



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 323 911**

② Número de solicitud: 200503220

⑤ Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **28.12.2005**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **27.07.2009**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
27.07.2009

⑦ Solicitante/s: **Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial "Esteban Terradas"**
Crta. Ajalvir, Km. 4
28850 Torrejón de Ardoz, Madrid, ES
Universidade de Santiago de Compostela

⑦ Inventor/es: **Parro García, Víctor;**
Garrido García, Patricia;
Moreno Paz, Mercedes;
Briones Llorente, Carlos;
Blanco Álvarez, Jorge;
Blanco Álvarez, Miguel y
Blanco Álvarez, Jesús Eulogio

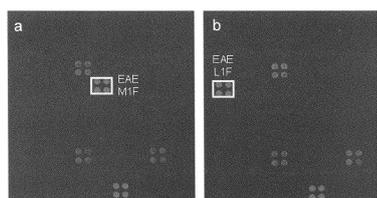
⑦ Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

⑤ Título: **Método y kit para la detección e identificación de estirpes de *Escherichia coli* diarreagénicos.**

⑦ Resumen:

Método y kit para la detección e identificación de estirpes de *Escherichia coli* diarreagénicos.

La presente invención consiste en un método y un kit para la detección e identificación y genotipado de estirpes patógenas de *Escherichia coli* causantes de diarrea (*E. coli* diarreagénicos), y en particular *E. coli* productores de verotoxinas (*E. coli* verotoxigénicos). El cuerpo de la invención consta de un grupo de sondas moleculares para la identificación de estirpes de *E. coli* verotoxigénicas y otras estirpes de *E. coli* diarreagénicas. Dichas sondas corresponden a secuencias específicas de variantes genéticas de uno o más genes de la isla de patogenicidad LEE. La invención aporta sondas específicas para al menos 25 variantes del gen de intiminas (*eae*), 4 del gen *tir*, 4 del gen *espA*, 3 de *espB* y 3 de *espD*. Dichas sondas van situadas en forma de matriz ordenada (microarray) sobre superficies sólidas (biochip), o bien son suministradas para realizar amplificaciones específicas por PCR. La invención aporta ADN control para cada una de las estirpes.



ESPB III 1R	ESPD F	ESPD 4F	ESPD I 1R	ESPD II 1R	ESPD III 1R			
TIRIV 1R	ESPA 1	ESPA I 1R	ESPA II 1R	ESPA III 1R	ESPA IV 1R	ESPB F	ESPB I 1R	ESPB II 1R
TIR A	TIR B	TIR I1F	TIR I1R	TIR II1F	TIR II1R	TIR III2F	TIR III1R	TIR IV1F
EAE N2R	B49a		EAE F	B49R	VTO 50		EAE Z1F	EAE Z2R
EAE L1F	EAE L2R	FV 380		EAE M1F	FV373 R	IH 1229a		EAE N1F
	EAE G2F	EAE C2	FV 367b		EAE I1F	LP7	68-4	
FV 3671		EAE et1F	EAE et2R	O157-156		EAE G1F	EAE C1	VTB 351
EAE B5R	EPEC 9		EAE D2F	EAE D3R	VTB 296		EAE ep1F	EAE ep2R
EAE B6R	EPEC 4		EAE F	EAE B6R	FV359		EAE F	EAE B4E
EAE A	IH 2498a		IH2498 eF	EAE A2R	EAE A2R2	EPEC 4		EAE B3F
MG 1655	16s	EPEC 8	epUtrv	EAE1	EAE2	EPEC 8		EAE A1F

FIG. 1

ES 2 323 911 A1

DESCRIPCIÓN

Método y kit para la detección e identificación de estirpes de *Escherichia coli* diarreagénicos.

5 La invención pertenece al campo de los biosensores de microorganismos basados en el reconocimiento molecular específico entre ácidos nucleicos, y concretamente en el campo de los microarrays o biochips de ADN.

Estado de la técnica

10 *Escherichia coli* Diarreagénicos (ECDI)

15 *E. coli* es la especie predominante de la flora normal aerobia y anaerobia facultativa del tubo digestivo en la mayor parte de los mamíferos, y se elimina por las heces al exterior. Se puede encontrar en el medio ambiente ya que es capaz de sobrevivir durante cierto tiempo en el agua y los alimentos, de manera que su aislamiento es un indicador de contaminación fecal reciente.

20 Algunas cepas de *E. coli* son patógenas y pueden producir infecciones entéricas (diarrea, disentería, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y enfermedad de los edemas) o extraintestinales (infecciones del tracto urinario, bacteriemias o septicemias, meningitis, peritonitis, mastitis, e infecciones pulmonares y de heridas). *E. coli* provoca en seres humanos del orden de 630 millones de casos de diarrea en el mundo y aproximadamente 775.000 muertes al año, afectando fundamentalmente a la población infantil del tercer mundo. Además, es el patógeno oportunista más frecuentemente asociado con infecciones urinarias y septicemias en seres humanos. En animales domésticos las colibacilosis son muy frecuentes, incidiendo esencialmente en animales de pocos días de edad y en recién destetados, y ocasionan importantes pérdidas económicas en las explotaciones de ganado bovino, porcino y ovino, así como en la cría intensiva de aves y conejos. Mientras que en terneros, lechones, corderos y gazapos *E. coli* suele producir diarrea, en aves provoca fundamentalmente infecciones respiratorias (aerosaculitis) y septicemias. Además *E. coli* puede causar en rumiantes, ganado porcino, perros y gatos colisepticemias en neonatos hipogamaglobulinémicos, infecciones urinarias y mamiitis.

30 Aunque las cepas de *E. coli* que causan infecciones en seres humanos y animales pueden compartir determinados factores de virulencia, en general presentan diferentes serotipos y poseen adhesinas específicas que son responsables de su especificidad de huésped. Por lo tanto, las cepas de *E. coli* patógenas para seres humanos no suelen producir infecciones en animales y viceversa. No obstante, se ha comprobado que los animales pueden ser un reservorio de *E. coli* enteropatógenos para las personas. Así, los *E. coli* verotoxigénicos (ECVT) que causan colitis hemorrágica y el síndrome urémico hemolítico en humanos, forman parte de la flora normal intestinal del ganado bovino y ovino donde se comportan, en la mayor parte de los casos, como comensales. La ingestión de hamburguesas o de leche contaminada ha provocado en los últimos años numerosos brotes epidémicos en países desarrollados. También se han detectado *E. coli* uropatógenos que pueden causar infección cruzada en seres humanos, perros y gatos.

40 Los *E. coli* patógenos se han englobado en diferentes grupos o categorías: *E. coli* enteropatógenos (ECEP), *E. coli* enterotoxigénicos (ECET), *E. coli* enteroinvasivos (ECEI), *E. coli* verotoxigénicos (ECVT) o enterohemorrágicos (ECEH), *E. coli* enteroagregativos (ECEA), *E. coli* con adherencia difusa (ECAD), *E. coli* uropatógenos y *E. coli* bacteriémicos o septicémicos. Las cepas de estos grupos presentan mecanismos de patogénesis específicos, serotipos distintos y producen infecciones y síndromes diferentes (3, 4, 5).

45 Factores de virulencia de *E. coli* diarreagénicos humanos

E. coli enteropatógenos (ECEP)

- Adhesina BFP codificada en el plásmido EAF responsable de la adhesión a distancia de la bacteria al enterocito y de la adhesión localizada a células HEp-2.
- Locus cromosómico LEE con los genes: *eae*, *tir*, *esp* y *sep*. Responsable de la adhesión íntima de la bacteria y de la lesión de adhesión y borrado del *microvilli* intestinal.

<p><i>E. coli</i> enterotoxigénicos (ECET)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Factores antigénicos de colonización (CFA/I, II, III y IV). • Enterotoxinas: termolábil LT y termoestable STa. • Tanto los CFAs como las enterotoxinas se encuentran codificadas en plásmidos.
<p><i>E. coli</i> enteroinvasivos (ECEI)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Plásmido de elevado peso molecular (140 MDa) que lleva genes implicados en la invasividad.
<p><i>E. coli</i> verotoxigénicos (ECVT) ó enterohemorrágicos (ECEH)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Verotoxinas (VT1 y VT2) ó shiga-like toxins (Stx1 y Stx2) codificadas en profagos. • Locus cromosómico LEE con genes: <i>eae</i>, <i>tir</i>, <i>esp</i> y <i>sep</i>. • Plásmido de 60 Mda que codifica para una enterohemolisina (EntHly) y una adhesina fimbrial que puede estar implicada en la colonización intestinal.
<p><i>E. coli</i> enteroagregativos (ECEA ó ECEAgg)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Adhesión agregativa a células HEp-2 mediada por las fimbrias plasmídicas AAF/I y AAF/II .Enterotoxina termoestable EAST1 (plasmídica). • Citotoxina de 108 KDa que provoca lesiones destructivas a nivel intestinal.
<p><i>E. coli</i> con adherencia difusa (ECAD)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Adhesión difusa a células HEp-2 mediada por la fimbria F1845 • Proteína de la membrana externa de 100 Kda denominada AIDA-I.

E. coli Verotoxigénicos (ECVT)

Los ECVT, y muy especialmente los enterohemorrágicos altamente virulentos del serotipo O157:H7, son importantes patógenos emergentes que causan patologías muy severas en seres humanos: colitis hemorrágica (CH) y el síndrome urémico/hemolítico (SUH) (1, 8, 6, 9). Los ruminantes constituyen el principal reservorio de este tipo de microorganismos, siendo la carne picada, las hamburguesas y los productos lácteos sin pasteurizar los principales vehículos de transmisión (2, 14). El ECVT del serotipo O157:H7 ha provocado en los últimos años un gran número de brotes de CH, la mayoría de los cuales han tenido lugar en los países anglosajones (Reino Unido, EE.UU. y Canadá) y en Japón. En España los ECVT del serotipo O157:H7 han provocado siete brotes. El brote que afectó a un mayor número de individuos tuvo lugar en el año 2000 en cinco centros escolares situados en la provincia de Barcelona. La toxiinfección alimentaria afectó a 158 personas (la mayoría niños menores de cinco años), de las cuales seis desarrollaron el SUH (15).

Las verotoxinas (*Shiga toxins*) son potentes citotoxinas que destruyen las células Vero y están relacionadas estructural e inmunológicamente con la toxina Shiga producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1. Existen dos tipos de verotoxinas, VT1 (Stx1) y VT2 (Stx2), y diversas variantes de ambas toxinas (VT1, VT1c, VT1d, VT2, VT2c, VT2d, VT2e, VT2f, VT2g) (16, 17, 19). Establecer las variedades de VT resulta importante, ya que determinadas variedades se ha relacionado con una mayor virulencia para humanos, y otras variedades se han detectado exclusivamente en cepas de origen animal. Todas las verotoxinas se encuentran codificadas en el genoma de profagos integrados en el cromosoma bacteriano (20). Los ECVT, además de producir verotoxinas, presentan factores de virulencia adicionales que incrementan su poder patógeno. Así, los ECVT se unen al epitelio del intestino grueso a través de unas fimbrias

ES 2 323 911 A1

codificadas en el plásmido pO157 (60 MDa) y posteriormente barren el microvilli intestinal por la acción de unas proteínas presentes en su membrana externa que están controladas por el gen cromosómico *eae* y reciben el nombre de intiminas (5).

5 *E. coli* Enteropatógenicos (ECEP) típicos y atípicos

En los países en vías de desarrollo los ECEP son considerados como una de las principales causas de diarrea infantil, predominado especialmente los serotipos O111:H2 y O119:H6. Los ECEP provocan una diarrea acuosa con dolores abdominales y fiebre moderada (5, 7).

10

Actualmente se conocen bastante bien los mecanismos de patogénesis de los ECEP típicos. Poseen una adhesina BFP (bundle-forming pilus) codificada en el plásmido EAF (EPEC adherence factor). Dicha adhesina es responsable de la adhesión a distancia de la bacteria al enterocito y de la adhesión localizada a células HEp-2. Presentan también la isla de patogenicidad LEE (locus of enterocyte effacement) con los genes: *eae*, *tir*, *esp* y *sep*. El gen *eae* codifica una proteína de la membrana externa denominada intimina que es responsable de la adhesión íntima de la bacteria al enterocito. El gen *tir* (translocated intimin receptor) codifica el receptor celular al que se une la intimina. La bacteria, después de unirse a distancia al enterocito mediante las fimbria BFP, excreta el receptor *Tir* que se fija al enterocito y a continuación la bacteria se une íntimamente al enterocito al fijarse la intimina al receptor *Tir*. Los genes *esp* (*E. coli* secreted proteins) codifican proteínas necesarias para la producción de la lesión de adhesión y borrado (attaching and effacing) del microvilli intestinal y la condensación de la actina del citoesqueleto celular, que provoca la aparición de un pedestal en forma de copa sobre el que descansa la bacteria. Los genes *sep* (secretion of *E. coli* proteins) codifican las proteínas que constituyen un sistema de secreción de proteínas tipo III (5). Los ECEP típicos generalmente presentan las intiminas alfa 1, beta 2, delta/kappa y my. Los ECEP atípicos, al igual que los ECEP típicos presentan el gen *eae*, pero carecen del gen *bfp* presente en el plásmido EAF de los ECEP típicos.

25

E. coli Enterotoxigénicos (ECET)

Los ECET son considerados en la actualidad, junto con los *E. coli* enteropatógenicos (ECEP) y los rotavirus, los patógenos que con mayor frecuencia causan gastroenteritis infantil, diarrea colérica y diarrea del viajero en países con condiciones higiénico/sanitarias deficientes. El agua y los alimentos contaminados han sido implicados como vehículos en la mayoría de los brotes. Los ECET sintetizan las enterotoxinas LT y/ó STa y poseen los factores de colonización intestinal CFA/I, CFA/II, CFA/III ó CFA/IV (3). En España predomina las cepas de los serotipos O25:H-(STa CFA/III), O153:H45 (STa CFA/I), O169:H41 ó H-(STa CFA/IV) (21, 22).

35

E. coli Enteroinvasivos (ECEI)

Los ECEI son muy parecidos a los microorganismos del género *Shigella* ya que generalmente son incapaces de fermentar la lactosa, no son móviles, son lisina descarboxilasa negativos y además poseen antígenos O que presentan reacción cruzada con los de *Shigella*. Los genes necesarios para la invasividad son llevados por un plásmido (pInv) de 120 MDa en *Shigella sonnei* y por un plásmido de 140 MDa en las otras especies de *Shigella* y en *E. coli*. Además, también están implicados genes cromosómicos que regulan la transcripción de algunos de los genes plasmídicos. Los ECEI producen una enterotoxina de 63 kDa (ShET2) que se encuentra codificada en el gen plasmídico *sen*. Los ECEI pertenecen a un número reducido de serotipos. El serotipo más frecuente es el O124:H- (5, 3).

