromonas* sp, *Plesiomonas*, *Bacteroides fragilis* enterotoxigénica, *Arcobacter* y ECDA. Su proporción relativa es baja basándose en estudios anteriores, y su papel patógeno y la incidencia no se entiende completamente todavía (von Graevenitz, 2007). El método de PCR en tiempo real reconoce genes de virulencia o genes específicos de especie de los agentes patógenos. Por ejemplo, para identificar ECEA virulenta, se seleccionó el gen aggR ya que es el gen mejor caracterizado que contribuye al patrón de agregación y a los síntomas de diarrea (Monteiro et al., 2009); (Huang et al., 2007; Mohamed et al., 2007). Para incluir todas las posibles especies diana clínicamente relevantes, era necesario detectar múltiples genes diana diferentes y sus regiones conservadas para tener una sensibilidad y especificidad óptimas del ensayo. Por ejemplo, era imposible detectar especies patógenas entre las familias de *Yersinia* y *Campylobacter* usando solamente un conjunto de cebadores-sonda. La sensibilidad y la especificidad del ensayo eran elevadas, aproximadamente del 100%, en comparación con los métodos de referencia independientes, lo que sugiere que se podría sustituir el cultivo de heces como método de escrutinio primario para la diarrea del viajero. En cualquier caso, la proporción elevada de ECD en los pacientes con diarrea sugiere que al menos ellos se deberían analizar por el método capaz de identificar ECD, tal como la PCR.

El diseño del ensayo permite la identificación de 13 agentes patógenos utilizando simultáneamente muestras de control en condiciones óptimas. Los inventores han sido capaces de identificar hasta cuatro agentes patógenos diferentes a partir de una muestra de un paciente, lo que demuestra que se pueden identificar múltiples agentes patógenos en paralelo. Esto está en consonancia con el hecho de que frecuentemente hay múltiples agentes patógenos causando la enfermedad. Sin embargo, una reacción normal de PCR favorece de forma inherente la diana más abundante. Un resultado falso negativo es más probable cuando hay uno o dos agentes patógenos de forma más abundante, junto con una copia o muy pocas copias de un agente patógeno dentro de la misma reacción múltiple. Esta opción debe ser controlada por otros métodos, y/o realizar otro muestreo e informar y establecer una alerta cuando se aplica este ensayo para cualquier propósito de diagnóstico. Para minimizar el riesgo de resultados falsos negativos, la composición múltiple se diseñó de modo que los agentes patógenos más frecuentes estaban en

reacciones múltiples diferentes.

Un control positivo interno se sometió a ensayo con cada muestra para vigilar la presencia de inhibidores putativos de la PCR, pero no se detectó ninguna inhibición. Esto sugiere que el proceso de extracción de ADN semi-automatizado tiene la calidad suficiente, y es adecuado para el análisis de agentes patógenos en heces.

- 5 En conjunto, este estudio está en consonancia con los otros estudios recientes que sugieren que las especies de *E. coli* diarreogénica son los agentes patógenos predominantes en las heces de un viajero. Con la aplicación de la nueva tecnología de PCR en tiempo real, estos se pueden escrutar ahora con éxito, junto con otros agentes patógenos fecales, directamente a partir de muestras de heces.

Tabla 1. Cebadores. (SEQ ID NOS: 1-36 y 73-74)

Origen	Gen	Cebador directo (5'→ 3')	cebador inverso (5'→ 3')
Múltiple 1			
ECEH	<i>sbx1</i>	GCGTTCTTATGTAAATGACTGCTGAAG	AGAAATTCCTTACACGAAACAGAGTC
ECEH	<i>sbx2</i>	TGCATCCAGAGCAGTTCTGC	CGGGTCATCGTATACACAGG
ECEH/ECEP	<i>eae</i>	CCAGGCTTCGTCACAGTTGC	CAGTGAACCTACCGTCAAAGTTATTACC
<i>Salmonella</i>	<i>invA</i>	GCTCTTCGGCACAAAGTAATATCAAC	TCTATTTTAAATTCGTTGAAGCAAAAACG
<i>Oryza sativa</i> , gen terminal de floración	<i>Ory</i> (un control)	CTAATCCCAGCAACCCAACC	CTAATCAATGTGAGACATATGATAGAAAATC
Múltiple 2			
ECET	<i>est</i>	AAAAATTGCAAAA TCCGTTT AACT AATC	GACTGACTAAAAGAGGGGAAAG
ECET	<i>est</i>	TCCTGAAAAGCATGAATAGTAGC	TTATTAATAGCACCCCGGTACAAG
ECET	<i>elt</i>	CCGGCAGAGGATGGTTACAG	TTGATTGATATTCCTGAGATAATTTGTG
<i>Yersinia enterocolitica/pseudotuberculosis</i>	<i>virF</i>	GTTTGGTACAGTTTATGGCATTTCAC	CATGGCAATATCAACAATACTCATCTTAC
<i>Yersinia pseudotuberculosis/pestis</i>	<i>rumB</i>	CAGGAGCATGAGGTTTACAGTATG	TCTCTGGCCCCCGCACAAATG
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>rimM</i>	GAGTGAAAAAGATTTTGTCAAAGTTG	AAAAGTCGCTCAGGTTATGC
<i>Campylobacter coli</i>	<i>gyrB</i>	AGTGCCTGAACCTCAATTTG	TCGATAGGATTTTCTTCAAAAATATTTTAC
<i>Oryza sativa</i> , gen terminal de floración	<i>Ory</i> (un control)	CTAATCCCAGCAACCCAACC	CTAATCAATGTGAGACATATGATAGAAAATC

Múltiple 3				
<i>Shigella/ECEI</i>	<i>ipaH</i>	TGGTCCATCAGGCATCAGAAAGG	GGCAGTGCGGGAGGTCATTTG	
<i>Shigella/ECEI</i>	<i>invE</i>	TGTCTTTATAGGACATCCCTGATACTTTTC	TATCTACTCTTTGATGCCAGAAAACTAGC	
ECEA	<i>aggR</i>	GGAAGCAATACATATCTTAGAAATGAACTC	TCGGACAACCTGCAAGCATCTAC	
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>ctx</i>	GGGCTACAGAGATAGATATTACAGTAACTTAG	CCACGGCTCTTCCCTCCAAG	
<i>Oryza sativa</i> , gen terminal de floración	<i>Ory</i> (un control)	CTAATCCCAGCAACCCAACC	CTAATCAATGTGAGACATATGATAGAAAATC	
Múltiple 4				
<i>Giardia</i> sp	gen 18S rRNA	TTCCGGTCGATCCTGCC	GTTGTCCCTGAGCCCGTCC	
<i>Entamoeba histolytica</i>	gen 18S rRNA	AGACGATCCAGTTTGTATTAG	GGCATCCTAACTCACTTAG	
<i>Cryptosporidium</i> sp.	<i>cowp</i>	TCTGGAAAACAATGTGTTC	GGCATGTGCGATTCTAAATTC	
<i>Oryza sativa</i> , gen terminal de floración	<i>Ory</i> (un control)	CTAATCCCAGCAACCCAACC	CTAATCAATGTGAGACATATGATAGAAAATC	

Tabla 2. Sondas para rtPCR.

Origen	Gen	Sonda (5'→ 3')	(SEQ ID NOS: 37-54 y 75)	Modificación 5' de la sonda	Modificación 3' de la sonda
Múltiple 1					
ECEH	<i>stx1</i>	TCCATGATARTCAGGCAGGACACTACTCAACCTTCC		6-FAM	BHQ-1
ECEH	<i>stx2</i>	TTGTCACTGTACAGCAGAGAAGCCTTACGC		6-FAM	BHQ-1
ECEH/ECEP	<i>eae</i>	AGATTAACCTCTGCCGTTCCATAATGTTGTAACCA		JOE	BHQ-1
Salmonella	<i>invA</i>	CCAAACCTAAAACCAGTAAAGGCCGAGCAGC		TXR	BHQ-2
Oryza sativa, gen terminal de floración	<i>Ory</i> (un control)	CCTGCACTGGTAAGCTATG		CY5	BHQ-2
Múltiple 2					
ECET	<i>est</i>	CAAAATATCCGTGAAACAACATGAC		6-FAM	BHQ-1
ECET	<i>est</i>	AGGATTACAACACAAATTCACAGCAGT		6-FAM	BHQ-1
ECET	<i>elt</i>	AGCAGGTTTCCCACCGGATCACCA		6-FAM	BHQ-1
Yersinia enterocolitica/pseudotuberculosis	<i>virF</i>	CCTGGATAAGCGAGCGACGTATTCTCTATGC		JOE	BHQ-1
Yersinia pseudotuberculosis/pestis	<i>rumB</i>	AAACCAAAGCCGCCACACCACAG		JOE	BHQ-1
Campylobacter jejuni	<i>rimM</i>	AAGACCCACAGTTTTACCAGTTTT		TXR	BHQ-2
Campylobacter coli	<i>gyrB</i>	AAC TTGGCTCTTCTTATGTGCGT		TXR	BHQ-2
Oryza sativa, gen terminal de floración	<i>Ory</i> (un control)	CCTGCACTGGTAAGCTATG		CY5	BHQ-2

Múltiple 3						
<i>Shigella/ECEI</i>	<i>ipaH</i>	TCACTCCCGACACGCCATAGAAAACGCATTT	6-FAM	BHQ-1		
<i>Shigella/ECEI</i>	<i>invE</i>	ACAAAACAGCAAAAAGAGCATAGCATCCGAGAACT	6-FAM	BHQ-1		
ECEA	<i>aggR</i>	TCCGTATATTATCATCAGGGCATCCCTTTAGGCCGT	JOE	BHQ-1		
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>ctx</i>	AACCTGCCAATCCATAACCATCTGCTGCTG	TXR	BHQ-2		
<i>Oryza sativa</i> , gen terminal de floración	<i>Ory</i> (un control)	CCTGCACTGGTAAGCTATG	CY5	BHQ-2		
Múltiple 4						
<i>Giardia sp</i>	gen 18S <i>rRNA</i>	ACGAAGCCATGCATGCCCGCT	6-FAM	BHQ-1		
<i>Entamoeba histolytica</i>	gen 18S <i>rRNA</i>	ACAAAATGGCCAAATTCATTCAATGAA	JOE	BHQ-1		
<i>Cryptosporidium sp.</i>	<i>cowp</i>	CCTCCTAATCCAGAATGTCCTCCAG	TXR	BHQ-2		
<i>Oryza sativa</i> , gen terminal de floración	<i>Ory</i> (un control)	CCTGCACTGGTAAGCTATG	CY5	BHQ-2		

Tabla 3. Resultados antes y después del viaje al extranjero.

	Antes de viajar al extranjero	Después de viaje al extranjero
	número (%)	número (%)
<i>Campylobacter</i>	0 (0)	6 (4,1)
<i>Salmonella</i>	0 (0)	3 (2,1)
<i>Shigella</i> / ECEI	0 (0)	2 (1,4)
<i>Yersinia</i>	0 (0)	0 (0)
ECEH	0 (0)	11 (7,5)
ECEA	3 (2,1)	56 (38,4)
ECEP	0 (0)	60 (41,1)
ECET	0 (0)	27 (18,5)
<i>Vibrio</i>	0 (0)	0 (0)
Total	3 (2,1)	165 (113,0)

Tabla 4. Resultados después de un viaje al extranjero con o sin síntomas.

	asintomático	sintomático
	número (%)	número (%)
<i>Campylobacter</i>	0 (0)	6 (4,1)
<i>Salmonella</i>	1 (0,7)	2 (1,4)
<i>Shigella</i> /ECEI	0 (0)	2 (1,4)
<i>Yersinia</i>	0 (0)	0 (0)
<i>Vibrio</i>	0 (0)	0 (0)
ECEH	4 (2,7)	7 (4,8)
ECEA	15 (10,3)	40 (27,4)
ECEP	19 (13,0)	39 (26,7)
ECET	5 (3,4)	22 (15,1)
Total	31 (60,8)	69 (74,2)

ES 2 716 575 T3

Tabla 5. Un resumen de cepas conocidas de control positivo y muestras.

	PCR positiva	Total
Cepas puras de control		
Cepas de control positivo	246	246
Cepas de control negativo	0	243
Total		489
Muestras fecales de control		
Positivas		
<i>Campylobacter</i>	52	53
<i>Salmonella</i>	50	50
<i>Yersinia</i>	5	5
<i>Shigella</i>	6	6
ECEH	9	9
Negativas	0	65

Tabla 6. Amplicones (5'→ 3') amplificados en organismos diana.

<u><i>ECEH stx1</i></u>
GCGTTCTTATGTAATGACTGCTGAAGATGTTGATCTTACATTGAACTGGGGAAGGTTGAGTAGTG TCCTGCCTGATTATCATGGACAAGACTCTGTTCTGTGTAGGAAGAATTCT (SEQ ID NO:55)
<u><i>ECEH stx2</i></u>
TGCATCCAGAGCAGTTCTGCGTTTTGTCACTGTCACAGCAGAAGCCTTACGCTTCAGGCAGATACA GAGAGAATTCGTCAGGCACTGTCTGAACTGCTCCTGTGTATACGATGACGCCG (SEQ ID NO:56)
<u><i>ECEH / ECEP eae</i></u>
CCAGGCTTCGTCACAGTTGCAGGCCTGGTTACAACATTATGGAACGGCAGAGGTTAATCTGCAGA GTGGTAATAACTTTGACGGTAGTTCCTG (SEQ ID NO:57)
<u><i>Salmonella invA</i></u>