45

E. coli Enteroagregativos (ECEA)

Los ECEA (o ECEAgg) se han asociado con la diarrea infantil en países en vías de desarrollo, y están particularmente asociados con la diarrea persistente de más de 14 días de duración. La bacteria produce una enterotoxina termoestable (EAST1, enteroaggregative ST1) de 4.100 Da y una citotoxina de 108 KDa que pueden ser responsables de la diarrea y de las lesiones histopatológicas (acortamiento de el villi). La enterotoxina EAST1 y los factores de colonización AAF/I y II se encuentran codificados en plásmidos.

50

E. coli con adherencia difusa (ECAD)

Aunque su papel enteropatógenico no está claramente demostrado, se piensa que pueden causar diarrea en niños mayores de un año de edad y en adultos. Se han descrito dos tipos de adhesinas: la fimbria F1845 y una proteína de la membrana externa conocida como AIDA-I (adhesin involved in diffuse adherence). La detección de los ECAD se realiza fenotípicamente determinando si la cepa aislada presenta el patrón de adherencia difusa en células Hep-2 o genéticamente detectando las secuencias que codifican la fimbria F1845 (3, 5).

60

Métodos de diagnóstico rápido

Las muestras a procesar deben ser representativas del tipo de infección y pueden ser de heces (coprocultivo), orina (urocultivo), sangre (hemocultivo), exudado ó pus de una herida, una muestra de un líquido orgánico (ascítico, pleural, líquido cefalorraquídeo), bilis ó leche maternal. Los medios más frecuentemente utilizados para el aislamiento de *E. coli* son el agar MacConkey con lactosa y el medio eosina azul de metileno (EMB ó LEVINE). Se trata de medios selectivos que diferencian las colonias en lactosa positivas y negativas. Aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* son lactosa positivas, no se deben descartar el estudio de las colonias lactosa negativas, ya que entre el 5% de los *E. coli*

65

ES 2 323 911 A1

que no son fermentadores de la lactosa se pueden encontrar cepas patógenas. Así, la mayor parte de los ECEI son lactosa negativos. En los urocultivos y hemocultivos también se emplea una placa de un medio no selectivo como el agar sangre. Recuentos superiores a 10^5 unidades formadoras de colonias por ml de orina son indicativos de una ITU (bacteriuria). En muestras procedentes de lugares ó líquidos (sangre, líquido cefalorraquídeo, etc...) habitualmente estériles cualquier crecimiento es indicativo de infección. El biotipado se puede realizar con una serie corta de pruebas bioquímicas: indol (+), rojo metilo (+), VP (-), citrato (-), SH_2 (-) y ureasa (-). No obstante, hay que tener en cuenta que hay cepas atípicas: indol (-), citrato (+), SH_2 (+) ó ureasa (+).

La muestra clínica más difícil de valorar para el microbiólogo clínico es la procedente de personas ó animales con diarrea, ya que al sembrar las heces en el agar MacConkey lactosa nos va a crecer casi siempre un abundante número de colonias de *E. coli*. Entonces, el problema consiste en diferenciar entre las cepas diarreagénicas de las no patógenas que forman parte de la microbiota normal del intestino grueso. Actualmente, la técnica más frecuentemente empleada para detectar los *E. coli* diarreagénicos es hacer una PCR múltiple capaz de detectar los genes de virulencia más representativos de los ECEP, ECET, ECEI, ECVT, ECEA y ECAD. Conviene probar una mezcla de al menos 10 colonias antes de descartar que el coprocultivo es negativo. Recordar que si se quiere recuperar el ECVT del serotipo O157:H7 se debe emplear una placa de MACSTC. A efectos epidemiológicos es muy importante determinar el serotipo O:H de la cepa aislada. En el caso de aislar un ECVT O157:H7 convendría determinar su fagotipo y patrón de electroforesis en campos pulsantes (PFGE). Solamente en determinados laboratorios de investigación de referencia se realiza el serotipado completo, el fagotipado y la técnica de PFGE.

Los métodos genéticos (PCR convencional, PCR en tiempo real y microarrays de ADN) para el diagnóstico rápido de ECDI se basan en el estudio de los genes de virulencia e islas de patogenicidad.

La PCR clásica (revelada por electroforesis) es un método rápido, sensible, específico y económico que puede ponerse a punto en la mayoría de los laboratorios debido a que no requiere una infraestructura en aparatos muy costosa. No obstante, la PCR clásica presenta algunas limitaciones, como son:

- La aparición de bandas inespecíficas que pueden ocasionar falsos positivos.
- El número máximo de genes que detectables en una PCR múltiple suele ser de 4 ó 5.
- Se puede detectar el microorganismo problema pero no se puede cuantificar.
- El tiempo requerido oscila entre 3 y 4 horas.

La PCR cuantitativa en tiempo real tiene dos importantes ventajas con respecto a la clásica:

- Acorta el tiempo del ensayo a tan solo 45 minutos, lo que permite procesar un mayor número de muestras por jornada de trabajo y obtener los resultados mucho antes.
- También permite cuantificar, lo cual es especialmente importante en la microbiología de los alimentos para saber si la concentración de microorganismos presente en el alimento alcanza la dosis mínima infectiva.

Los microarrays de ácidos nucleicos con respecto a las dos versiones de PCR presentan ventajas adicionales muy importantes:

- La posibilidad de detectar conjuntamente los cientos de genes de virulencia encontrados en los diferentes tipos de *E. coli* causantes de infecciones intestinales y extraintestinales en seres humanos y animales en una sola prueba.
- Permiten el análisis comparativo a nivel genómico entre estirpes, de manera que comparaciones entre estirpes patógenas y no patógenas pueden dar como resultado la identificación de nuevos genes de virulencia.
- Además, se pueden emplear en experimentos de expresión génica y averiguar si se están expresando los genes de virulencia, por hibridación del ARNm específico.

En cualquier caso, casi siempre es necesaria una etapa de amplificación y enriquecimiento mediante cultivos partir de las muestras originales. A veces es necesario aplicar técnicas de concentración inmunomagnética, según la cual anticuerpos contra diferentes serotipos son inmovilizados en soportes sólidos (como esferas magnéticas o de agarosa) y separados de la mezcla por atracción magnética. Los métodos inmunológicos son específicos y sensibles pero a menudo se basan en la detección de un único epítipo, haciendo difícil la discriminación de diferencias sutiles específicas de estirpe. Puesto que la tecnología de microarrays de ADN permite la inmovilización de miles de sondas específicas en pocos centímetros cuadrados (1-4), presenta un potencial enorme para proporcionar la detección e identificación de patógenos de una manera relativamente económica, flexible y específica. Existen varios trabajos ya publicados

que emplean la tecnología de microarrays de ADN para la discriminación entre estirpes de *E. coli* patógenas y no patógenas. Así, la patente US2003119014 está relacionada con un biochip de oligonucleótidos para la detección de *Escherichia coli* K12.2.1. Por otra parte, la solicitud W09116446 trata sobre un método de amplificación de ADN con la enzima ADN polimerasa del bacteriófago Phi 29.

5 En el trabajo de Wu *et al.* (12) se construyó un microarray de ADN con fragmentos amplificados por PCR de genes específicos de *E. coli* patógenos O157:117, genes no patógenos de *E. coli* K12, genes comunes, y controles negativos. Tras el marcaje fluorescente de ADN bacteriano de diferentes muestras se distinguieron estirpes patógenas de no patógenas gracias al patrón de puntos fluorescentes del array. Así mismo se demostró la utilidad de esta metodología para detectar marcadores presentes en bacterias modificadas genéticamente. En Chizhikov y col. (10) se construyó un microarray de oligonucleótidos para la detección de factores de virulencia en *E. coli*. Concretamente se evaluó la presencia de seis genes (*egea*, *sltI*, *sltII*, *cltC*, *rfbE*, e *ipaH*) que codifican determinantes antigénicos y factores de virulencia en 15 estirpes de *E. coli*, Salmonella, y Shigella. El ensayo se hizo mediante amplificación por multiplex PCR, y amplificación y marcaje fluorescente y posterior incubación con el microarray para comparar ambas metodologías. El análisis electroforético de los amplificados por PCR resultó ambiguo al aparecer bandas inesperadas, mientras que el resultado de la hibridación con el array fue mucho más específico. Otros trabajos en la misma línea describen la detección rápida con microarrays de estirpes patogénicas de *E. coli* a través de los genes de virulencia mediante el marcaje fluorescente de ADN total bacteriano y su posterior hibridación con un microarray (13). En este trabajo el microarray de DNA contenía 105 fragmentos de PCR diferentes de genes de diferentes patotipos de *E. coli*. La combinación de métodos inmunomagnéticos y genéticos mejora la sensibilidad y especificidad. Así, las células obtenidas por separación inmunomagnética pueden ser sometidas a cultivo adicional o directamente a amplificación de ADN por PCR, ADN genómico y posterior análisis por microarrays (23). Una aproximación genómica también es posible para analizar la diversidad de aislados patogénicos y comensales (11). Se trata de usar un array genómico conteniendo todas las fases de lectura posibles de la estirpe MG1655 no patógena de *E. coli* K12 para experimentos de hibridación genómica comparativa (CGH). Hasta un 10% de las ORFs de *E. coli* k-12 no fueron detectadas en los genomas de otras estirpes de *E. coli*, lo que pone de manifiesto la tremenda heterogeneidad genómica y diversidad genética entre las estirpes de *E. coli*.

Descripción de la invención

30 Clínicamente es muy importante identificar la cepa de *E. coli* diarreagénica ya que unas son más virulentas que otras o están asociadas a epidemias más o menos difíciles de controlar.

La metodología clásica para identificar las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se basa en cultivos de laboratorio (24, 25) a partir de las muestras clínicas (heces, orina, exudados, sangre, etc). Los medios más frecuentemente utilizados para el aislamiento de *E. coli* son el agar MacConkey con lactosa y el medio eosina azul de metileno (EMB ó LEVINE). Se trata de medios selectivos que diferencian las colonias en lactosa positivas y negativas. Aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* son lactosa positivas, no se deben descartar el estudio de las colonias lactosa negativas, ya que entre el 5% de los *E. coli* que no son fermentadores de la lactosa se pueden encontrar cepas patógenas. Así, la mayor parte de los ECEI son lactosa negativos. La muestra clínica más difícil de valorar para el microbiólogo clínico es la procedente de personas o animales con diarrea, ya que al sembrar las heces en el agar MacConkey lactosa crecen casi siempre un abundante número de colonias de *E. coli*. Entonces, el problema consiste en diferenciar entre las cepas diarreagénicas de las no patógenas que forman parte de la microbiota normal del intestino grueso. Para la identificación de cepas O157:H7 se emplea agar con medio Sorbitol-MacConkey, en el cual estas cepas que no fermentan eficientemente el sorbitol y aparecen colonias sin color entre otras de color rosado que sí fermentan el azúcar. Para evitar falsos positivos se confirma con pruebas inmunológicas para detectar los antígenos O157 y H7, o las toxinas Shiga (verotoxinas). Pero algunas cepas O157 pueden ser H7 o no H7, y pueden tener sólo la toxina 1, la 2 o ambas.

Actualmente, la técnica más frecuentemente empleada para detectar los *E. coli* diarreagénicos es hacer una PCR múltiple capaz de detectar los genes de virulencia más representativos de los ECEP, ECET, ECEI, ECVT, ECEA y ECAD. Conviene probar una mezcla de al menos 10 colonias antes de descartar que el coprocultivo es negativo. Para recuperar el ECVT del serotipo O157:117 se debe emplear una placa de MACSTC. A efectos epidemiológicos es muy importante determinar el serotipo O:H de la cepa aislada. Y existen diferentes serotipos dentro de cada grupo de ECDI. Además, para los ECVT O157:117 es importante determinar su fagotipo y patrón de electroforesis en campo pulsante (PFGE). Solamente en determinados laboratorios de investigación de referencia se realiza el serotipado completo, el fagotipado y la técnica de PFGE.

Por tanto, la presente invención aporta soluciones más rápidas y eficaces en cuanto a sensibilidad y fiabilidad (con menos falsos positivos). La posibilidad que ofrecen los microarrays de ADN para rastrear la presencia de cientos a miles de genes simultáneamente es sin duda una herramienta que puede contribuir al análisis clínico de las múltiples cepas de *E. coli* tanto patógenas como no patógenas. El diseño y construcción de microarrays con sondas específicas para los diferentes grupos de ECDI agilizará tremendamente los análisis de muestras clínicas.

Por tanto, la presente invención se refiere al desarrollo de una o más sondas específicas así como de microarrays de ácidos nucleicos para la detección e identificación de los diferentes grupos de *E. coli* diarreagénicos (ECDI) así como la detección e identificación de las diferentes estirpes dentro de cada grupo, basado en la especificidad de los principales genes de virulencia para cada grupo de ECDI (ver tabla 1).

Grupo	Genes
ECVT	<i>stx1</i> , <i>stx2</i> , isla de patogenicidad LEE (<i>eae</i> , <i>espA</i> , <i>espB</i> , <i>espD</i> ., <i>tir</i>) y <i>eae-gamma1</i> específico del serotipo O157:H7
ECEP	<i>eae-universal</i> y <i>bfp</i>
ECET	<i>elt</i> y <i>est</i>
ECEI	<i>inv</i>
ECEA	pCDV432
ECAD	f1845

Una realización particular de la invención es el desarrollo de un microarray para tipar las múltiples variedades de los genes *eae*, *tir*, *espA*, *espB* y *espD* de la isla de patogenicidad LEE de los ECVT y ECEP, capaz de identificar las nuevas intiminas recientemente descubiertas por el grupo dirigido por el Dr. Jorge Blanco: beta2 (AJ715407), $\mu\psi$ (AJ705049), $\nu\psi$ (AJ705050), $\xi\psi$ (AJ705051), omicrón (AJ584840), π (pi) (AJ705052), ρ ($\rho\eta\theta$) (AJ748082) y σ (AJ781125). (El grupo del doctor Blanco (coautor de la invención) es el centro de referencia de *E. coli* en España).

En una realización particular de la invención se describe un método de ensayo basado en la amplificación y marcaje fluorescente del ADN cromosómico bacteriano extraído de cultivos, muestras clínicas, veterinarias, ambientales (aguas, suelos, excrementos animales, etc.).

Diseño de un microarray de ADN para la detección de grupos de ECDI

Tras una búsqueda bibliográfica y en las bases de datos (por ejemplo: Genbank), así como de los resultados obtenidos en nuestros laboratorios (Universidad de Santiago de Compostela y Hospital Xeral-Calde, Lugo) se obtuvo la secuencia de los genes específicos de cada grupo ECDI (ver número de acceso en la tabla 1), así como las variantes genéticas de cada locus. Contamos con una extensa colección de cepas de referencia para verificar nuestros ensayos.

Con el fin de hacer una colección de sondas específicas de cada variante, se obtuvo la secuencia de todas las variantes de cada locus y se hicieron alineamientos usando los programas bioinformáticos más frecuentes (Clustal W, por ejemplo).