<p>GCTCTTCGGCACAAGTAATATCAACGGTACAGTCTCTGTAGAGACTTTATCGAGATCGCCAATCA GTCCTAACGACGACCCTTCTTTTTCTCAATACTGAGCGGCTGCTCGCCTTGCTGGTTTTAGGTTT GGCGGCGCTACGTTTTGCTTCACGGAATTTAAAATAGA (SEQ ID NO:58)</p>
<p><i>Shigella</i> / ECEI ipaH</p>
<p>TGGTCCATCAGGCATCAGAAGGCCTTTTCGATAATGATACCGGCGCTCTGCTCTCCCTGGGCAGG GAAATGTTCCGCCTCGAAATTCTGGAGGACATTGCCCGGATAAAGTCAGAACTCTCCATTTGT GGATGAGATAGAAGTCTACCTGGCCTTCCAGACCATGCTCGCAGAGAACTTCAGCTCTCCACTG CCGTGAAGGAAATGCGTTTCTATGGCGTGTGCGGAGTGACAGCAAATGACCTCCGCACTGCC (SEQ ID NO:59)</p>
<p><i>Shigella</i> / ECEI invE</p>
<p>TGTCTTTATAGGACATCCCTGATACTTTCAGAAAATTAAGACCAATACCAAGTTCTCGGATGCTAT GCTCTTTTGCTGTTTGTATATCGTTTGCTAGTTTTCTGGCATCAAGAGTAGATA (SEQ ID NO:60)</p>
<p>ECET est</p>
<p>AAAATTGCAAAATCCGTTTAACTAATCTCAAATATCCGTGAAACAACATGACGGGAGGTAACATG AAAAAGCTAATGTTGGCAATTTTTATTTCTGTATTATCTTCCCCTCTTTTAGTCAGTC (SEQ ID NO:61)</p>
<p>ECET est</p>
<p>TCCTGAAAGCATGAATAGTAGCAATTACTGCTGTGAATTGTGTTGTAATCCTGCTTGTACCGGGTG CTATTAATAA (SEQ ID NO:62)</p>
<p>ECET elt</p>
<p>CCGGCAGAGGATGTTTACAGATTAGCAGGTTTCCACCGGATCACCAAGCTTGGAGAGAAGAAC CCTGGATTCATCATGCACCACAAGGTTGTGGAAATTCATCAAGAACAATTACAGGTGATACTTGT AATGAGGAGACCCAGAATCTGAGCACAATATATCTCAGGGAATATCAATCAA (SEQ ID NO:63)</p>
<p>ECEA aggR</p>
<p>GGAAGCAATACATATCTTAGAAATGAACTCATATTTCTTGAGAGAGGAATAAATATATCAGTAAG ATTGCAAAAAGAAGAAATCAACAGTAAATCCATTTATCGCAATCAGATTAAGCAGCGATACATTA GACGCCTAAAGGATGCCCTGATGATAATATACGGAATATCAAAAGTAGATGCTTGCAGTTGTCCG A (SEQ ID NO:64)</p>
<p><i>Campylobacter jejuni</i> rimM</p>
<p>GAGTGAAAAAGATTTTGTTCAGTTGCAAAACTTGGTAAACTGTGGGTCTTAAGGGTTATGTAA AATTGCATAACCTGAGCGACTTTT (SEQ ID NO:65)</p>
<p><i>Campylobacter coli</i> gyrB</p>
<p>AGTGCCTGAACCTCAATTTGAAGGACAAACTAAAGGAAAACCTGGCTCTTCTTATGTGCGTCCTAT AGTTTCAAAAGCAAGTTTTGAATATCTTAGTAAATATTTTGAAGAAAATCCTATCGA (SEQ ID NO:66)</p>

<u><i>Yersinia enterocolitica / pseudotuberculosis</i> virF</u>
GTTTGGTACAGTTTATGGCATTTCACCACGCGCCTGGATAAGCGAGCGACGTATTCTCTATGCTCA CCAATTACTTCTTAATTGTAAGATGAGTATTGTTGATATTGCCATG (SEQ ID NO:67)
<u><i>Yersinia pseudotuberculosis / pestis</i> rumB</u>
CAGGAGCATGAGGTTACAGTATGTGGGATCTGTTCTGTGGTGTGGGCGGCTTTGGTTTACATTG TGCGGGGCCAGAGA (SEQ ID NO:68)
<u><i>Vibrio cholerae</i> ctx</u>
GGGCTACAGAGATAGATATTACAGTAACTTAGATATTGCTCCAGCAGCAGATGGTTATGGATTGG CAGGTTTCCCTCCGGAGCATAGAGCTTGAGGGAAGAGCCGTGG (SEQ ID NO:69)
<u><i>Giardia lamblia</i> gen 18S rRNA</u>
TTCCGGTCGATCCTGCCGAATCCGACGCTCTCCCAAGGACACAAGCCATGCATGCCCGCGCAC CCGGGAGGCGGCGGACGGCTCAGGACAAC (SEQ ID NO:70)
<u><i>Entamoeba histolytica</i> gen 18S rRNA</u>
AGACGATCCAGTTTGTATTAGTACAAAATGGCCAATTTATTTAAATGAATTGAGAAATGACATTCT AAGTGAGTTAGGATGCC (SEQ ID NO:71)
<u><i>Cryptosporidium</i> sp. cowp</u>
TCTGGAAAACAATGTGTTCAATCAGACACAGCTCCTCCTAATCCAGAATGTCCTCCAGGCACTATA CTGGAGAATGGCACATGTAAATTAATCAACAAATTGATACCGTTTGTCTTCTGGTTTTGTTGAA GAAGGAAATAGATGTGTTCAATATCTCCCTGCAATAAAATCTGTCCTCCTGGATTCAATTTGTCA GGACAACAATGTATGGCACCAGAATCAGCTGAATTAGAATCGACATGCC (SEQ ID NO:72)

Tabla 7. Cebadores y una sonda para *Oryza sativa*, control de gen terminal de floración

CTAATCCCAGCAACCCAACC (SEQ ID NO: 73)

CTAATCAATGTGAGACATATGATAGAAATC (SEQ ID NO: 74)

CCTGCACTGGTAAGCTATG (SEQ ID NO: 75)

5 Tabla 8. Distribución de variantes de toxina de ECET en cepas de control y muestras de pacientes. Los resultados muestran que se detectan todas las variantes de ECET con al menos una de las parejas de cebadores presentes.

ST = toxina termostable

LT = toxina termolábil

	Parejas de oligonucleótidos que amplifican la diana (cepa/muestra de paciente)		
	ST variante 1	ST variante 2	Toxina termolábil (LT)

ES 2 716 575 T3

Nombre de la cepa	Origen	est_005 (SEQ ID NOS:13 y 14)	estlab_004 (SEQ ID NOS:15 y 16)	elt_001 (SEQ ID NOS:17 y 18)
JA4	Cepa de referencia THL	-	+	+
JA24	Cepa de referencia THL	-	-	+
JA25	Cepa de referencia THL	-	-	+
JA26	Cepa de referencia THL	-	-	+
JA27	Cepa de referencia THL	-	-	+
JA28	Cepa de referencia THL	-	-	+
JA32	Cepa de referencia THL	-	+	-
JA35	Especie de control, Alemania	+	-	+
JA36	Especie de control, Alemania	+	-	+
JA48	Muestra de paciente	-	+	+
JA50	Muestra de paciente	+	-	-
JA53	Muestra de paciente	-	+	-
JA58	Muestra de paciente	+	-	-
JA61	Muestra de paciente	+	-	-
JA64	Muestra de paciente	-	+	+
JA85	Muestra de paciente	+	-	-
JA88	Muestra de paciente	-	+	-
JA122	Muestra de paciente	+	-	-
JA124	Muestra de paciente	-	+	+
mixB	Mezcla de ADN de control	+	+	+

Referencias

- Allos, B.M. (2001). *Campylobacter jejuni* Infections: update on emerging issues and trends. *Clin. Infect. Dis.* 32, 1201-1206.
- 5 Antikainen, J., Tarkka, E., Haukka, K., Siitonen, A., Vaara, M., and Kirveskari, J. (2009). New 16-plex PCR method for rapid detection of diarrhoeagenic *Escherichia coli* directly from stool samples. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 28, 899-908.
- Aranda, K.R., Fagundes-Neto, U., and Scaletsky, I.C. (2004). Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrhoeagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5849-5853.
- Bottone, E.J. (1999). *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes Infect.* 1, 323-333.
- 10 Brandal, L.T., Lindstedt, B.A., Aas, L., Stavnes, T.L., Lassen, J., and Kapperud, G. (2007). Octaplex PCR and fluorescence-based capillary electrophoresis for identification of human diarrhoeagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *J. Microbiol. Methods* 68, 331-341.
- Chen, H.D., and Frankel, G. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 83-98.
- 15 Coburn, B., Grassl, G.A., and Finlay, B.B. (2007). *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunol. Cell Biol.* 85, 112-118.
- Flores, J., and Okhuysen, P.C. (2009). Enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 25, 8-11.
- El Tahir Y, Skurnik M. (2001) *YadA*, the multifaceted *Yersinia* adhesin. *Int J Med Microbiol.* 291:209-218.
- 20 Guion, C.E., Ochoa, T.J., Walker, C.M., Barletta, F., and Cleary, T.G. (2008). Detection of diarrhoeagenic *Escherichia coli* by use of melting-curve analysis and real-time multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 46, 1752-1757.
- Huang, D.B., Mohamed, J.A., Nataro, J.P., DuPont, H.L., Jiang, Z.D., and Okhuysen, P.C. (2007). Virulence characteristics and the molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from travellers to developing countries. *J. Med. Microbiol.* 56, 1386-1392.
- 25 Karch, H., Tarr, P.I., and Bielaszewska, M. (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int. J. Med. Microbiol.* 295, 405-418.
- Kimata, K., Shima, T., Shimizu, M., Tanaka, D., Isobe, J., Gyobu, Y., Watahiki, M., and Nagai, Y. (2005). Rapid categorization of pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. *Microbiol. Immunol.* 49, 485-492.
- 30 Lan, R., and Reeves, P.R. (2002). *Escherichia coli* in disguise: molecular origins of *Shigella*. *Microbes Infect.* 4, 1125-1132.
- Mohamed, J.A., Huang, D.B., Jiang, Z.D., DuPont, H.L., Nataro, J.P., Belkind-Gerson, J., and Okhuysen, P.C. (2007). Association of putative enteroaggregative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries. *J. Clin. Microbiol.* 45, 121-126.
- 35 Monteiro, B.T., Campos, L.C., Sircili, M.P., Franzolin, M.R., Bevilacqua, L.F., Nataro, J.P., and Elias, W.P. (2009). The dispersin-encoding gene (*aap*) is not restricted to enteroaggregative *Escherichia coli*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 65, 81-84.
- Müller, D., Greune, L., Heusipp, G., Karch, H., Fruth, A., Tschape, H., and Schmidt, M.A. (2007). Identification of unconventional intestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3380-3390.
- 40 Nelson, E.J., Harris, J.B., Morris, J.G., Jr, Calderwood, S.B., and Camilli, A. (2009). Cholera transmission: the host, pathogen and bacteriophage dynamic. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 693-702.
- Parsot, C. (2005). *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. *FEMS Microbiol. Lett.* 252, 11-18.
- Poly, F., and Guerry, P. (2008). Pathogenesis of *Campylobacter*. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 24, 27-31.
- 45 Qadri, F., Svennerholm, A.M., Faruque, A.S., and Sack, R.B. (2005). Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 465-483.
- Vidal, M., Kruger, E., Duran, C., Lagos, R., Levine, M., Prado, V., Toro, C., and Vidal, R. (2005). Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrhoeagenic *Escherichia coli* associated with enteric

infections. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5362-5365.

Vidal, R., Vidal, M., Lagos, R., Levine, M., and Prado, V. (2004). Multiplex PCR for diagnosis of enteric infections associated with diarrhoeagenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1787-1789.

von Graevenitz, A. (2007). The role of *Aeromonas* in diarrhoea: a review. *Infection* 35, 59-64.

Listado de secuencias

- <110> Mobidiag Oy
- 5 <120> Método para determinar la presencia de agentes patógenos que causan diarrea
- <150> FI 20125730
<151> 2012-06-27
- 10 <150> US 61/664,959
<151> 2012-06-27
- <160> 75
- 15 <170> BiSSAP 1.0
- <210> 1
<211> 26
<212> ADN
- 20 <213> Secuencia Artificial
- <220>
<221> fuente
<222> 1..26
- 25 <223> /mol_tipo="ADN"
/nota="Cebador PCR A"
/organismo="Secuencia Artificial"
- <400> 1
- 30 gcgttcttat gtaatgactg ctgaag 26
- <210> 2
<211> 27
<212> ADN
- 35 <213> Secuencia Artificial
- <220>
<221> fuente
<222> 1..27
- 40 <223> /mol_tipo="ADN"
/nota="Cebador PCR A"
/organismo="Secuencia Artificial"
- <400> 2
- 45 agaaattctt cctacacgaa cagagtc 27
- <210> 3
<211> 20
<212> ADN
- 50 <213> Secuencia Artificial
- <220>
<221> fuente
<222> 1..20
- 55 <223> /mol_tipo="ADN"
/nota="Cebador PCR A"
/organismo="Secuencia Artificial"
- <400> 3
- 60 tgcattccaga gcagttctgc 20
- <210> 4
<211> 21
<212> ADN
- 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..21
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 5

 <400> 4
 cggcgtcatc gtatacacag g 21
 10

 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15

 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 20

 <400> 5
 ccaggcttcg tcacagttgc 20
 25

 <210> 6
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30

 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..27
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 35

 <400> 6
 cagtgaacta ccgtcaaagt tattacc 27
 40

 <210> 7
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45

 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..25
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 50

 <400> 7
 gctctcggc acaagtaata tcaac 25
 55

 <210> 8
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60

 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..28
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 65

<400> 8
 tctattftaa attccgtgaa gcaaaaacg 28

5 <210> 9
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..22
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Secuencia Artificial"

15 <400> 9
 tggccatca ggcatcagaa gg 22

20 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Secuencia Artificial"

30 <400> 10
 ggcaagtgcgg aggtcattg 20

35 <210> 11
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..29
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Secuencia Artificial"

45 <400> 11
 tgtctttata ggacatccct gatacttc 29

50 <210> 12
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..28
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Secuencia Artificial"

60 <400> 12
 tatctactct tgatgccaga aaactagc 28

65 <210> 13
 <211> 27

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..27
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Secuencia Artificial"

10
 <400> 13
 aaaattgcaa aatccgtta actaatc 27

15
 <210> 14
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..22
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Secuencia Artificial"

25
 <400> 14
 gactgactaa aagaggggaa ag 22

30
 <210> 15
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..22
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Secuencia Artificial"

40
 <400> 15
 tcctgaaagc atgaatagta gc 22

45
 <210> 16
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..23
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Secuencia Artificial"