Para cada locus definimos una sonda "universal" suficientemente conservada entre todas las variantes que permite identificar dicho locus, y una sonda específica de cada variante genética.

Se define sonda como una secuencia de bases nitrogenadas de entre adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T) o uracilo (U), dispuestas en un polímero lineal que es total o parcialmente complementaria (apareamientos del tipo Watson y Crick: A-T/U o G-C) a otra presente en la muestra a analizar. Tales sondas pueden ser de ácidos nucleicos (ADN, ARN), ácido nucleico peptídico (PNA), u otros ácidos nucleicos sintéticos capaces de hibridar con otros ácidos nucleicos mediante apareamientos del tipo de Watson y Crick.

Dichas sondas pueden ser o un fragmento de ADN amplificado por PCR, o un oligómero de bases nitrogenadas (sintético u obtenido por digestión enzimática u otro medio químico o físico de un polímero existente).

En una realización particular de la invención las sondas son oligonucleótidos sintéticos que llevan modificaciones en uno o en los dos extremos para facilitar la inmovilización a soportes sólidos. En la tabla 1 todas las sondas con las secuencias SEC. ID. NO. 1- SEC. ID. NO. 186 están modificadas con un grupo amino en 5' seguido de una cola de 10 timidinas.

Las sondas se diseñan y se construyen de tal forma que su secuencia de bases sea única para la variedad que representa, y de tal forma que las discrepancias (nucleótidos no complementarios) entre dos o más variantes suelen estar en las zonas centrales de los oligonucleótidos.

La longitud de los oligonucleótidos puede variar entre 5 o más bases, siendo preferentemente entre 11 y 30 nucleótidos la longitud más apropiada para discriminar entre dos secuencias muy similares pero no idénticas de ácidos nucleicos.

Una vez obtenida la colección de oligonucleótidos y/o fragmentos obtenidos por amplificación por PCR (amplificones), se inmovilizarán en soportes sólidos convenientemente activados con grupos químicos como epoxy, amino,

ES 2 323 911 A1

5 carboxilo, etc. Dichos soportes pueden ser de vidrio, nylon, silicio, plástico, oro, nitrocelulosa u otro polímero y pueden estar en formato bidimensional como los portas de microscopio, u obleas de silicio u oro, mallas tridimensionales, geles, coloides o en forma de micro y nanoesferas. En una realización particular, los soportes son portas de microscopio, que pueden estar activados con grupos epoxy por su eficiencia en la unión de moléculas y la rapidez con que
10 ello ocurre (tan solo 10 minutos después de la impresión el array está listo para usar), así como por la sencillez del tratamiento post-impresión. Las sondas se imprimen o colocan en el soporte, en forma de matriz ordenada (“arrays”) uno o más arrays por porta, lo cual permite al menos dos análisis por paralelo. Puesto que el número de puntos no excederá de 100 o 200, es posible imprimir entre 1 y 18 arrays por porta, de tal forma que se pueden analizar hasta 18 muestras a la vez en un mismo chip.

10 Una vez impresos los arrays se procederá a comprobar su calidad mediante el análisis de estirpes tipo de cada uno de los grupos. Para ello se extrae el ADN cromosómico de un cultivo de cada cepa y se marca fluorescentemente (por incorporación de Cy5- dUTP o Cy5-dCTP por ejemplo, por la enzima ADNpol (Klenow). La incubación posterior con el chip, lavado y escaneado rinde una imagen que es analizada por un software (Axon GenePix, por ejemplo) que
15 permite la cuantificación relativa de la fluorescencia en cada punto. Los puntos fluorescentes por encima del fondo y de los controles negativos indican la presencia del gen correspondiente en la preparación de ADN y por tanto de la estirpe que lo originó.

20 Una vez comprobada la especificidad de cada sonda, se procede a determinar los límites de detección de cada una en mezclas complejas pero de composición conocida. En el caso de que alguna de las sondas dé resultados ambiguos se sustituirá por otra nueva hasta encontrar la adecuada.

25 Por último los chips se probarán con preparaciones de ADN de muestras clínicas. El ADN total bacteriano (plasmídico o cromosómico) se extrae mediante los métodos al uso en el arte.

Una realización particular de la invención comprende el análisis de múltiples cepas de *E. coli* diarreagénicas mediante microarrays de ADN a partir de muestras clínicas mediante los siguientes pasos:

- 30 a. Extracción de ADN de muestras clínicas, veterinarias o ambientales
- b. Amplificación del ADN
- c. Fragmentación del ADN
- 35 d. Marcaje del ADN
- e. Hibridación con un microarray
- f. Lavado
- 40 g. Lectura
- h. Interpretación

45 Las muestras clínicas pueden ser de heces, coprocultivos, orina, pus, esputos, aislados, etc; las muestras veterinarias pueden ser heces animales, leche, alimentos, carnes (1 célula de *E. coli* es suficiente para provocar una infección), etc; y las muestras ambientales pueden ser aguas (residuales o no), suelos, etc. El ADN se puede extraer con cualquiera de los métodos conocidos y descritos para tal fin.

50 En caso de que la cantidad de ADN obtenida sea limitante, se procede a una amplificación por métodos de amplificación de ADN como el llamado método de amplificación por desplazamiento múltiple (MDA por “Multiple Displacement Amplification”). En particular, tal amplificación se puede hacer con la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 (patente nº US5001050, WO9116446). A partir del ADN total, amplificado o no, se procede a una amplificación del gen o los genes objeto de análisis mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La reacción de
55 PCR puede ser simple (un solo gen amplificado), múltiple (multiplex PCR) si se amplifican varios genes a la vez, o PCR de largo alcance para amplificar un fragmento relativamente largo de ADN (de 5 a 50 kpb) que contenga grupos de genes objeto de análisis.

60 Cuando el ADN es de tamaño grande (más de 5 kpb) se requiere una fragmentación en tamaños de entre 0,5 a 3 kpb para favorecer los procesos de hibridación. La fragmentación puede ser por métodos físicos (presión, cizalla, ultrasonidos, etc.), químicos (modificación química de algunas bases y corte con piperidina, por ejemplo), o bioquímicos (cortes con enzimas de restricción). En una realización particular de la invención el ADN se fragmenta mediante la aplicación de ultrasonidos durante 10 a 60 segundos por inmersión de un tubo con la muestra en un baño de agua
65 situado sobre una sonda de ultrasonidos. La frecuencia de los ultrasonidos y el tiempo de sonicación determinan el tamaño de los fragmentos de ADN que se obtiene.

ES 2 323 911 A1

El marcaje del ADN puede ser con compuestos fluorescentes, con radioisótopos (32P, 33P, 35S, etc.), con biotina, con bromo, o con cualquier otro compuesto marcador. Dicho marcaje se puede realizar por incorporación directa de nucleótidos ya modificados en las reacciones de amplificación. En una realización particular se emplean dUTP o dCTP previamente marcados con fluorocromos como Cy3, Cy5, Alexa 647, Alexa 488, etc. en las reacciones de amplificación con PCR o por extensión al azar con la ADN polimerasa “Klenow”. En una realización particular el marcaje se hace por incorporación química de reactivos (como átomos de Bromo) a las bases del ADN, en concreto en la posición 7 de las guaninas, como funciona el método comercial ULYSES (Molecular Probes). En una realización particular el marcaje se hace por incorporación enzimática de precursores nucleotídicos previamente marcados con radioisótopos (32P, 33P, 35S, etc) o con biotina.

La muestra de ADN marcada se pone en contacto con las sondas inmovilizadas en un soporte para que tenga lugar la hibridación entre ácidos nucleicos. El proceso se lleva cabo utilizando las soluciones y los procedimientos al uso en el arte. En una realización particular de la invención una misma muestra es dividida e incubada simultáneamente en varios arrays en tampones con concentraciones crecientes de agentes desestabilizadores de la hibridación (formamida, DMSO, etc.). En otra realización particular, la muestra es incubada en varios arrays con el mismo tampón pero en temperaturas crecientes. De esta forma se obtienen patrones dinámicos de hibridación que ayudan a identificar las hibridaciones específicas.

Después de la incubación del ADN marcado con los arrays de sondas, los chips son lavados con las soluciones y tampones al uso, y el resultado de la hibridación es leído con los dispositivos técnicos adecuados según el sistema de marcaje que se empleó. En una realización particular el ADN se marca con un compuesto fluorescente y el resultado de la hibridación se lee con un dispositivo óptico (cámara CCD, escáner, etc.). Si el marcaje se hace con un compuesto radiactivo, el resultado se revela con una película de radiosensible. Si el ADN se marca con biotina, o con bromo, el resultado se puede revelar con un anticuerpo anti-biotina o anti-bromo fluorescentes, streptavidina fluorescente, o cualquiera de los dos anteriores acoplados a una enzima (como “horse radish peroxidase” o HRP, fosfatasa alcalina, etc.) para generar un producto medible en presencia de un sustrato adecuado.

Una realización particular de la invención comprende el análisis de múltiples cepas de *E. coli* diarregénicos mediante microarrays de ADN a partir de muestras clínicas mediante los siguientes pasos:

- a. Enriquecimiento de la muestra mediante cultivos en medios selectivos
- b. Extracción de ADN de muestras de cultivos
- c. Amplificación del ADN (si es necesario)
- d. Fragmentación del ADN (si es necesario)
- e. Marcaje del ADN
- f. Hibridación con un microarray
- g. Lavado
- h. Lectura
- i. Interpretación

En una realización particular de la invención el ADN sin marcar se incuba directamente con las sondas del array y la lectura se realiza mediante métodos espectrométricos (por ejemplo, espectrometría de masas), o por resonancia de plasmon en superficie (“surface plasmon resonance”).

Una realización particular de la invención comprende el análisis de múltiples cepas de *E. coli* diarregénicos mediante PCR con oligonucleótidos específicos a partir de muestras clínicas mediante los siguientes pasos:

- a. Extracción de ADN de una muestra clínica o de un coprocultivo
- b. Amplificación por PCR con al menos uno de los oligonucleótidos específicos que se muestran en la tabla 1.

El ADN puede extraerse mediante cualquiera de los métodos al uso, o bien mediante una lisis rápida de la muestra en un tubo con agua. El ADN así liberado es usado como molde para la amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos. Cuando las muestras biológicas están suficientemente concentradas es posible realizar el proceso de liberación del ADN y la PCR en un mismo tubo, simplemente tomando una pequeña muestra de células y añadiéndolas al mismo tubo que contiene los reactivos para la reacción de PCR. La reacción de PCR puede ser sencilla o múltiple, clásica o en tiempo real.

ES 2 323 911 A1

Otro objeto de la presente invención, se refiere a un kit para la detección e identificación de diferentes estirpes de *Escherichia coli* diarreagénicos, presentes en muestras clínicas, veterinarias, aguas, suelos, heces, piensos, y en general cualquier tipo de muestras, que comprende:

- 5 a. Uno o más biochips conteniendo uno o más microarrays con al menos uno de los oligonucleótidos con las secuencias SEC. ID. NO. 1- SEC. ID. NO. 350.
- b. Al menos un tipo de ADN de alguna estirpe de *E. coli* diarreagénico como control
- 10 c. Al menos un juego de oligonucleótidos de entre los que figuran en las tablas 2 (SEC. ID. NO. 187- SEC. ID. NO. 350) y 3 que sirvan de iniciadores para amplificar por PCR al menos uno de los genes de la isla LEE
- d. Medios para el aislamiento de ADN total bacteriano
- 15 e. Medios para la amplificación de ADN bacteriano
- f. Medios para la amplificación y marcaje simultáneos de una parte o de todo el ADN bacteriano.
- 20 g. Medios para el marcaje y purificación de ADN
- h. Medios para la hibridación del ADN con los microarrays
- i. Software para la interpretación de los resultados

25 Otro objeto de la presente invención, se refiere a un kit para la detección e identificación de diferentes estirpes de *Escherichia coli* diarreagénicos, presentes en muestras clínicas, veterinarias, aguas, suelos, heces, piensos, y en general cualquier tipo de muestras, que comprende:

- 30 a. Medios para el aislamiento de ADN total bacteriano
- b. Al menos un tipo de ADN de alguna estirpe de *E. coli* diarreagénico como control.
- c. Medios para la amplificación de ADN total bacteriano
- 35 d. Al menos un oligonucleótido con las secuencias SEC. ID. NO. 1-SEC. ID. NO. 350 que sirvan de iniciadores para la amplificación específica de al menos uno de los genes de la isla LEE mediante PCR clásica, PCR en tiempo real, RT-PCR, etc.

(Tabla pasa a página siguiente)

45

50

55

60

65

ES 2 323 911 A1

TABLA 1

Secuencias de las diferentes sondas de oligonucleótidos del microarray STEC-EPEC descrito en la presente invención. (Lista de todas las sondas de oligonucleótidos que van incluidas en los biochips descritos en la presente invención o que sirven como iniciadores para reacciones de PCR)

Sonda	Long. (nt)	Secuencia	Tm (°C)	Gen	Banco de Genes	Or.	Referencia	Tipo de Cepa
EAE-1	24	SEC. ID. NO. 1	66	<i>eae</i>	AF022236	F	14	Universal
EAE-2	20	SEC. ID. NO. 2	60	<i>eae</i>	AF022236	R	14	Universal
EAE-F	21	SEC. ID. NO. 3	56	<i>eae</i>	AF022236	F	14	Universal
EAE-A1F	20	SEC. ID. NO. 4	60	<i>eae-α1</i>	AF022236	F	Este estudio	2348III
EAE-A	20	SEC. ID. NO. 5	60	<i>eae-α1</i>	AF022236	R	14	2348III
IH2498aF	24	SEC. ID. NO. 6	66	<i>eae-α2</i>	AF530555	F	2	IH2498a
EAE-A2R	21	SEC. ID. NO. 7	60	<i>eae-α2</i>	AF530555	R	Este estudio	IH2498a
EAE-B3F	21	SEC. ID. NO. 8	62	<i>eae-β1</i>	AF453441	F	Este estudio	FV4805
EAE-B6R	21	SEC. ID. NO. 9	58	<i>eae-β1</i>	AF453441	R	Este estudio	FV4805
EAE-B4F	21	SEC. ID. NO. 10	60	<i>eae-β2</i>	AJ715407	F	Este estudio	FV359
EAE-B5R	20	SEC. ID. NO. 11	60	<i>eae-β2</i>	AJ715407	R	Este estudio	FV359
EAE-G1F	21	SEC. ID. NO. 12	58	<i>eae-γ1</i>	AF071034	F	Este estudio	O157-156
EAE-C1	22	SEC. ID. NO. 13	62	<i>eae-γ1</i>	AF071034	R	14	O157-156
EAE-G2F	24	SEC. ID. NO. 14	60	<i>eae-γ2</i>	AF025311	F	Este estudio	VTB351
EAE-C2m	22	SEC. ID. NO. 15	60	<i>eae-γ2</i>	AF025311	R	Este estudio	VTB351
EAE-D2F	21	SEC. ID. NO. 16	60	<i>eae-δ</i>	U66102	F	Este estudio	EPEC-9
EAE-D3R	21	SEC. ID. NO. 17	62	<i>eae-δ</i>	U66102	R	Este estudio	EPEC-9
EAE-ep1F	22	SEC. ID. NO. 18	58	<i>eae-ε</i>	AF116899	F	Este estudio	VTB286
EAE-ep2R	22	SEC. ID. NO. 19	60	<i>eae-ε</i>	AF116899	R	Este estudio	VTB286
EAE-et1F	22	SEC. ID. NO. 20	62	<i>eae-η</i>	AJ308550	F	Este estudio	FV3671
EAE-et2R	22	SEC. ID. NO. 21	60	<i>eae-η</i>	AJ308550	R	Este estudio	FV3671
EAE-i1F	22	SEC. ID. NO. 22	70	<i>eae-ι</i>	AJ308551	F	Este estudio	FV3676
LP7m	21	SEC. ID. NO. 23	58	<i>eae-ι</i>	AJ308551	R	Este estudio	FV3676
EAE-L1F	23	SEC. ID. NO. 24	62	<i>eae-λ</i>	AF530557	F	Este estudio	68-4
EAE-L2R	21	SEC. ID. NO. 25	56	<i>eae-λ</i>	AF530557	R	Este estudio	68-4
EAE-M1F	21	SEC. ID. NO. 26	64	<i>eae-μ</i>	AJ705049	F	Este estudio	FV380
FV373-R	23	SEC. ID. NO. 27	60	<i>eae-μ</i>	AJ705049	R	2	FV380
EAE-N1F	24	SEC. ID. NO. 28	60	<i>eae-ν</i>	AJ705050	F	Este estudio	IH1229a
EAE-N2R	21	SEC. ID. NO. 29	56	<i>eae-ν</i>	AJ705050	R	Este estudio	IH1229a
IH2997-F	20	SEC. ID. NO. 30	62	<i>eae-ο</i>	AJ876648	F	Este estudio	IH2997f
IH2997-R	21	SEC. ID. NO. 31	60	<i>eae-ο</i>	AJ876648	R	Este estudio	IH2997f
B49R	22	SEC. ID. NO. 32	62	<i>eae-ξ</i>	AJ705051	R	2	B49a
EAE-Z1F	21	SEC. ID. NO. 33	60	<i>eae-ζ</i>	AF449417	F	Este estudio	VTO-50
EAE-Z2R	21	SEC. ID. NO. 34	62	<i>eae-ζ</i>	AF449417	R	Este estudio	VTO-50
EspA-1	17	SEC. ID. NO. 35	52	<i>espA</i>	AF022236	F	Este estudio	Universal
EspA-I1R	23	SEC. ID. NO. 36	56	<i>espA-α1</i>	AF022236	R	Este estudio	FV3676
EspA-II1R	21	SEC. ID. NO. 37	56	<i>espA-β1</i>	AF453441	R	Este estudio	B49a
EspA-III1R	23	SEC. ID. NO. 38	64	<i>espA-β2</i>	AJ225017	R	Este estudio	FV359
EspA-IV1R	23	SEC. ID. NO. 39	64	<i>espA-γ1</i>	AF071034	R	Este estudio	O157-156

ES 2 323 911 A1

EspB-F	17	SEC. ID. NO. 40	52	<i>espB</i>	AF022236	F	Este estudio	Universal
EspB-I1R	20	SEC. ID. NO. 41	62	<i>espB-α1</i>	AF022236	R	Este estudio	FV3676
EspB-II1R	21	SEC. ID. NO. 42	68	<i>espB-β1</i>	AF453441	R	Este estudio	VTB286
EspB-III1R	23	SEC. ID. NO. 43	60	<i>espB-γ1</i>	AF071034	R	Este estudio	O157-156
EspD-4F	19	SEC. ID. NO. 44	60	<i>espD</i>	AF022236	F	Este estudio	Universal
EspD-I1R	23	SEC. ID. NO. 45	60	<i>espD-α1</i>	AF022236	R	Este estudio	FV3676
EspD-II1R	21	SEC. ID. NO. 46	60	<i>espD-β1</i>	AF453441	R	Este estudio	VTB286
EspD-III1R	21	SEC. ID. NO. 47	60	<i>espD-γ1</i>	AF071034	R	Este estudio	O157-156
TIR-A	20	SEC. ID. NO. 48	58	<i>tir</i>	AF022236	F	Este estudio	Universal
TIR-B	20	SEC. ID. NO. 49	60	<i>tir</i>	AF022236	R	Este estudio	Universal
TIR-I1F	19	SEC. ID. NO. 50	58	<i>tir-α1</i>	AF022236	F	Este estudio	FV3676
TIR-I1R	20	SEC. ID. NO. 51	62	<i>tir-α1</i>	AF022236	R	Este estudio	FV3676
TIR-II1F	22	SEC. ID. NO. 52	64	<i>tir-β1</i>	AF453441	F	Este estudio	VTB286
TIR-II1R	22	SEC. ID. NO. 53	62	<i>tir-β1</i>	AF453441	R	Este estudio	VTB286
TIR-III1F	21	SEC. ID. NO. 54	60	<i>tir-γ1</i>	AF071034	F	Este estudio	O157-156
TIR-III1R	21	SEC. ID. NO. 55	60	<i>tir-γ1</i>	AF071034	R	Este estudio	O157-156
TIR-IV1F	21	SEC. ID. NO. 56	64	<i>tir-γ2</i>	AF025311	F	Este estudio	VTB351
TIR-IV1R	21	SEC. ID. NO. 57	60	<i>tir-γ2</i>	AF025311	R	Este estudio	VTB351
TIR-UP	24	SEC. ID. NO. 58	64	Universal	AF022236	F	Este estudio	Universal
EspB-DOWN	23	SEC. ID. NO. 59	68	Universal	AF022236	R	Este estudio	Universal
Lcasei-F	20	SEC. ID. NO. 60	56	16s rRNA	AY773945.1	F	Este estudio	L. casei
Y2-R	24	SEC. ID. NO. 61	80	16s rRNA	AY773945.1	R	Este estudio	Universal
EAE-12	21	SEC. ID. NO. 62	62	<i>eae</i>	AF022236	F	Este estudio	Universal
EAE-RBm	21	SEC. ID. NO. 63	60	<i>eae</i>	AF022236	R	Este estudio	Universal
EAE-A2F	18	SEC. ID. NO. 64	60	<i>eae-α2</i>	AF530555	F	Este estudio	IH2498a
EAE-B7F	20	SEC. ID. NO. 65	62	<i>eae-β1</i>	AF453441	F	Este estudio	EPEC-4
EAE-B8R	19	SEC. ID. NO. 66	50	<i>eae-β1</i>	AF453441	R	Este estudio	EPEC-4
EAE-B9F	20	SEC. ID. NO. 67	60	<i>eae-β2</i>	AF043226	F	Este estudio	FV359
EAE-B	21	SEC. ID. NO. 68	62	<i>eae-β1/β2</i>	AF453441	R	Este estudio	EPEC-4
EAE-i2F	19	SEC. ID. NO. 69	60	<i>eae-ι</i>	AJ308551	F	Este estudio	FV3676
EAE-i1R	21	SEC. ID. NO. 70	60	<i>eae-ι</i>	AJ308551	R	Este estudio	FV3676
EAE-M2F	21	SEC. ID. NO. 71	60	<i>eae-μ</i>	AJ579305	F	Este estudio	FV380
EAE-N3R	21	SEC. ID. NO. 72	58	<i>eae-ν</i>	AJ579306	R	Este estudio	IH1229a
TIR-III2F	21	SEC. ID. NO. 73	56	<i>tir-γ1</i>	AF071034	F	Este estudio	O157-156
TIR-IV2	22	SEC. ID. NO. 74	58	<i>tir-γ2</i>	AF025311	F	Este estudio	VTB351
EspA-I2R	21	SEC. ID. NO. 75	58	<i>espA-α1</i>	AF022236	R	Este estudio	FV3676
EspA-II2R	21	SEC. ID. NO. 76	58	<i>espA-β1</i>	AF453441	R	Este estudio	B49a
EspB-I2R	21	SEC. ID. NO. 77	56	<i>espB-α1</i>	AF022236	R	Este estudio	FV3676
EspB-II2R	19	SEC. ID. NO. 78	60	<i>espB-β1</i>	AF453441	R	Este estudio	VTB286
EspD-I2R	21	SEC. ID. NO. 79	62	<i>espD-α1</i>	AF022236	R	Este estudio	FV3676
EspD-III2R	18	SEC. ID. NO. 80	50	<i>espD-γ1</i>	AF071034	R	Este estudio	O157-156
EAE 60mer	59	SEC. ID. NO. 81		<i>eae</i>	AF022236	F	Este estudio	Universal
EAEB7-FAP	20	SEC. ID. NO. 82	62	<i>eae-β1</i>	AF453441	R	Este estudio	FV4805
EAEB3-FAP	15	SEC. ID. NO. 83	62	<i>eae-β1</i>	AF453441	R	Este estudio	FV4805
EAEB4-FAP	18	SEC. ID. NO. 84	52	<i>eae-β2</i>	AF453441	R	Este estudio	FV359
EAEB9-FAP	18	SEC. ID. NO. 85	56	<i>eae-β2</i>	AF453441	R	Este estudio	FV359
EAEB10-F	19	SEC. ID. NO. 86	60	<i>eae-β</i>	AF453441	F	Este estudio	FV4805 y FV359
EAED2-FAP	20	SEC. ID. NO. 87	56	<i>eae-δ</i>	U66102	R	Este estudio	EPEC-9
EAEep-1FAP	21	SEC. ID. NO. 88	56	<i>eae-ϵ</i>	AF116899	R	Este estudio	VTB286
EAEet-3R	20	SEC. ID. NO. 89	62	<i>eae-η</i>	AJ308550	R	Este estudio	FV3671
EAE-FAP	21	SEC. ID. NO. 90	56	<i>eae</i>	AF022236	R	Este estudio	Universal
EAEG1-FAP	21	SEC. ID. NO. 91	54	<i>eae-γ1</i>	AF071034	R	Este estudio	O157-156
EAEM3-F	20	SEC. ID. NO. 92	62	<i>eae-μ</i>	AJ705049	F	Este estudio	FV380
EspA-F	20	SEC. ID. NO. 93	54	<i>espA</i>	AF022236	F	Este estudio	Universal
EspAI-2F	18	SEC. ID. NO. 94	42	<i>espA-α1</i>	AF022236	F	Este estudio	FV3676
EspAII-2F	18	SEC. ID. NO. 95	44	<i>espA-β1</i>	AF453441	F	Este estudio	B49a
EspAII-3F	18	SEC. ID. NO. 96	46	<i>espA-β1</i>	AF453441	F	Este estudio	B49a
EspA-III1RAP	21	SEC. ID. NO. 97	58	<i>espA-β2</i>	AJ225017	F	Este estudio	FV359

ES 2 323 911 A1

EspAIV-2F	18	SEC. ID. NO. 98	54	<i>espA-γ1</i>	AF071034	F	Este estudio	O157-156
EspBI-2F	20	SEC. ID. NO. 99	66	<i>espB-α1</i>	AF022236	F	Este estudio	FV3676
EspBII-2F	19	SEC. ID. NO. 100	60	<i>espB-β1</i>	AF453441	F	Este estudio	VTB286
TIR-A2	20	SEC. ID. NO. 101	56-60	<i>tir</i>	AF022236	F	Este estudio	Universal
TIR-B2	21	SEC. ID. NO. 102	60	<i>tir</i>	AF022236	R	Este estudio	Universal
EAEP1-R	20	SEC. ID. NO. 103	56	<i>eae π</i>	AJ705052	R	Este estudio	FV1015
EAEP2-R	21	SEC. ID. NO. 104	52	<i>eae π</i>	AJ705052	R	Este estudio	FV1015
B2A	19	SEC. ID. NO. 105	62	<i>eae-β2</i>	AF043226	F	Este estudio	FV359
EAEB11-R	23	SEC. ID. NO. 106	60	<i>eae-β3</i>	AJ876654	R	Este estudio	34136b
EAEB12-R	21	SEC. ID. NO. 107	60	<i>eae-β3</i>	AJ876654	R	Este estudio	34136b
TIR-A2	20	SEC. ID. NO. 108	56-60	<i>tir</i>	AF022236	F	Este estudio	Universal
TIR-B2	21	SEC. ID. NO. 109	60	<i>tir</i>	AF022236	R	Este estudio	Universal
EAEP1-R	20	SEC. ID. NO. 110	56	<i>eae π</i>	AJ705052	R	Este estudio	FV1015
EAEP2-R	21	SEC. ID. NO. 111	52	<i>eae π</i>	AJ705052	R	Este estudio	FV1015
B2A	19	SEC. ID. NO. 112	62	<i>eae-β2</i>	AF043226	F	Este estudio	FV359
EAEB11-R	23	SEC. ID. NO. 113	60	<i>eae-β3</i>	AJ876654	R	Este estudio	34136b
EAEB12-R	21	SEC. ID. NO. 114	60	<i>eae-β3</i>	AJ876654	R	Este estudio	34136b
EAEB13-F	22	SEC. ID. NO. 115	60	<i>eae-β3</i>	AJ876654	F	Este estudio	34136b
EAED4-R	21	SEC. ID. NO. 116	58	<i>eae-δ</i>	U66102	R	Este estudio	EPEC-9
EAEep2-F	19	SEC. ID. NO. 117	62	<i>eae-ε2</i>	AF530554	F	Este estudio	IH1161a
EAEep3-R	21	SEC. ID. NO. 118	62	<i>eae-ε3</i>	AJ876649	R	Este estudio	31923a
IOTA2-2F	21	SEC. ID. NO. 119	58	<i>eae-ι2</i>	AF530553	F	Este estudio	IH2990a
IOTA2-R	22	SEC. ID. NO. 120	58	<i>eae-ι2</i>	AF530553	R	Este estudio	IH2990a
EAERO-F	20	SEC. ID. NO. 121	56	<i>eae-ρ</i>	AJ748082	F	Este estudio	FV4795
EAERO-R	20	SEC. ID. NO. 122	60	<i>eae-ρ</i>	AJ748082	R	Este estudio	FV4795
EAES-R	20	SEC. ID. NO. 123	62	<i>eae-σ</i>	AJ781125	R	Este estudio	FV5090
Lin-up	23	SEC. ID. NO. 124	58	<i>stx1</i>	M17358	F	31	Universal
stx1-B	21	SEC. ID. NO. 125	60	<i>stx1</i>	M17358	R	Este estudio	FV3489
stx1OX3	20	SEC. ID. NO. 126	58	<i>stx1c</i>	Z36901	R	31	FV3482
VT2-A	20	SEC. ID. NO. 127	62	<i>stx2</i>	M59432	F	14	Universal
stx2-B	20	SEC. ID. NO. 128	60	<i>stx2</i>	X07865	R	32	FV3489
stx2c-B	20	SEC. ID. NO. 129	60	<i>stx2c</i>	M59432	R	32	FV3490
stx2d-B1	19	SEC. ID. NO. 130	66	<i>stx2d</i>	AF043627	R	Este estudio	FV3491
stx2e-A	22	SEC. ID. NO. 131	66	<i>stx2e</i>	M36727	F	32	FV3492
stx2e-B1	21	SEC. ID. NO. 132	60	<i>stx2e</i>	M36727	R	Este estudio	FV3492
stx2f-A	21	SEC. ID. NO. 133	60	<i>stx2f</i>	M29153	F	32	FV3515
stx2f-B	25	SEC. ID. NO. 134	64	<i>stx2f</i>	M29153	R	32	FV3515
stx2-NV1	23	SEC. ID. NO. 135	62	<i>stx2-NV206</i>	AF329817	R	Este estudio	FV3493
PT1-2	21	SEC. ID. NO. 136	60	<i>uidA</i>	S69414	F	33	FV3489
PT1-3	20	SEC. ID. NO. 137	60	<i>uidA</i>	S69414	R	33	FV3489
terC1-1	20	SEC. ID. NO. 138	62	<i>terC</i>	AE005174	F	34	FV3489
terC2	24	SEC. ID. NO. 139	62	<i>terC</i>	AE005174	R	34	FV3489
tagA-A	23	SEC. ID. NO. 140	62	<i>tagA</i>	AF074613	F	35	FV3489
tagA-B	22	SEC. ID. NO. 141	64	<i>tagA</i>	AF074613	R	35	FV3489
sfpA-U	22	SEC. ID. NO. 142	64	<i>sfpA</i>	AF228759	F	36	
sfpA-L	22	SEC. ID. NO. 143	64	<i>sfpA</i>	AF228759	R	36	
saaD-F	20	SEC. ID. NO. 144	60	<i>saa</i>	AF325220	F	37	FV3490
saaD-R	20	SEC. ID. NO. 145	62	<i>saa</i>	AF325220	R	37	FV3490
O157-AF	21	SEC. ID. NO. 146	62	<i>rfbE</i>	S83460	F	38	FV3489
O157-AR	20	SEC. ID. NO. 147	62	<i>rfbE</i>	S83460	R	38	FV3489
pilS-F	21	SEC. ID. NO. 148	60	<i>pilS</i>	AY258503	F	39	FV3490
pilS-R	19	SEC. ID. NO. 149	60	<i>pilS</i>	AY258503	R	39	FV3490
wkat-B	22	SEC. ID. NO. 150	64	<i>katP</i>	X89017	F	40	FV3489
wkat-F	21	SEC. ID. NO. 151	58	<i>katP</i>	X89017	R	40	FV3489
irp2-FP	21	SEC. ID. NO. 152	64	<i>irp2</i>	L18881	F	41	FV4028
irp2-RP	20	SEC. ID. NO. 153	64	<i>irp2</i>	L18881	R	41	FV4028
iha-F	20	SEC. ID. NO. 154	64	<i>iha(TAI)</i>	AF126104	F	Este estudio	FV3489
iha-R	20	SEC. ID. NO. 155	66	<i>iha(TAI)</i>	AF126104	R	Este estudio	FV3489
iha-II	19	SEC. ID. NO. 156	58	<i>iha(LPA)</i>	AJ278144	F	41	FV4044