55
 <400> 16
 ttattaatag caccggtac aag 23

60
 <210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..20

```

<223> /mol_tipo="ADN"
/nota="Cebador PCR A"
/organismo="Secuencia Artificial"

5   <400> 17
    ccggcagagg atggttacag      20

    <210> 18
    <211> 29
10  <212> ADN
    <213> Secuencia Artificial

    <220>
    <221> fuente
    <222> 1..29
    <223> /mol_tipo="ADN"
    /nota="Cebador PCR A"
    /organismo="Secuencia Artificial"

20  <400> 18
    ttgattgata ttccctgaga tatattgtg      29

    <210> 19
    <211> 30
25  <212> ADN
    <213> Secuencia Artificial

    <220>
    <221> fuente
    <222> 1..30
    <223> /mol_tipo="ADN"
    /nota="Cebador PCR A"
    /organismo="Secuencia Artificial"

35  <400> 19
    ggaagcaata catatcttag aaatgaactc      30

    <210> 20
    <211> 22
40  <212> ADN
    <213> Secuencia Artificial

    <220>
    <221> fuente
    <222> 1..22
    <223> /mol_tipo="ADN"
    /nota="Cebador PCR A"
    /organismo="Secuencia Artificial"

50  <400> 20
    tcggacaact gcaagcatct ac      22

    <210> 21
    <211> 26
55  <212> ADN
    <213> Secuencia Artificial

    <220>
    <221> fuente
    <222> 1..26
    <223> /mol_tipo="ADN"
    /nota="Cebador PCR A"
    /organismo="Secuencia Artificial"

65  <400> 21
    gagtgaaaaa gattttgttc aagttg      26

```

5 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Secuencia Artificial"

15 <400> 22
 aaaagtcgct caggttatgc 20

20 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Secuencia Artificial"

30 <400> 23
 agtgcctgaa cctcaattg 20

35 <210> 24
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..28
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Secuencia Artificial"

45 <400> 24
 tcgataggat tttctcaaa atatttac 28

50 <210> 25
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..26
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Secuencia Artificial"

60 <400> 25
 gtttggata gtttatggca tttcac 26

65 <210> 26
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..29
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 5

<400> 26
 catggcaata tcaacaatac tcatcttac 29
 10

<210> 27
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..24
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 20

<400> 27
 caggagcatg aggttcacag tatg 24
 25

<210> 28
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..19
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 35

<400> 28
 tctctggccc cgcacaatg 19
 40

<210> 29
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..32
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 50

<400> 29
 gggctacaga gatagatatt acagtaact ag 32
 55

<210> 30
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 65

<400> 30
 ccacggctct tccctcaag 20

5 <210> 31
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..17
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 15 /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 31
 ttccggtcga tctgcc 17

20 <210> 32
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..17
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 30 /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 32
 gttgtcctga gccgtcc 17

35 <210> 33
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..21
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 45 /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 33
 agacgatcca gttgtatta g 21

50 <210> 34
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..19
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 60 /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 34
 ggcaccta ctcacttag 19

65 <210> 35
 <211> 19

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..19
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Secuencia Artificial"

10

<400> 35
 tctggaaaac aatgtgtc 19

15

<210> 36
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..19
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Secuencia Artificial"

25

<400> 36
 ggcatgtcga ttctaattc 19

30

<210> 37
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..36
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Secuencia Artificial"

40

<400> 37
 tccatgatar tcaggcagga cactactcaa ccttcc 36

45

<210> 38
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..29
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Secuencia Artificial"

55

<400> 38
 ttgtcactgt cacagcagaa gccttacgc 29

60

<210> 39
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..35

<223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Secuencia Artificial"

5 <400> 39
 agattaacct ctgccgttcc ataatgtgt aacca 35

<210> 40
 <211> 30
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 15 <222> 1..30
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Secuencia Artificial"

20 <400> 40
 ccaaacctaa aaccagtaaa ggcgagcagc 30

<210> 41
 <211> 30
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 30 <222> 1..30
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Secuencia Artificial"

35 <400> 41
 tcactcccga cagccatag aaacgcattt 30

<210> 42
 <211> 33
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 45 <222> 1..33
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Secuencia Artificial"

50 <400> 42
 acaaacagca aaagagcata gcatccgaga act 33

<210> 43
 <211> 24
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 60 <222> 1..24
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Secuencia Artificial"

65 <400> 43
 caaatatccg tgaaacaaca tgac 24

5 <210> 44
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..26
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Secuencia Artificial"

15 <400> 44
 aggattaca cacaattcac agcagt 26

20 <210> 45
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..24
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Secuencia Artificial"

30 <400> 45
 agcaggtttc ccaccggatc acca 24

35 <210> 46
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..34
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Secuencia Artificial"

45 <400> 46
 tccgtatatt atcatcaggg catcctttag gcgt 34

50 <210> 47
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..25
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Secuencia Artificial"

60 <400> 47
 aagaccaca gttttaccaa gtttt 25

65 <210> 48
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

```

<220>
<221> fuente
<222> 1..23
<223> /mol_tipo="ADN"
5 /nota="Cebador PCR A"
/organismo="Secuencia Artificial"

<400> 48
10 aactggctc ttcttatgtg cgt 23

<210> 49
<211> 31
<212> ADN
15 <213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<222> 1..31
20 <223> /mol_tipo="ADN"
/nota="Cebador PCR A"
/organismo="Secuencia Artificial"

<400> 49
25 cctggataag cgagcgacgt attctctatg c 31

<210> 50
<211> 24
<212> ADN
30 <213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<222> 1..24
35 <223> /mol_tipo="ADN"
/nota="Cebador PCR A"
/organismo="Secuencia Artificial"

<400> 50
40 aaaccaaagc cgccacacc acag 24

<210> 51
<211> 30
<212> ADN
45 <213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<222> 1..30
50 <223> /mol_tipo="ADN"
/nota="Cebador PCR A"
/organismo="Secuencia Artificial"

<400> 51
55 aacctgcaa tcataacca tctgtgtg 30

<210> 52
<211> 21
<212> ADN
60 <213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<222> 1..21
65 <223> /mol_tipo="ADN"
/nota="Cebador PCR A"
/organismo="Secuencia Artificial"

```

ES 2 716 575 T3

<400> 52
acgaagccat gcatgcccgc t 21

5 <210> 53
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<221> fuente
<222> 1..26
<223> /mol_tipo="ADN"
/nota="Cebador PCR A"

15 /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 53
acaaaatggc caattcattc aatgaa 26

20 <210> 54
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<221> fuente
<222> 1..25
<223> /mol_tipo="ADN"
/nota="Cebador PCR A"

30 /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 54
cctcctaadc cagaatgtcc tccag 25

35 <210> 55
<211> 115
<212> ADN
<213> Escherichia coli

40 <220>
<221> fuente
<222> 1..115
<223> /mol_tipo="ADN"
/organismo="Escherichia coli"

45 <400> 55
gcggttcttat gtaatgactg ctgaagatgt tgatcttaca ttgaactggg gaaggttgag 60
tagtgtcctg cctgattatc atggacaaga ctctgttcgt gtaggaagaa tttct 115

50 <210> 56
<211> 121
<212> ADN
<213> Escherichia coli

55 <220>
<221> fuente
<222> 1..121
<223> /mol_tipo="ADN"
/organismo="Escherichia coli"