ES 2 323 911 A1

lha-I	21	SEC. ID. NO. 157	62	<i>lha(LPA)</i>	AJ278144	R	41	FV4044
hlyA1	22	SEC. ID. NO. 158	64	<i>hlyA</i>	X79839	F	Schmidt 1995	FV3489
hlyA4	22	SEC. ID. NO. 159	64	<i>hlyA</i>	X79839	R	Schmidt 1995	FV3489
fyuA-F	20	SEC. ID. NO. 160	64	<i>fyuA</i>	Z38064	F	41	FV4028
fyuA-R	21	SEC. ID. NO. 161	64	<i>fyuA</i>	Z38064	R	41	FV4028
H7-F	20	SEC. ID. NO. 162	62	<i>fliC-H7</i>	U47614	F	42	FV3489
H7-R1	22	SEC. ID. NO. 163	62	<i>fliC-H7</i>	U47614	R	42	FV3489
D1	19	SEC. ID. NO. 164	60	<i>etpD</i>	Y09824	F	41	FV3489
D13-R	21	SEC. ID. NO. 165	64	<i>etpD</i>	Y09824	R	41	FV3489
EspP-A	20	SEC. ID. NO. 166	60	<i>espP</i>	AF074613	F	41	FV3489
EspP-B	20	SEC. ID. NO. 167	60	<i>espP</i>	AF074613	R	41	FV3489
espl-I	19	SEC. ID. NO. 168	58	<i>espl</i>	AJ278144	F	41	FV4044
espl-II	20	SEC. ID. NO. 169	58	<i>espl</i>	AJ278144	R	41	FV4044
E643-F	21	SEC. ID. NO. 170	60	<i>efa-1</i>	AF453441	F	41	
E1598-R	20	SEC. ID. NO. 171	58	<i>efa-1</i>	AF453441	R	41	
btuB-II	21	SEC. ID. NO. 172	62	<i>btuB</i>	AJ278144	F	41	FV4044
btuB-I	20	SEC. ID. NO. 173	62	<i>btuB</i>	AJ278144	R	41	FV4044
stx2e-B2	19	SEC. ID. NO. 174	48	<i>stx2e</i>	M36727	R	Este estudio	FV3492
stx2d-B2	19	SEC. ID. NO. 175	60	<i>stx2d</i>	AF043627	R	Este estudio	FV3491
stx1c-R	16	SEC. ID. NO. 176	42	<i>stx1c</i>	Z36901	R	Este estudio	FV3482
stx1c-RAP	16	SEC. ID. NO. 177	42	<i>stx1c</i>	Z36901	F	Este estudio	FV3482
stx2g-R	18	SEC. ID. NO. 178	52	<i>stx2g</i>	AY286000	R	Este estudio	FV4128
stx1d-R	21	SEC. ID. NO. 179	60	<i>stx1d</i>	AY170851	R	Este estudio	
bfpA-F	21	SEC. ID. NO. 180	60	<i>bfpA</i>	AB024946	F	Este estudio	2348III
bfpA-a	21	SEC. ID. NO. 181	64	<i>bfpA</i>	AB024946	R	Este estudio	2348III
bfpA-b	21	SEC. ID. NO. 182	64	<i>bfpA</i>	AF304486	R	Este estudio	
subA-1	22	SEC. ID. NO. 183	58	<i>subA</i>	AF399919.3	F	Este estudio	FV4068
subA-2	21	SEC. ID. NO. 184	58	<i>subA</i>	AF399919.3	R	Este estudio	FV4068
subB-1	21	SEC. ID. NO. 185	60	<i>subB</i>	AF399919.3	F	Este estudio	FV4068
subB-2	21	SEC. ID. NO. 186	58	<i>subB</i>	AF399919.3	R	Este estudio	FV4068
Tm= 2AT+4GC. Or., orientación hacia delante(F) o inversa (R)								

TABLA 2

Cebadores para PCR y condiciones de amplificación específica de los genes de virulencia de *E. coli* verotoxigénicas y enteropatógenicas

Genes	Cebador	Oligonucleótidos (5'-3') ^a	Tamaño fragmento (bp)	T ^a incandescencia	Coordinadas del cebador	No. acceso	Ref.
<i>stx</i> ₁	VT1-A VT1-B	SEC. ID. NO. 187 SEC. ID. NO. 188	302	55°C	113-134 394-414	M17358	14
<i>stx</i> ₂	VT2-A VT2-B	SEC. ID. NO. 189 SEC. ID. NO. 190	516	55°C	50-69 343-565	M59432	14
<i>bfpA</i>	EP1 EP2	SEC. ID. NO. 191 SEC. ID. NO. 192	326	60°C	60-80 363-383	Z68186	26
<i>eae</i> ^a	EAE-1 EAE-2	SEC. ID. NO. 193 SEC. ID. NO. 194	775	55°C	1441-1460 2193-2215	AF022236	2
<i>eae</i> -α1	EAE-FB EAE-A	SEC. ID. NO. 195 SEC. ID. NO. 196	820	60°C	1909-1928 2709-2728	AF022236	2
<i>eae</i> -α2	IH2498aF IH2498aR	SEC. ID. NO. 197 SEC. ID. NO. 198	517	60°C	2099-2122 2597-2615	AF530555	2
<i>eae</i> -β1	B1F B1R	SEC. ID. NO. 199 SEC. ID. NO. 200	241	55°C	2499-2517 2720-2739	AF453441	Este estudio
<i>eae</i> -β2	B2F B2R	SEC. ID. NO. 201 SEC. ID. NO. 202	564	62°C	2054-2073 2596-2617	AF530556 AJ715407	Este estudio

ES 2 323 911 A1

	<i>eae-γ1</i>	EAE-FB EAE-C1	SEC. ID. NO. 203 SEC. ID. NO. 204	804	60°C	1909-1928 2691-2712	AF071034	2
	<i>eae-γ2/θ</i>	EAE-C2F EAE-C2R	SEC. ID. NO. 205 SEC. ID. NO. 206	414	58°C	2303-2322 2697-2716	AF025311	Este estudio
5	<i>eae-δ/κ</i>	EAE-FB EAE-D	SEC. ID. NO. 207 SEC. ID. NO. 208	833	60°C	1909-1928 2721-2741	U66102	2
	<i>eae-ε</i>	EAE-FB LP5	SEC. ID. NO. 209 SEC. ID. NO. 210	722	66°C	1909-1928 2605-2630	AF116899	2
10	<i>eae-ζ</i>	Z1 Z2	SEC. ID. NO. 211 SEC. ID. NO. 212	206	62°C	2062-2079 2250-2267	AF449417	2
	<i>eae-η</i>	EAE-FB ETA-B	SEC. ID. NO. 213 SEC. ID. NO. 214	702	60°C	1899-1918 2582-2600	AJ308550	Este estudio
	<i>eae-ι</i>	EAE-FB IOTA-B	SEC. ID. NO. 215 SEC. ID. NO. 216	651	55°C	1909-1928 2538-2559	AJ308551	Este estudio
15	<i>eae-λ</i>	68.4F 68.4R	SEC. ID. NO. 217 SEC. ID. NO. 218	466	64°C	2061-2079 2506-2526	AJ715409	2
	<i>eae-μ</i>	EAE-FB FV373R	SEC. ID. NO. 219 SEC. ID. NO. 220	665	60°C	1909-1928 2541-2563	AJ705049	Este estudio
	<i>eae-ν</i>	IH1229aF IH1229aR	SEC. ID. NO. 221 SEC. ID. NO. 222	311	60°C	269-289 559-579	AJ705050	2
20	<i>eae-ξ</i>	EAE-FB B49R	SEC. ID. NO. 223 SEC. ID. NO. 224	468	66°C	1909-1928 363-384	AF116899 AJ705051	2
	<i>eae-ο</i>	H2997fF IH2997fR	SEC. ID. NO. 225 SEC. ID. NO. 226	271	60°C	130-153 381-400	AJ584840 AJ584841	Este estudio
25	<i>tir^a</i>	TIR-A TIR-B	SEC. ID. NO. 227 SEC. ID. NO. 228	533	60°C	1-20 514-533	AF022236	Este estudio
	<i>tir-α1</i>	TIR-IF TIR-IR	SEC. ID. NO. 229 SEC. ID. NO. 230	506	64°C	86-102 573-591	AF022236	Este estudio
	<i>tir-β1</i>	TIR-IIF TIR-IIR	SEC. ID. NO. 231 SEC. ID. NO. 232	380	64°C	240-261 598-619	AF453441	Este estudio
30	<i>tir-γ1</i>	TIR-IIIF TIR-IIIR	SEC. ID. NO. 233 SEC. ID. NO. 234	416	64°C	163-185 561-579	AF071034	Este estudio
	<i>tir-γ2</i>	TIR-IVF TIR-IVR	SEC. ID. NO. 235 SEC. ID. NO. 236	201	55°C	391-409 573-591	AF025311	Este estudio
	<i>espA^a</i>	EspA-1 EspA-2	SEC. ID. NO. 237 SEC. ID. NO. 238	237	60°C	40-56 253-276	AF022236	Este estudio
35	<i>espA-α1</i>	EspA-IF EspA-IR	SEC. ID. NO. 239 SEC. ID. NO. 240	247	55°C	84-102 313-330	AF022236	Este estudio
	<i>espA-β1</i>	EspA-IIIF EspA-IIIR	SEC. ID. NO. 241 SEC. ID. NO. 242	304	60°C	83-103 365-386	AF453441	Este estudio
40	<i>espA-β2</i>	EspA-III EspA-IIIR	SEC. ID. NO. 243 SEC. ID. NO. 244	172	55°C	168-185 320-339	AJ225017	Este estudio
	<i>espA-γ1</i>	EspA-1 EspA-IVR	SEC. ID. NO. 245 SEC. ID. NO. 246	333	60°C	40-56 354-372	AF071034	Este estudio
	<i>espB^a</i>	EspB-F EspB-R	SEC. ID. NO. 247 SEC. ID. NO. 248	726	60°C	241-257 947-966	AF022236	Este estudio
45	<i>espB-α1</i>	EspB-F EspB-IR	SEC. ID. NO. 249 SEC. ID. NO. 250	456	65°C	241-257 677-696	AF022236	Este estudio
	<i>espB-β1</i>	EspB-IIIF EspB-IIIR	SEC. ID. NO. 251 SEC. ID. NO. 252	349	62°C	300-319 630-648	AF453441	Este estudio
	<i>espB-γ1</i>	EspB-IIIF EspB-IIIR	SEC. ID. NO. 253 SEC. ID. NO. 254	231	62°C	418-437 630-648	AF071034	Este estudio
50	<i>espD^a</i>	EspD-F EspD-R	SEC. ID. NO. 255 SEC. ID. NO. 256	670	66°C	95-115 746-764	AF022236	Este estudio
	<i>espD-α1</i>	EspD-I-II-F EspD-1R	SEC. ID. NO. 257 SEC. ID. NO. 258	541	62°C	144-164 667-684	AF022236	Este estudio
	<i>espD-β1</i>	EspD-I-II-F EspD-2R	SEC. ID. NO. 259 SEC. ID. NO. 260	575	55°C	144-164 701-718	AF453441	Este estudio
55	<i>espD-γ1</i>	EspD-3-F EspD-R	SEC. ID. NO. 261 SEC. ID. NO. 262	145	60°C	144-164 266-288	AF071034	Este estudio
	Universal	TIR-UP EspB-DOWN	SEC. ID. NO. 263 SEC. ID. NO. 264	11441	55°C	-796 - -773 ^a +94 - +72 ^b	AF022236	Este estudio
60	<i>eae-δ/κ</i>	EAE-FN EAE-DB	SEC. ID. NO. 265 SEC. ID. NO. 266	669	50°C	1891-1913 2542-2559	U66102	Este estudio
	<i>eae-δ/κ</i>	EAE-FN EAE-DB	SEC. ID. NO. 267 SEC. ID. NO. 268	669	50°C	1891-1913 2542-2559	U66102	Este estudio