60 <400> 56

ES 2 716 575 T3

tgcattccaga gcagttctgc gttttgtcac tgtcacagca gaagccttac gcttcaggca 60
 gatacagaga gaatttcgtc aggcactgtc tgaactgct cctgtgtata cgatgacgcc 120
 g 121
 <210> 57
 <211> 94
 5 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 <220>
 <221> fuente
 10 <222> 1..94
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Escherichia coli"
 15 <400> 57
 ccaggcttcg tcacagttgc aggcctgggtt acaacattat ggaacggcag aggttaatct 60
 gcagagtggg aataactttg acggtagttc actg 94
 <210> 58
 <211> 170
 20 <212> ADN
 <213> Salmonela
 <220>
 <221> fuente
 25 <222> 1..170
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /organismo="Salmonela"
 <400> 58
 gctcttcggc acaagtaata tcaacggtac agtctctgta gagactttat cgagatcgcc 60
 aatcagtctt aacgacgacc cttctttttc ctcaatactg agcggctgct cgcctttgct 120
 30 ggttttaggt ttggcggcgc tacgttttgc ttcacggaat ttaaaataga 170
 <210> 59
 <211> 257
 35 <212> ADN
 <213> Shigella
 <220>
 <221> fuente
 40 <222> 1..257
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /organismo="Shigella"
 <400> 59
 tgggccatca ggcattcagaa ggccttttcg ataattgatac cggcgctctg ctctccctgg 60
 gcagggaaat gttccgcctc gaaattctgg aggacattgc cggggataaa gtcagaactc 120
 tccattttgt ggatgagata gaagtctacc tggccttcca gacctgctc gcagagaaac 180
 ttcagctctc cactgccgtg aaggaaatgc gtttctatgg cgtgtcggga gtgacagcaa 240
 45 atgacctccg cactgcc 257
 <210> 60
 <211> 120
 <212> ADN
 <213> Shigella

ES 2 716 575 T3

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..120
 5 <223> /mol_tipo="ADN"
 /organismo="Shigella"

 <400> 60
 tgtctttata ggacatccct gatactttca gaaaattaag accaatacca agttctcgga 60

 10 tgctatgctc ttttgctggt tgtatatcgt ttgctagttt tctggcatca agagtagata 120

 <210> 61
 <211> 124
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 15

 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..124
 20 <223> /mol_tipo="ADN"
 /organismo="Escherichia coli"

 <400> 61
 aaaattgcaa aatccgttta actaatctca aatatccgtg aaacaacatg acgggaggta 60

 acatgaaaa gctaattgtg gcaattttta tttctgtatt atctttcccc tcttttagtc 120
 25 **agtc** 124

 <210> 62
 <211> 76
 <212> ADN
 30 <213> Escherichia coli

 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..76
 35 <223> /mol_tipo="ADN"
 /organismo="Escherichia coli"

 <400> 62
 tcctgaaagc atgaatagta gcaattactg ctgtgaattg tgttgtaate ctgcttgtae 60

 40 cgggtgctat taataa 76

 <210> 63
 <211> 181
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 45

 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..181
 50 <223> /mol_tipo="ADN"
 /organismo="Escherichia coli"

 <400> 63
 ccggcagagg atggttacag attagcaggt ttcccaccgg atcaccaagc ttggagagaa 60

 gaaccctgga ttcacatgac accacaaggt tgtggaaatt catcaagaac aattacaggt 120

 gatacttgta atgaggagac ccagaatctg agcacaatat atctcagggg atatcaatca 180

 a 181
 55 <210> 64

ES 2 716 575 T3

<211> 196
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

5 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..196
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /organismo="Escherichia coli"

10 <400> 64
 ggaagcaata catatccttag aatgaactc atatttccttg agagaggaat aaatatatca 60
 gtaagattgc aaaagaagaa atcaacagta aatccattta tgcgaatcag attaagcagc 120
 gatacattaa gacgcctaaa ggatgcctcg atgataatat acggaatatac aaaagtagat 180
 gcttgcagtt gtccga 196

15 <210> 65
 <211> 89
 <212> ADN
 <213> Campylobacter

20 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..89
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /organismo="Campylobacter"

25 <400> 65
 gagtgaaaaa gattttgttc aagttgcaaa acttggtaaa actgtgggtc ttaagggtta 60
 tgtaaaattg cataacctga gcgactttt 89

30 <210> 66
 <211> 123
 <212> ADN
 <213> Campylobacter

35 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..123
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /organismo="Campylobacter"

40 <400> 66
 agtgcctgaa cctcaatttg aaggacaaac taaaggaaaa cttggctctt cttatgtgcg 60
 tcctatagtt tcaaaagcaa gttttgaata tcttagtaaa tattttgaag aaaatcctat 120
 cga 123

45 <210> 67
 <211> 112
 <212> ADN
 <213> Yersinia <bacteria>

50 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..112
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /organismo="Yersinia <bacteria>"

<400> 67

ES 2 716 575 T3

gtttggtaca gtttatggca tttcaccacg cgctggata agcgagcgac gtattctcta 60

tgctcaccaa ttacttctta attgtaagat gagtattggt gatattgcca tg 112

5 <210> 68
<211> 79
<212> ADN
<213> Yersinia <bacteria>

10 <220>
<221> fuente
<222> 1..79
<223> /mol_tipo="ADN"
/organismo="Yersinia <bacteria>"

15 <400> 68
caggagcatg aggttcacag tatgtgggat ctgttctgtg gtgtgggagg ctttggttta 60
cattgtgagg gccagaga 79

20 <210> 69
<211> 109
<212> ADN
<213> Vibrio cholerae

25 <220>
<221> fuente
<222> 1..109
<223> /mol_tipo="ADN"
/organismo="Vibrio cholerae"

30 <400> 69
gggctacaga gatagatatt acagtaactt agatattgct ccagcagcag atggttatgg 60
attggcagggt ttccctccgg agcatagagc ttggagggaa gagccgtgg 109

35 <210> 70
<211> 94
<212> ADN
<213> virus Giardia lamblia

40 <220>
<221> fuente
<222> 1..94
<223> /mol_tipo="ADN"
/organismo=" virus Giardia lamblia "

45 <400> 70
ttccggtcga tcctgcccga atccgacgct ctccccagg acacaagcca tgcatgcccg 60
cgcaccggg aggccggcga cggctcagga caac 94

50 <210> 71
<211> 83
<212> ADN
<213> Entamoeba

55 <220>
<221> fuente
<222> 1..83
<223> /mol_tipo="ADN"
/organismo="Entamoeba"

<400> 71
agacgatcca gtttgattta gtacaaaatg gccaatat ttaaatgaat tgagaaatga 60
cattctaagt gagtaggat gcc 83

ES 2 716 575 T3

<210> 72
 <211> 247
 <212> ADN
 5 <213> Cryptosporidium

 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..247
 10 <223> /mol_tipo="ADN"
 /organismo="Cryptosporidium"

 <400> 72
 tctggaaaac aatgtgttca atcagacaca gctcctccta atccagaatg tcctccaggc 60
 actatactgg agaatggcac atgtaaatta attcaacaaa ttgataccgt ttgtccttct 120
 ggttttgttg aagaaggaaa tagatgtgtt caatatctcc ctgcaaataa aatctgtcct 180
 cctggattca atttgtcagg acaacaatgt atggcaccag aatcagctga attagaatcg 240
 acatgcc 247
 15
 <210> 73
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Oryza sativa

 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 25 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Oryza sativa"