ES 2 323 911 A1

	<i>eae-β3</i>	42584F EAE-RB2	SEC. ID. NO. 269 SEC. ID. NO. 270	950	52°C	1712-1731 2641-2661	AJ876653 AJ876654	Este estudio
	<i>eae-ε1</i>	EAE-FN EAE-EB	SEC. ID. NO. 271 SEC. ID. NO. 272	929	54°C	1891-1913 2802-2819	AF116899	Este estudio
5	<i>eae-νR/ε2^f</i>	EAE-E2F EAE-E2R	SEC. ID. NO. 273 SEC. ID. NO. 274	378	58°C	2230-2248 2590-2607	AF530554	Este estudio
	<i>eae-ε3</i>	EAE-FN 31923R	SEC. ID. NO. 275 SEC. ID. NO. 276	782	60°C	1892-1913 2655-2673	AJ876649 AJ876650	Este estudio
10	<i>eae-ε4</i>	37159F EAE-RB3	SEC. ID. NO. 277 SEC. ID. NO. 278	951	50°C	1720-1737 2650-2670	AJ876651	Este estudio
	<i>eae-η1/η2^h</i>	ETA-53F ETA-53R	SEC. ID. NO. 279 SEC. ID. NO. 280	628	64°C	1881-1899 2380-2508	AJ308550 AJ879898	Este estudio
	<i>eae-η1^h</i>	ETA-FN ETA-RN	SEC. ID. NO. 281 SEC. ID. NO. 282	410	62°C	1074-1095 1467-1483	AJ308550	Este estudio
15	<i>eae-η2^h</i>	ETA-53199F ETA-53199R	SEC. ID. NO. 283 SEC. ID. NO. 284	502	54°C	2346-2365 2829-2847	AJ879898 AJ879899	Este estudio
	<i>eae-μR/ι2^f</i>	Iota2-F Iota2-R	SEC. ID. NO. 285 SEC. ID. NO. 286	936	58°C	1850-1870 2763-2785	AF530553	Este estudio
20	<i>eae-μB^g</i>	EAE-FN MICRA2	SEC. ID. NO. 287 SEC. ID. NO. 288	710	52°C	1891-1913 2581-2600	AJ705049	Este estudio
	<i>eae-ξB^g</i>	EAE-FN B49R	SEC. ID. NO. 289 SEC. ID. NO. 290	701		1891-1913 2571-2591	AJ705051	Este estudio
	<i>eae-ξB^g</i>	EAE-FN B49RN	SEC. ID. NO. 291 SEC. ID. NO. 292	739	64°C	1891-1913 2604-2629	AJ705051	Este estudio
25	<i>eae-π</i>	1015F 1015R	SEC. ID. NO. 293 SEC. ID. NO. 294	479	55°C	93-111 554-571	AJ705052	Este estudio
	<i>eae-ρ</i>	4794F 4794R	SEC. ID. NO. 295 SEC. ID. NO. 296	300	66°C	2141-2163 2421-2440	AJ748082 AJ748083	Este estudio
	<i>eae-σ</i>	Sigma-F Sigma-R	SEC. ID. NO. 297 SEC. ID. NO. 298	649	52°C	2125-2144 2756-2773	AJ781125	Este estudio
30	<i>tir-α1</i>	TIR-ALFA-F 1 TIR-IR	SEC. ID. NO. 299 SEC. ID. NO. 300		64°C		AF022236	Este estudio
	<i>tir-β1</i>	TIR-IIF TIR-B1-R	SEC. ID. NO. 301 SEC. ID. NO. 302		64°C		AF453441	Este estudio
	<i>tir-β3</i>	TIRB3F TIRB3R	SEC. ID. NO. 303 SEC. ID. NO. 304		50°C			Este estudio
35	<i>tir-β3</i>	TIRB3F TIRB3RB	SEC. ID. NO. 305 SEC. ID. NO. 306		50°C			Este estudio
	<i>tir-γ1</i>	TIR-IIIF TIRO157-R	SEC. ID. NO. 307 SEC. ID. NO. 308		64°C		AF071034	Este estudio
40	<i>tir-γ2</i>	TIR-O111-F TIR-IVR	SEC. ID. NO. 309 SEC. ID. NO. 310		64°C		AF025311	Este estudio
	<i>tir-ο</i>	TIROMICROMF TIRO8- OMICROM-R	SEC. ID. NO. 311 SEC. ID. NO. 312		64°C			Este estudio
	<i>tir-ρ</i>	TIR-RHO-F TIR-RHO-R	SEC. ID. NO. 313 SEC. ID. NO. 314		50-52°C			Este estudio
45	<i>tir-νB</i>	TIRO8-F TIRO8- OMICROM-R	SEC. ID. NO. 315 SEC. ID. NO. 316		55°C			Este estudio
50	<i>espA-β1</i>	EspA-IIF ESPA-B1-R1	SEC. ID. NO. 317 SEC. ID. NO. 318		60°C		AF453441	Este estudio
	<i>espA-β2</i>	EspA-III ESPA-B2-R2	SEC. ID. NO. 319 SEC. ID. NO. 320		54°C		AJ225017	Este estudio
	<i>espA-β3</i>	EspA-IIF ESPA-B3-R	SEC. ID. NO. 321 SEC. ID. NO. 322		58°C			Este estudio
	<i>espA-γ1</i>	ESPA-C1-F ESPA-C1-R	SEC. ID. NO. 323 SEC. ID. NO. 324		60°C		AF071034	Este estudio
55	<i>espA-μB</i>	ESPA-B2-F ESPA-MICRA-R	SEC. ID. NO. 325 SEC. ID. NO. 326		58°C			Este estudio
	<i>espA-ε1</i>	EspA-IIF ESPA-E1-R	SEC. ID. NO. 327 SEC. ID. NO. 328		60°C			Este estudio
	<i>espA-ο</i>	ESPA-ORHO-F ESPA-OR	SEC. ID. NO. 329 SEC. ID. NO. 330		56°C			Este estudio
60	<i>espA-ρ</i>	ESPA-ORHO-F ESPA-RHO-R	SEC. ID. NO. 331 SEC. ID. NO. 332		64°C			Este estudio
	<i>espA-</i>	ESPA-O55F	SEC. ID. NO. 333		52°C			Este estudio

65

ES 2 323 911 A1

γ 2/θ	ESPA-O55R	SEC. ID. NO. 334									
<i>espB</i> -α1	ESPB-AF ESPB-AO84R	SEC. ID. NO. 335 SEC. ID. NO. 336								AF022236	Este estudio
<i>espB</i> -γ2	ESPB-AO841111-F ESPB-B1O111-R	SEC. ID. NO. 337 SEC. ID. NO. 338					60°C				Este estudio
<i>espB</i> -o	ESPB-OF ESPB-OR	SEC. ID. NO. 339 SEC. ID. NO. 340					62°C				Este estudio
<i>espD</i> -β2	ESPD-B2MF ESPD-B2R	SEC. ID. NO. 341 SEC. ID. NO. 342					58-60°C				Este estudio
<i>espD</i> - γ 2/θ	ESPD-ABC2F ESPD-CR2	SEC. ID. NO. 343 SEC. ID. NO. 344					64°C				Este estudio
<i>espD</i> -μB	ESPD-B2MF ESPD-MR	SEC. ID. NO. 345 SEC. ID. NO. 346					58-60°C				Este estudio
<i>espD</i> -o	ESPD-O8OF ESPD-OR	SEC. ID. NO. 347 SEC. ID. NO. 348					52°C				Este estudio
<i>espD</i> -ρ	ESPD-O8OF ESPD-O8R	SEC. ID. NO. 349 SEC. ID. NO. 350					52°C				Este estudio

^aCebadores universales usados para detectar todos los tipos de *eae*, *espA*, *espB*, and *espD* genes.

TABLA 3

Serotipos y genes de virulencia de las estirpes caracterizadas por los métodos de la presente invención. (Resultados de las amplificaciones por PCR con oligonucleótidos específicos para el genotipado de estirpes de *E. coli* diarreagénicos)

Cepa Control	Serotipo	Origen	Resultados PCR obtenidos en este estudio							Grupo Patogénico <i>E. coli</i>	Ref.
			<i>eae</i> tipo	<i>tir</i> tipo	<i>espA</i> tipo	<i>espB</i> tipo	<i>espD</i> tipo	<i>stx</i> tipo	<i>bfpA</i> gen		
EPEC-8 (Aberdeen-1064)	O55:H6	Humano	α1	α1	α1	α1	α1	-	+	Típico EPEC	Este estudio
EPEC-2348III	O127:H6	Humano	α1	α1	α1	α1	α1	-	+	Típico EPEC	27
IH3979A	O132:H34	Humano	α2	γ1	α1	α1	α1	-	-	EPEC atípico	Este estudio
IH2498A	O125:H6	Humano	α2	γ1	α1	α1	α1	-	-	EPEC atípico	2
EPEC-4 (F41)	O26:H-	Humano	β1	β1	β1	β1	β1	-	-	EPEC atípico	Este estudio
FV4805	O177:H11	Bovino	β1	β1	β1	β1	β1	-	-	EPEC atípico	Este estudio
EPEC-359 (FV359)	O119:H6	Humano	β2	α1	β2	α1	NT	-	+	Típico EPEC	2
IH2664B	O113:H6	Humano	β2	α1	β2	α1	NT	-	-	EPEC atípico	Este estudio
O157-156	O157:H7	Humano	γ1	γ1	γ1	γ1	γ1	stx1 stx2	-	STEC	Este estudio
EDL933	O157:H7	Humano	γ1	γ1	γ1	γ1	γ1	stx1 stx2	-	STEC	27
VTB-351	O111:H-	Bovino	γ2/θ	γ2/θ	NT	NT	NT	stx1	-	STEC	Este estudio
TW07926	O111:H8	Humano	γ2/θ	γ2/θ	NT	NT	NT	stx1 stx2	-	STEC	28

ES 2 323 911 A1

	EPEC-9 (BP1266 5)	O86:H34	Humano	δ/κ	$\alpha 1$	$\beta 2$	NT	NT	-	+	Típico EPEC	Este estudio
5	6044-95	O118:H5	Humano	δ/κ	$\alpha 1$	$\beta 2$	NT	NT	-	-	EPEC atípico	27
	VTB286	O103:H2	Bovino	ϵ	$\beta 1$	NT	$\beta 1$	$\beta 1$	stx1	-	STEC	2
	IH3726A	O157:H16	Human	ϵ	$\beta 1$	NT	$\beta 1$	$\beta 1$	-	-	EPEC atípico	Este estudio
10	VTO-50	O156:H-	Ovino	ζ	$\alpha 1$	NT	$\alpha 1$	NT	stx1	-	STEC	2
	IH3614A	O156:H-	Humano	ζ	$\alpha 1$	NT	$\alpha 1$	NT	-	-	EPEC atípico	Este estudio
15	CF11201 (FV3671)	O125:H-	Humano	η	$\alpha 1$	NT	$\alpha 1$	$\alpha 1$	-	+	Típico EPEC	27
	7476/96 (FV3676)	O145:H4	Humano	ι	$\alpha 1$	$\alpha 1$	$\alpha 1$	$\alpha 1$	-	-	EPEC atípico	27
20	68-4	O34:H-	Humano	λ	$\gamma 1$	$\gamma 1$	$\gamma 1$	$\gamma 1$	-	-	EPEC atípico	2
	FV380	O55:H-	Humano	μ	$\alpha 1$	NT	$\alpha 1$	NT	-	+	Típico EPEC	Este estudio
	IH1229a	O10:H-	Humano	ν	NT	$\gamma 1$	$\gamma 1$	$\gamma 1$	-	-	EPEC atípico	2
25	B49a	O80:H-	Bovino	ξ	$\beta 1$	$\beta 1$	$\beta 1$	$\beta 1$	stx1	-	STEC	2
	IH2997f	O129:H-	Humano	\omicron	NT	NT	NT	NT	-	-	EPEC atípico	Este estudio

30

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Ejemplo de dos microarrays conteniendo sondas específicas de 16 variantes del gen *eae*, 4 del gen *tir*, 4 de *espA*, 3 de *espB* y 3 de *espD*. Resultados obtenidos tras la hibridación con los fragmentos amplificados por PCR de las estirpes tipo de las variantes *eae- λ* y *eae- μ* .

35

Figura 2. Microarray hibridado con los productos de una PCR múltiple (multiplex PCR) para los cinco genes de la isla LEE de la estirpe tipo para *eae- η* (FV3671).

40

Figura 3. Microarray hibridado con el producto de una PCR de largo alcance (LR-PCR) que comprende los 5 genes de la isla LEE de la estirpe FV3671.

Figura 4. Microarray hibridado con el ADN cromosómico total de la estirpe tipo de *eae- ι* (FV3676).

45

Figura 5. Microarray hibridado con el ADN genómico amplificado a partir de 10 pg del ADN de la cepa tipo para *eae- ι* .

Ejemplos de realización de la invención

50

Desarrollo de un biochip para la detección e identificación de variantes de intiminas de ECVT

Se diseñó y se construyó un biochip con una o más sondas para cada una de las variantes de los genes de intiminas conocidas hasta el momento. El biochip contenía sondas específicas para las variantes *eae- $\alpha 1$* , *$\alpha 2$* , *$\beta 1$* , *$\beta 2$* , *$\gamma 1$* , *$\gamma 2$* , *δ* , *ϵ* , *ζ* , *η* , *ι* , *λ* , *μ* , *ν* , *ξ* , así como sondas universales para el gen *eae* y otras universales y específicas para los genes *espA*, *espB*, *espD* y *tir* (tabla 2). Las sondas son oligonucleótidos sintéticos con una amina alifática (6 C) en 5' seguida de un oligo-dT (10T) y de la secuencia específica (entre 15 y 30 nucleótidos). Las sondas se imprimieron en una concentración de 60 microM en portas de vidrio activados con grupos epoxy utilizando robots de impresión de microarrays (micromatrices) comerciales. Se imprimieron al menos dos micromatrices por porta para poder realizar al menos dos ensayos por porta. Se procedió como sigue:

60

Se extrajo el ADN cromosómico de cada una de las estirpes tipo de ECVT recibidas de la colección del Centro Nacional de Referencia de *E. coli.*: FV3480; FV3481; FV3482; FV3489; FV3490; FV3491; FV3492; FV3493; FV3514b; FV3515; EPEC8; IH2498a; EPEC4; FV359; O157-156; VTB351; EPEC9; VTB286; VTO-50; FV3671; FV3676; 68-4; FV380; IH1229a; B49a; IH1301a; IH2997f.

65

ES 2 323 911 A1

Se partió de un cultivo de 5 ml en medio LB donde inoculó la noche anterior la cepa correspondiente a partir del medio de transporte en el que se recibió. El cultivo creció a 37°C 12 h y con agitación de 200 rpm. Utilización del kit de extracción de DNA, GNOME de Q-BIOgene, número de catálogo 2010-400.

5 Ejemplo 1

Amplificación y marcaje por PCR de los genes de la isla LEE. Hibridación en un microarray de oligonucleótidos

- 10 a. Se amplificó por PCR un fragmento de cada gen utilizando un oligonucleótido universal y otro específico de cada estirpe. Cada fragmento se marcó fluorescentemente mediante la incorporación de Cy3- o Cy5-
15 dUTP en la misma reacción de amplificación. Dicha amplificación se llevó a cabo como sigue: 1 ug de ADN molde, 3 mM de MgCl₂, 100 μM de dATP, dCTP, y dGTP, 50 μM de dTTP, 50 μM de Cy5-dUTP (Amersham Biosciences), 200 μM de cada par de primer iniciador (*EAE-1* como directo, y *EAE-A*, *EAE-A2R*, *EAE-D3R*, *EAE-ep2R*, *EAE-C1*, *EAE-C2*, *EAE-et2R*, *LP-7*, *EAE-L2R*, *FV373-R*, *EAE-N2R*, *IH2997f-R*, *EAE-RB*, *EAE-Z2R* como reverse para *eae-α1*, $\alpha 2$, δ , $\gamma 1$, ϵ , $\gamma 2$, η , ι , λ , μ , ν , θ , ξ y ζ respectivamente; cebador directo *EAE-F* y reversos *EAE-B8R* y *EAE-B5R* para *eae-β1*, y $\beta 2$ respectivamente; pares de cebadores *TIR-I1 F/TIR-I1 R*, *TIR-II1 F/TIR-II1 R*, *TIR-III1 F/TIR-III1 R*, y *TIR-IV 1 F/TIR-IV 1R* para *tir-α1*, $\beta 1$, $\gamma 1$, y $\gamma 2$ respectivamente; *ESPA-1* como directo y *ESPA-I1R*, *ESPA-II1R*, *ESPA-III1R*, y *ESPA-IV1R* como reversos para *espA-α1*, $\beta 1$, $\beta 2$, y $\gamma 1$ respectivamente; *ESPB-F* como directo y *ESPB-I1 R*, *ESPB-II1 R*, y *ESPB-III1R* como reversos para *espB-α1*, $\beta 1$, y $\gamma 1$ respectivamente; y *ESPD-4F* como directo y *ESPD-I 1R*, *ESPD-II1 R*, y *ESPD-III 1R* como reversos para *espD-α1*, $\beta 1$, y $\gamma 1$ respectivamente), y 1 unidad de ADN polimerasa *Taq Platinum* en su tampón de reacción (Invitrogen). El programa utilizado en el termociclador es el siguiente para todos los casos excepto para *eae beta1* y *eae beta2*: 95°C-5 min; (95°C-20 s; 60°C-30 s; 68°C-1 min 30 s)10X; (95°C-20 s; 58°C-30 s; 68°C-1 min 30 s +5 s/ciclo) 30X; 68°C-10 min; Mantenido a 4°C. Para *eae beta1* el programa utilizado es el siguiente: 95°C-5 min; (95°C-20 s; 55°C-30 s; 68°C-1 min 30 s)10X; (95°C-20 s; 53°C-30 s; 68°C-1 min 30 s +5 s/ciclo) 25X; 68°C -10 min; Mantenido a 4°C. Para *eae beta2* el programa utilizado es el siguiente: 95°C-5 min; (95°C-30 s; 55°C-30 s; 72°C-1 min 30 s)35X; 72°C-10 min; Mantenido a 4°C.
- 20 b. El fragmento de ADN amplificado se separó del nucleótido no incorporado mediante una purificación en columna comercial. La cantidad y calidad del marcaje se examinó por métodos espectrométricos.
- 25 c. Se mezcló en un tampón de hibridación, se desnaturalizó por calentamiento a 95°C durante 5 min y se incubó con los biochips previamente lavados tal y como indica el proveedor (TeleChem international). Se incubó durante 12 h a 55°C bajo un cubre y dentro de una cámara de hibridación herméticamente cerrada a su vez sumergida en un baño de agua a la temperatura indicada.
- 30 d. Se lavó en 2X SSC + SDS 0.1% durante 5 minutos, se secó por centrifugación y se escaneó en un escáner comercial equipado con dos láser para excitar el fluorocromo utilizado en cada ensayo. La imagen se analizó y la intensidad de los puntos fluorescentes se cuantificó con software comercial.

45 El resultado obtenido con las cepas tipo de las variedades *eae-mu* (FV380) y λ (68-4) se muestra en la figura 1. Los fragmentos amplificados y marcados de cada estirpe tipo sólo dan una señal fluorescente con las sondas diseñadas para ellas.

50 (Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

ES 2 323 911 A1

Ejemplo 2

Amplificación y marcaje de los genes eae, tir, espA, espB y espD de la estirpe FV3671 mediante multiplex PCR. Hibridación con un microarray de oligonucleótidos

Varios pares de oligonucleótidos fueron empleados para amplificar y marcar simultáneamente 2 o más genes de la isla LEE (fig 2). Se realizaron PCRs multiplex con los genes *eae*, *tir*, *espA*, *espB* y *espD*. Para ello se utilizaron las cepas FV3671 y

ADN (cepa)	gen	oligoF	TmF	oligoR	TmR	T* PCR	Tamaño
FV3671	<i>eae-eta</i>	<i>EAE F</i>	58	<i>EAEet-2R</i>	63	60/58	676 bp
FV3671	<i>tir-alpha1</i>	<i>TIR A</i>	58	<i>TIR B</i>	60	60/58	630 bp
FV3671	<i>espA-beta1</i>	<i>espA1</i>	52	<i>espAII-1R</i>	56	55/53	687 bp
FV3671	<i>espB-alpha1</i>	<i>espB-F</i>	52	<i>espBI-1R</i>	62	55	687 bp
FV3671	<i>espD-alpha1</i>	<i>espD-4F</i>	60	<i>espDI-1R</i>	60	60/58	633 bp
FV3676	<i>eae-iota</i>	<i>EAE F</i>	58	LP7	60	60/58	243 bp
FV3676	<i>tir-alpha1</i>	<i>TIR A</i>	58	<i>TIR B</i>	60	60/58	243 bp
FV3676	<i>espA-alfa1</i>	<i>espA1</i>	52	<i>espAI-1R</i>	56	60/58	647 bp
FV3676	<i>espB-alpha1</i>	<i>espB-F</i>	52	<i>espBI-1R</i>	62	60/58	414 bp
FV3676	<i>espD-alpha1</i>	<i>espD-4F</i>	60	<i>espDI-1R</i>	60	60/58	650 bp

FV3676 y los oligonucleótidos correspondientes que se detallan a continuación.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 323 911 A1

En la reacción se incorporaron nucleótidos marcados con fluorocromo según la mezcla que se detalla a continuación:

Reactivos	Cantidad	Concentración final
10x buffer	5 μ l	1x
MgCl ₂ (50mM)	3 μ l	3 mM
dACGP's (10mM)	0,5 μ l	dACGP's (10 μ M)
dTTP (1mM)	2,5 μ l	dTTP (50 μ M)
Cy5-dUTP	2,5 μ l	
oligoF gen <i>eae</i> (10mM)	1,0 μ l	200 μ M
oligoR gen <i>eae</i> (10mM)	1,0 μ l	200 μ M
oligoF gen <i>tir</i> (10mM)	1,0 μ l	200 μ M
oligoR gen <i>tir</i> (10mM)	1,0 μ l	200 μ M
oligoF gen <i>espA</i> (10mM)	1,0 μ l	200 μ M
oligoR gen <i>espA</i> (10mM)	1,0 μ l	200 μ M
oligoF gen <i>espB</i> (10mM)	1,0 μ l	200 μ M
oligoR gen <i>espB</i> (10mM)	1,0 μ l	200 μ M
oligoF gen <i>espD</i> (10mM)	1,0 μ l	200 μ M
oligoR gen <i>eae</i> (10mM)	1,0 μ l	200 μ M
Taq Platinum	0,20 μ l	0,02 U/ μ l
ADN	1 μ l	
Agua	25,3 μ l	

- e. El programa utilizado en el termociclador es el siguiente para todos los casos excepto para *eae* beta1 y *eae* beta2: 95°C - 5 min; (95°C - 20 s; 50°C - 30 s; 68°C - 1 min)IOX; (95°C - 20 s; 48°C - 30 s; 68°C - 1 min +5 s/ciclo) 25X; 68°C - 10 min; Mantenido a 4°C.

Los fragmentos de ADN amplificados se separaron del nucleótido no incorporado mediante una purificación en columna comercial. La cantidad y calidad del marcaje se examinó por métodos espectrométricos.

- f. Se mezclaron en un tampón de hibridación, se desnaturalizaron por calentamiento a 95°C durante 5 min. y se incubaron con los biochips previamente lavados tal y como indica el proveedor (TeleChem international). Se incubaron durante 12 h a 55°C bajo un cubre y dentro de una cámara de hibridación herméticamente cerrada a su vez sumergida en un baño de agua a la temperatura indicada.
- g. Se lavó en 2X SSC + SDS 0.1% durante 5 min., se secó por centrifugación y se escaneó en un escáner comercial equipado con dos láser para excitar el fluorocromo utilizado en cada ensayo. La imagen se analizó y la intensidad de los puntos fluorescentes se cuantificó con software comercial. El resultado obtenido con la cepa FV3671 (*eae- η*) se muestra en la figura 2. Además de las sondas universales, dan señal positiva las sondas específicas diseñadas para cada gen: *eae- η* , *tir- α 1*, *espA- β 1*, *espB- α 1*, *espD- α 1*.

ES 2 323 911 A1

Ejemplo 3

Amplificación y marcaje de varios genes de la isla LEE mediante PCR de largo alcance (LR-PCR)

5 Aquellos genes que aparecen agrupados en el genoma (como la isla LEE) se pueden amplificar y marcar mediante una sola reacción de amplificación utilizando oligonucleótidos universales a ambos lados de la agrupación génica (cluster).

10 Se diseñaron los oligos *TIR-UP* y *espB-DOWN* para amplificar por PCR de largo alcance la isla de patogenicidad LEE completa. La enzima utilizada para la amplificación ha sido Expand-Long Template de la casa Roche con N° de catálogo 1 681 842. Según la siguiente mezcla:

Reactivos	Cantidad	Concentración final
10x buffer 2	5 µl	1x
dACGP's (10mM)	2,5 µl	dACGP's (500 µM)
dTTP (1mM)	12,5 µl	dTTP (250 µM)
Cy5-dUTP	2,5 µl	
oligo <i>TIR-Up</i> (10mM)	1,5 µl	300 µM
oligo <i>espB-Down</i> (10mM)	1,5 µl	300 µM
Taq Expand Long Template	0,75 µl	0,075 U/µl
ADN	2 µl	
Agua	21,75 µl	

40 El termociclador empleado fue un GeneAmp PCR system 2700 de Applied Biosystems. El programa utilizado fue el siguiente: 95°C-5 min; (95°C-20 s; 55°C-30 s; 68°C-10 min)15X; (95°C-20 s; 55°C-30 s; 68°C-10 min + 20 s/ciclo) 30X; 68°C 10 min; Hold 4°C.

- 45 h. El fragmento de ADN amplificado se separó del nucleótido no incorporado mediante una purificación en columna comercial. La cantidad y calidad del marcaje se examinó por métodos espectrométricos.
- i. Se mezcló en un tampón de hibridación, se desnaturalizó por calentamiento a 95°C durante 5 min. y se incubó con los biochips previamente lavados tal y como indica el proveedor (TeleChem international). Se incubó durante 12 h a 55°C bajo un cubre y dentro de una cámara de hibridación herméticamente cerrada a su vez sumergida en un baño de agua a la temperatura indicada.
- 50 j. Se lavó en 2X SSC + SDS 0.1% durante 5 minutos, se secó por centrifugación y se escaneó en un escáner comercial equipado con dos láser para excitar el fluorocromo utilizado en cada ensayo. La imagen se analizó y la intensidad de los puntos fluorescentes se cuantificó con software comercial.

55 El resultado obtenido con la cepa FV3671 (*ae-η*) se muestra en la figura 3. Además de las sondas universales, dan señal positiva las sondas específicas diseñadas para cada gen: *ae-η*, *tir-α1*, *espA-β1*, *espB-α1*, *espD-α1*.

Ejemplo 4

Fragmentación y marcaje del ADN cromosómico total e hibridación con un microarray de oligonucleótidos específicos

65 Un volumen de 60 µl de TE 10 mM pH 8 con 100 ng/ml de ADN de cada estirpe se fragmentó por sonicación en un eppendorf de 200 µl con el sonicador MISONIX modelo XL2010 utilizando el accesorio "cup horn" durante 10 s a potencia 10. Así, se consiguen fragmentos entre 850 bp y 4000 bp.

ES 2 323 911 A1

Dicho ADN se marcó con Cy3- o Cy5-dUTP y la ADN polimerasa Klenow usando oligonucleótidos hexámeros de secuencia aleatoria como cebadores. La reacción fue como sigue: En un eppendorf de 1,5 ml se añaden:

- 20 μ l de ADN sonificado (2 μ g)
- 11 μ l de agua
- 5 μ l de buffer ECOPOL
- 5 μ l de cebadores random (500 ng/ μ l)

Esta mezcla se lleva a 95°C durante 5 min y luego se coloca en hielo.

Se añaden a la mezcla 5 μ l de 10x dNTP's mix manteniéndolo todo en hielo.

10x dNTP's mix

1,2 mM de dATP, dCTP, dGTP

0,6 mM dTTP

10 mM Tris 8.0 1 mM EDTA

Se añaden 3 μ l de Cy5-dUTP (25 nmol), 1 μ l de enzima klenow biolabs (50 U/ μ l).

Se incubó a 37°C de 1 a 2 horas y después se para la reacción con 5 μ l de EDTA 0,5 M pH 8. Se purificaron de los fragmentos marcados, se mezclaron en un tampón de hibridación, se desnaturalizó por calentamiento a 95°C durante 5 min y se incubó con los biochips previamente lavados tal y como indica el proveedor (TeleChem international). Se incubó durante 12 h a 55°C bajo un cubre y dentro de una cámara de hibridación herméticamente cerrada a su vez sumergida en un baño de agua a la temperatura indicada. Se lavó en 2X SSC + SDS 0.1% durante 5 minutos, se secó por centrifugación y se escaneó en un escáner comercial equipado con dos láser para excitar el fluorocromo utilizado en cada ensayo. La imagen se analizó y la intensidad de los puntos fluorescentes se cuantificó con software comercial.