 <400> 73
 30 ctaatcccag caaccaacc 20

 <210> 74
 <211> 30
 <212> ADN
 35 <213> Oryza sativa

 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..30
 40 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Oryza sativa"

 <400> 74
 45 ctaatcaatg tgagacatat gatagaaatc 30

 <210> 75
 <211> 19
 <212> ADN
 50 <213> Oryza sativa

 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..19
 55 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador PCR A"
 /organismo="Oryza sativa"

 <400> 75

cctgcactgg taagctatg

19

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar la presencia de agentes patógenos que causan diarrea en una muestra biológica que comprende las etapas de:

5 i) poner en contacto la muestra o el ácido nucleico aislado a partir de la misma con parejas de cebadores en un ensayo de PCR múltiple que comprende dos o más reacciones PCR distintas, en donde los cebadores de dichas parejas de cebadores amplifican cada uno de los amplicones de ECET tal y como se definen en SEQ ID NOS: 61-63, en donde se amplifica una secuencia de al menos 20 nucleótidos de longitud de cada uno de los amplicones diana;

10 ii) realizar una reacción en cadena de la polimerasa con mezclas de reacción obtenidas a partir de la etapa i) de manera que las secuencias diana de agentes patógenos que causan diarrea se amplifican específicamente si dichas secuencias están presentes en la muestra; y

iii) detectar la presencia de secuencias diana amplificadas en la mezcla de reacción, en donde la presencia de cualquiera de las secuencias diana es indicativa de la presencia de agentes patógenos que causan diarrea en la muestra.

15 2. El método según la reivindicación 1, en el que en la etapa i) los cebadores de dichas parejas de cebadores amplifican adicionalmente cada uno de los amplicones de *Campylobacter* tal y como se definen mediante SEQ ID NOS: 65-66, en donde se amplifica una secuencia de al menos 20 nucleótidos de longitud de cada uno de los amplicones diana.

20 3. El método según la reivindicación 1 o 2, en donde en la etapa i) dichas parejas de cebadores amplifican adicionalmente cada uno de los amplicones de *Yersinia* tal y como se definen en SEQ ID NOS: 67-68, en donde se amplifica una secuencia de al menos 20 nucleótidos de longitud de cada uno de los amplicones diana.

25 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que en la etapa i) la muestra o el ácido nucleico aislado a partir de la misma se pone en contacto con parejas de cebadores que comprenden al menos una de las siguientes parejas de secuencias o cebadores en donde cada una consiste en al menos 10 nucleótidos contiguos presentes en al menos una de las siguientes parejas de secuencias:

G) cebador directo: 5'-AAAATTGCAAATCCGTTTAACTAATC-3' (SEQ ID NO: 13),

cebador inverso: 5'-GACTGACTAAAAGAGGGGAAAG-3' (SEQ ID NO: 14);

H) cebador directo: 5'-TCCTGAAAGCATGAATAGTAGC-3' (SEQ ID NO: 15),

cebador inverso: 5'-TTATTAATAGCACCCGGTACAAG-3' (SEQ ID NO: 16);

30 I) cebador directo: 5'-CCGGCAGAGGATGGTTACAG-3' (SEQ ID NO: 17),

cebador inverso: 5'-TTGATTGATATCCCTGAGATATATTGTG-3' (SEQ ID NO: 18).

5. El método según la reivindicación 4, en el que la muestra o el ácido nucleico aislado a partir de la misma se pone en contacto con un conjunto de cebadores en donde cada uno consiste en al menos 10 nucleótidos contiguos presentes en las secuencias de nucleótidos tal y como se indican en SEQ ID NOS: 13-18.

35 6. El método según la reivindicación 4, en el que dichas parejas de cebadores comprenden o consisten adicionalmente en las siguientes secuencias

K) cebador directo: 5'-GAGTGAAAAAGATTTTGTTCAGTTG-3' (SEQ ID NO: 21),

cebador inverso: 5'-AAAAGTCGCTCAGGTTATGC-3' (SEQ ID NO: 22); y

L) cebador directo: 5'-AGTGCCTGAACCTCAATTTG-3' (SEQ ID NO: 23),

40 cebador inverso: 5'-TCGATAGGATTTTCTTCAAATATTTAC-3' (SEQ ID NO: 24).

7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en el que en la etapa i) la muestra o el ácido nucleico aislado a partir de la misma se pone en contacto con parejas de cebadores adicionales que comprenden al menos una de las siguientes secuencias o cebadores que consisten en al menos 10 nucleótidos contiguos presentes en las secuencias de nucleótidos que se indican en SEQ ID NOS: 1-36:

45 A) cebador directo: 5'-GCGTTCCTTATGTAATGACTGCTGAAG-3' (SEQ ID NO: 1),

cebador inverso: 5'-AGAAATTCCTACACGAACAGAGTC-3' (SEQ ID NO: 2);

B) cebador directo: 5'-TGCATCCAGAGCAGTTCTGC-3' (SEQ ID NO: 3),

ES 2 716 575 T3

- cebador inverso: 5'-CGGCGTCATCGTATACACAGG-3' (SEQ ID NO: 4);
C) cebador directo: 5'-CCAGGCTTCGTACAGTTGC-3' (SEQ ID NO: 5),
cebador inverso: 5'-CAGTGAAC TACCGTCAAAGTTATTACC-3' (SEQ ID NO: 6);
D) cebador directo: 5'-GCTCTTCGGCACAAGTAATATCAAC-3' (SEQ ID NO: 7),
5 cebador inverso: 5'-TCTATTTTAAATTC CGTGAAGCAAACG-3' (SEQ ID NO: 8);
E) cebador directo: 5'-TGGTCCATCAGGCATCAGAAGG-3' (SEQ ID NO: 9),
cebador inverso: 5'-GGCAGTGCGGAGGTCATTTG-3' (SEQ ID NO: 10);
F) cebador directo: 5'-TGCTTTATAGGACATCCCTGATACTTTC-3' (SEQ ID NO: 11),
cebador inverso: 5'-TATCTACTCTTGATGCCAGAAAAGTAGC-3' (SEQ ID NO: 12);
10 J) cebador directo: 5'-GGAAGCAATACATATCTTAGAAATGAACTC-3' (SEQ ID NO: 19),
cebador inverso: 5'-TCGGACAAC TGAAGCATCTAC-3' (SEQ ID NO: 20);
M) cebador directo: 5'-GTTTGGTACAGTTTATGGCATTTCAC-3' (SEQ ID NO: 25),
cebador inverso: 5'-CATGGCAATATCAACAATACTCATCTTAC-3' (SEQ ID NO: 26);
N) cebador directo: 5'-CAGGAGCATGAGGTTACAGTATG-3' (SEQ ID NO: 27),
15 cebador inverso: 5'-TCTCTGGCCCCGCACAATG-3' (SEQ ID NO: 28);
O) cebador directo: 5'-GGGCTACAGAGATAGATATTACAGTAACTTAG-3' (SEQ ID NO: 29),
cebador inverso: 5'-CCACGGCTCTTCCCTCCAAG-3' (SEQ ID NO: 30);
P) cebador directo: 5'-TTCCGGTCGATCCTGCC-3' (SEQ ID NO: 31),
cebador inverso: 5'-GTTGTCTGAGCCGTCC-3' (SEQ ID NO: 32);
20 Q) cebador directo: 5'-AGACGATCCAGTTTGTATTAG-3' (SEQ ID NO: 33),
cebador inverso: 5'-GGCATCCTAACTCACTTAG-3' (SEQ ID NO: 34); y
R) cebador directo: 5'-TCTGAAAACAATGTGTTC-3' (SEQ ID NO: 35),
cebador inverso: 5'-GGCATGTCGATTCTAATTC-3' (SEQ ID NO: 36).

8. El método según la reivindicación 7, en el que la presencia de la secuencia diana amplificada, es decir, el
25 producto, de cada una de las parejas de cebadores en la reacción PCR, indica la presencia de agentes patógenos que causan diarrea en la muestra del modo siguiente:

- el producto de la pareja de cebadores A) o B) indica la presencia de ECEH;
- el producto de la pareja de cebadores C) indica la presencia de ECEH/ECEP;
- el producto de la pareja de cebadores D) indica la presencia de *Salmonella*;
- 30 - el producto de la pareja de cebadores E) o F) indica la presencia de *Shigella*/ECEI;
- el producto de la pareja de cebadores G), H) o I) indica la presencia de ECET;
- el producto de la pareja de cebadores J) indica la presencia de ECEA;
- el producto de la pareja de cebadores K) indica la presencia de *Campylobacter jejuni*;
- el producto de la pareja de cebadores L) indica la presencia de *Campylobacter coli*;
- 35 - el producto de la pareja de cebadores M) indica la presencia de *Yersinia enterocolitica/pseudotuberculosis*;
- el producto de la pareja de cebadores N) indica la presencia de *Yersinia pseudotuberculosis/pestis*;
- el producto de la pareja de cebadores O) indica la presencia de *Vibrio cholerae*;

- el producto de la pareja de cebadores P) indica la presencia de *Giardia lamblia*;
- el producto de la pareja de cebadores Q) indica la presencia de *Entamoeba histolytica*; y
- el producto de la pareja de cebadores R) indica la presencia de *Cryptosporidium* sp.

5 9. El método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra biológica es una muestra de heces o una muestra de alimentos.

10 10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde dicho ensayo de PCR múltiple se realiza como una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real y las sondas de ácido nucleico que comprenden las siguientes secuencias o sondas que consisten en al menos 10 nucleótidos contiguos presentes en secuencias de nucleótidos tales como las que se indican en SEQ ID NOS: 37-54, se utilizan específicamente con cada una de las parejas de cebadores:

- la sonda para la pareja de cebadores A):
5'-TCCATGATARTCAGGCAGGACACTACTCAACCTTCC-3' (SEQ ID NO: 37)
- la sonda para la pareja de cebadores B):
5'-TTGTCACTGTACAGCAGAAGCCTTACGC-3' (SEQ ID NO: 38)
- 15 - la sonda para la pareja de cebadores C):
5'-AGATTAACCTCTGCCGTTCCATAATGTTGTAACCA-3' (SEQ ID NO: 39)
- la sonda para la pareja de cebadores D):
5'-CCAAACCTAAAACCAGTAAAGGCGAGCAGC-3' (SEQ ID NO: 40)
- la sonda para la pareja de cebadores E):
20 5'-TCACTCCCACACGCCATAGAAACGCATTT-3' (SEQ ID NO: 41)
- la sonda para la pareja de cebadores F):
5'-ACAAACAGCAAAGAGCATAGCATCCGAGAACT-3' (SEQ ID NO: 42)
- la sonda para la pareja de cebadores G):
5'-CAAATAICCGTGAACAACATGAC-3' (SEQ ID NO: 43)
- 25 - la sonda para la pareja de cebadores H):
5'-AGGATACAACAAATTACAGCAGT-3' (SEQ ID NO: 44)
- la sonda para la pareja de cebadores I):
5'-AGCAGGTTTCCCACCGGATCACCA-3' (SEQ ID NO: 45)
- la sonda para la pareja de cebadores J):
30 5'-TCCGTATATTATCATCAGGGCATCCTTTAGGCGT-3' (SEQ ID NO: 46)
- la sonda para la pareja de cebadores K):
5'-AAGACCCACAGTTTACCAAGTTTT-3' (SEQ ID NO: 47)
- la sonda para la pareja de cebadores L):
5'-AACITGGCTTTATGTGCGT-3' (SEQ ID NO: 48)
- 35 - la sonda para la pareja de cebadores M):
5'-CCTGGATAAGCGAGCGACGTATTCTCTATGC-3' (SEQ ID NO: 49)
- la sonda para la pareja de cebadores N):
5'-AAACCAAAGCCGCCACACCACAG-3' (SEQ ID NO: 50)

- la sonda para la pareja de cebadores O):
5'-AACCTGCCAATCCATAACCATCTGCTGCTG-3' (SEQ ID NO: 51)
- la sonda para la pareja de cebadores P):
5'-ACGAAGCCATGCATGCCCGCT-3' (SEQ ID NO: 52)
- 5 - la sonda para la pareja de cebadores Q):
5'-ACAAAATGGCCAATTCATTCAATGAA-3' (SEQ ID NO: 53)
- la sonda para la pareja de cebadores R):
5'-CCTCCTAATCCAGAATGTCTCCAG-3' (SEQ ID NO: 54)

10 en donde los nucleótidos subrayados son preferiblemente nucleótidos modificados que aumentan la temperatura de fusión, T_m, de las sondas.

11. El uso de las parejas de cebadores para la detección de agentes patógenos que causan diarrea en una muestra, en donde los cebadores de dichas parejas de cebadores comprenden o consisten en las siguientes secuencias:

- G) cebador directo: 5'-AAAATTGCAAATCCGTTTAACTAATC-3' (SEQ ID NO: 13),
cebador inverso: 5'-GACTGACTAAAAGAGGGGAAAG-3' (SEQ ID NO: 14);
- 15 H) cebador directo: 5'-TCCTGAAAGCATGAATAGTAGC-3' (SEQ ID NO: 15),
cebador inverso: 5'-TTATTAATAGCACCCGGTACAAG-3' (SEQ ID NO: 16);
- I) cebador directo: 5'-CCGGCAGAGGATGGTTACAG-3' (SEQ ID NO: 17),
cebador inverso: 5'-TTGATTGATATCCCTGAGATATATTGTG-3' (SEQ ID NO: 18);

en donde dicha detección es un ensayo de PCR múltiple que comprende dos o más reacciones PCR distintas.

20 12. Un conjunto de cebadores de nucleótidos que consiste en las secuencias de cebadores tal y como se indican en SEQ ID NOS: 13-18.

13. Un conjunto de parejas de cebadores de nucleótidos que consiste en las parejas de cebadores G), H) e I) según se definen en la reivindicación 4 y que tienen las secuencias de SEQ ID NOS: 13-18.

25 14. Un conjunto de sondas de nucleótidos que consiste en las secuencias de sondas tal y como se indican en SEQ ID NOS: 43-45.

15. Un kit para determinar la presencia de agentes patógenos que causan diarrea en una muestra, en donde dicho kit comprende un conjunto de cebadores de nucleótidos según la reivindicación 12, un conjunto de parejas de cebadores de nucleótidos según la reivindicación 13 o un conjunto de sondas de nucleótidos según la reivindicación 14.