En la figura 4 se muestra el resultado obtenido con la estirpe FV3676 (*eae-t*) Se detectan señales específicas para cada estirpe en los diferentes genes testados. Si bien la señal no es tan intensa como cuando se emplea un fragmento de PCR marcado, este método permite el análisis de todo el genoma frente a un gran número de sondas.

Ejemplo 5

Amplificación y marcaje de muestras de ADN total e hibridación con un microarray de oligonucleótidos

A veces la cantidad de ADN de las muestras a analizar es muy baja y limita la realización de los ensayos. En estos casos se procede a la amplificación de todo el ADN mediante la técnica de "Desplazamiento Múltiple" con enzimas que replican en forma de círculo rodante, como la ADN polimerasa del bacteriófago Phi29. Existen kits comerciales como el denominado "Genomiphi" de la casa Amersham Biosciences, que permite la obtención de microgramos de ADN total a partir de picogramos.

A partir de muestras de 100 pg de la estirpe FV3676 (correspondiente a la variedad *eae-t*), se amplificó el ADN usando el kit Genomiphi. Hasta 2 μ g de ADN total se fragmentaron por sonicación (fragmentos de 500-2500 pb), se marcaron fluorescentemente con Cy-5 y se hibridaron con un biochip en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Tras el lavado y escaneado, el resultado se muestra en la figura 5.

Ejemplo 6

Detección de las variantes genéticas de la isla LEE mediante amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos

Diferentes variantes del gen *eae* fueron determinadas mediante amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos de entre los que aparecen en la tabla 1. En la tabla 3 se muestra el resultado del tipado de variantes de intiminas mediante PCR.

Referencias Bibliográficas

1. **Blanco JE, Blanco M, Alonso MP, Mora A, Dahbi G, Coira MA, Blanco J.** Serotypes, virulence genes and intimin types of shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: Prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. *J Clin Microbiol* 2004; 42:311-319.
2. **Blanco M, Blanco JE, Mora A, Dahbi G, Alonso MP, González EA, et al.** Serotypes, virulence genes and intimin types of shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae-ξ*). *J Clin Microbiol* 2004; 42:645-651.
3. **Nataro JP, Kaper JB.** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:142-201.
4. **Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Mora A, Gonzalez EA, Bernardez MI, Alonso MP, Coira A, Rodriguez A, Rey J, Alonso JM, Usera MA.** Verotoxin-producing *Escherichia coli* in Spain: prevalence, serotypes, and virulence genes of O157:H7 and non-O157 VTEC in ruminants, raw beef products, and humans. *Exp Biol Med* (Maywood). 2003; 228:345-51.
5. **Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL.** Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2004; 2:123-40. Review.
6. **Paton JC, Paton AW.** Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11:450-479.
7. **Trabulsi LR, Keller R, Gomes TAT.** Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:508-513.
8. **Paton AW, Manning PA, Woodrow MC, Paton JC.** Translocated intimin receptors (Tir) of shiga-toxigenic *Escherichia coli* isolates belonging to serogroups O26, O111, and O157 react with sera from patients with hemolytic-uremic syndrome and exhibit market sequence heterogeneity. *Infect Immun* 1998; 66:5580-5586.
9. **Prats G, Frias C, Margall N, Llovet T, Gaztelurrutia L, Elcuaz R, Canut A, Bartolome RM, Torroba L, Dorronsoro I, Coll P, Mirellis B.** [Hemorrhagic colitis caused by verotoxigenic *Escherichia coli*. Presentation of 9 cases. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1996 Jan; 14(1):7-15. Erratum in: *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1996; 14(5):307.
10. **Chizhikov V, Rasooly A, Chumakov K, Levy DD.** Microarray analysis of microbial virulence factors. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67:3258-3263.
11. **Dobrindt U, Agerer F, Michaelis K, Janka A, Buchrieser C, Samuelson M, et al.** Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays. *J Bacteriol* 2003; 185:1831-40.
12. **Wu CF, Valdes JJ, Bentley WE, Sekowski JW.** DNA microarray for discrimination between pathogenic O157:H7 EDL933 and non-pathogenic *Escherichia coli* strains. *Biosens Bioelectron* 2003; 19:1-8.
13. **Bekal S, Brousseau R, Masson L, Prefontaine G, Fairbrother J, Harel J.** Rapid identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays. *J Clin Microbiol* 2003; 41:2113-2125.
14. **Blanco M, Blanco JE, Mora A, Rey J, Alonso JM, Hermoso M, et al.** Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. *J Clin Microbiol* 2003; 41:1351-1365.
15. **Muniesa M, de Simon M, Prats G, Ferrer D, Panella H, Jofre J.** Shiga toxin 2-converting bacteriophages associated with clonal variability in *Escherichia coli* O157:H7 strains of human origin isolated from a single outbreak. *Infect Immun.* 2003; 71:4554-62.
16. **Bertin Y, Boukhors K, Pradel N, Livrelli V, Martin C.** Stx2 subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle in France: detection of a new Stx2 subtype and correlation with additional virulence factors. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:3060-5.
17. **Burk C, Dietrich R, Acar G, Moravek M, Bulte M, Martlbauer E.** Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* ONT:H19 of bovine origin. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:2106-12.
18. **Chen S, Zhao S, McDermott PF, Schroeder CM, White DG, Meng J.** A DNA microarray for identification of virulence and antimicrobial resistance genes in *Salmonella serovars* and *Escherichia coli*. *Mol Cel Probes* 2005;19:195-201.
19. **Leung PH, Peiris JS, Ng WW, Robins-Browne RM, Bettelheim KA, Yam WC.** A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69:7549-53.

20. **Muniesa M, Moce-Llivina L, Katayama H, Jofre J.** Bacterial host strains that support replication of somatic coliphages. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2003; 83:305-15.
21. **Blanco J, Blanco M, Gonzalez EA, Blanco JE, Alonso MP, Garabal JI, Jansen WH.** Serotypes and colonization factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated in various countries. *Eur J Epidemiol.* 1993;9:489-96.
22. **Gonzalez EA, Blanco J, Garabal I, Blanco M.** Biotypes, antibiotic resistance and plasmids coding for CFA/I and STa in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains of serotype O153:H45 isolated in Spain. *J Med Microbiol.* 1991; 34:89-95.
23. **Chandler DP, Brown J, Call DR, Wunschel S, Grate JW, Holman DA, Olson L, Stottlemeyer MS, Bruckner-Lea CJ.** Automated immunomagnetic separation and microarray detection of *E. coli* O157:H7 from poultry carcass rinse. *Int J Food Microbiol.* 2001;70:143.
24. **March SB, Ratnam S.** (1986) Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J Clin Microbiol.* 23:869-72.
25. **Sanderson MW, Gay JM, Hancock DD, Gay CC, Fox LK, Besser TE.** (1995) Sensitivity of bacteriologic culture for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *J Clin Microbiol.* 33:2616-9.
26. **Gunzburg ST, Tornieporth NG, Riley LW.** Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *J Clin Microbiol* 1995; 33:1375-1377.
27. **Zhang WL, Köhler B, Oswald E, Beutin L, Karch H, Morabito S, et al.** Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol* 2002; 40:4486-4492.
28. **Tarr CL, Whittam S.** Molecular evolution of the intimin gene in O111 clones of pathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2002; 184:479-487.
29. **Friedrich AW, Borell J, Bielaszewska M, Fruth A, Tschape H, Karch H.** Shiga toxin lc-producing *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic characterization and association with human disease. *J Clin Microbiol.* 2003 Jun; 41(6):2448-53.
30. **Gannon VP, D'Souza S, Graham T, King RK.** Specific identification of *Escherichia coli* O157:H7 using a multiplex PCR assay. *Adv Exp Med Biol.* 1997; 412:81-2.
31. **Koch C, Hertwig S, Lurz R, Appel B, Beutin L.** Isolation of a lysogenic bacteriophage carrying the stx(1 (OX3)) gene, which is closely associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from sheep and humans. *J Clin Microbiol.* 2001 Nov; 39(11):3992-8.
32. **Wang G, Clark CG, Rodgers FG.** Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2002 Oct; 40(10):3613-9.
33. **Cebula TA, Payne WL, Feng P.** Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 1995 Jan;33(1):248- 50. Erratum in: *J Clin Microbiol* 1995 Apr; 33(4):1048.
34. **Taylor DE, Rooker M, Keelan M, Ng LK, Martin I, Perna NT, Burland NT, Blattner FR.** Genomic variability of O islands encoding tellurite resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates. *J Bacteriol.* 2002 Sep; 184(17):4690-8.
35. **Paton AW, Paton JC.** Reactivity of convalescent-phase hemolytic-uremic syndrome patient sera with the megaplasmid-encoded TagA protein of Shiga toxigenic *Escherichia coli* O157. *J Clin Microbiol.* 2002 Apr; 40(4):1395-9.
36. **Brunder W, Khan AS, Hacker J, Karch H.** Novel type of fimbriae encoded by the large plasmid of sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H(-). *Infect Immun.* 2001 Jul; 69(7):4447-57.
37. **Paton AW, Paton JC.** Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for stx1, stx2, eae, ehxA, and saa. *J Clin Microbiol.* 2002 Jan; 40(1):271-4.
38. **Desmarchelier PM, Bilge SS, Fegan N, Mills L, Vary JC Jr, Tan PI.** A PCR specific for *Escherichia coli* O157 based on the rfb locus encoding O157 lipopolysaccharide. *J Clin Microbiol.* 1998 Jun;36(6):1801-4.
39. **Srimanote P, Paton AW, Paton JC.** Characterization of a novel type IV pilus locus encoded on the large plasmid of locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect Immun.* 2002 Jun; 70(6):3094-100.

ES 2 323 911 A1

40. **Brunder W, Schmidt H, Karch H, KatP**, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology*. 1996 Nov; 142 (Pt 11):3305-15.

5 41. **Friedrich AW, Borell J, Bielaszewska M, Fruth A, Tschape H, Karch H**. Shiga toxin 1 c-producing *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic characterization and association with human disease. *J Clin Microbiol*. 2003 Jun;41(6):2448-53.

10 42. **Gannon VP, D'Souza S, Graham T, King RK, Rahn K, Read S**. Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol*. 1997 Mar; 35(3):656-62.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Método para la detección e identificación de diferentes estirpes de *Escherichia coli* diarreagénicas **caracterizado** porque comprende la determinación simultánea de los genes de la isla de patogenicidad LEE *eae*, *espA*, *espB*, *espD*, *tir*, genes *stx1*, *stx2*, *bfp*, *elt*, *est*, *inv* mediante los siguientes pasos:

a) Extracción de ADN de una muestra

10 b) Amplificación del ADN extraído en la etapa a), con los cebadores identificados con las secuencias SEQ ID NO: 187-350

c) Hibridación de los fragmentos de ADN amplificados en la etapa b) con las sondas identificadas con las secuencias SEQ ID NO: 1-186

15 d) Interpretación de los resultados.

2. Método según la reivindicación 1, donde la amplificación de la etapa b) se realiza mediante PCR.

20 3. Método según la reivindicación 1, donde las sondas identificadas con las secuencias SEQ ID NO: 1-186 están modificadas en el extremo 5' amino con una cola de 10 timidinas.

25 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde las sondas están inmovilizadas en un soporte sólido en formato bidimensional, tridimensional, microesferas, nanoesferas, gel, o coloide.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde después de la etapa b) de amplificación y previo a la etapa c) de hibridación hay una etapa de marcaje de los fragmentos de ADN amplificados.

30 6. Método según la reivindicación 5 donde el marcaje de los fragmentos de ADN amplificados se realiza por medio de métodos enzimáticos o químicos.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la interpretación de los resultados se realiza mediante métodos espectrométricos, resonancia de plasmon en superficie, o escaneado y captura de imagen.

35 8. Kit para la detección e identificación de diferentes estirpes de *Escherichia coli* diarreagénicos según el procedimiento de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende:

a) Medios para el aislamiento de ADN total bacteriano

40 b) Al menos un tipo de ADN de alguna estirpe de *E. coli* diarreagénico como control.

c) Medios para la amplificación de ADN total bacteriano

45 d) oligonucleótidos identificados con las secuencias SEC. ID. NO. 187-SEC. ID. NO. 350

e) Microarrays con las sondas identificadas con las secuencias SEC. ID. NO. 1-SEC. ID. NO. 186.

f) Medios para la amplificación y marcaje simultáneos de una parte o de todo el ADN bacteriano.

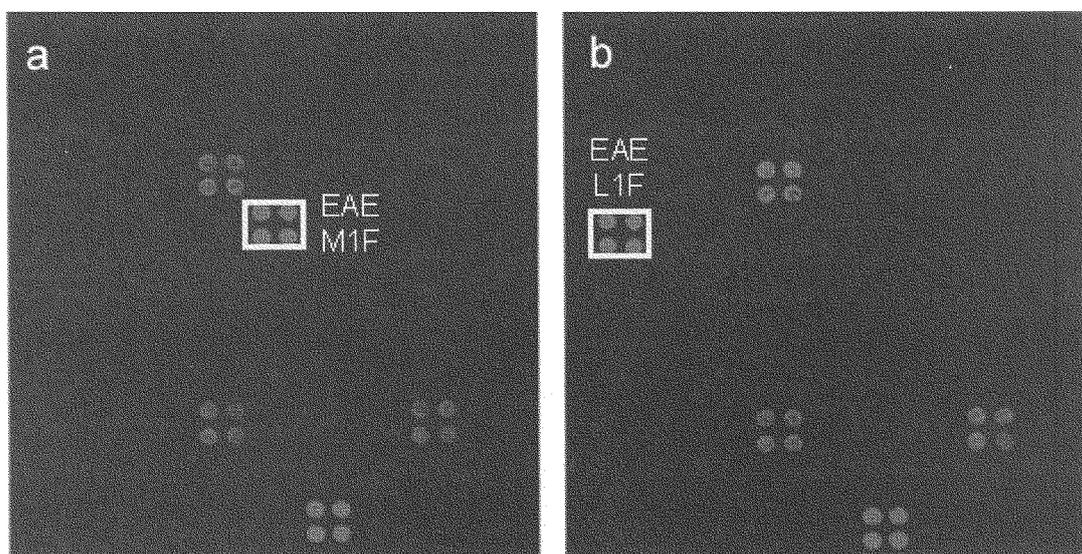
50 g) Medios para el marcaje y purificación de ADN

h) Medios para la hibridación del ADN con los microarrays

55 i) Medios para la interpretación de los resultados.

60

65



ESPB III 1R	ESPD F	ESPD 4F	ESPD I 1R	ESPD II 1R	ESPD III 1R			
TIRIV 1R	ESPA 1	ESPA I 1R	ESPA II 1R	ESPA III 1R	ESPA IV 1R	ESPB F	ESPB I 1R	ESPB II 1R
TIR A	TIR B	TIR I1F	TIR I1R	TIR II1F	TIR II1R	TIR III2F	TIR III1R	TIR IV1F
EAE N2R	B49a		EAE F	B49R	VTO 50		EAE Z1F	EAE Z2R
EAE L1F	EAE L2R	FV 380		EAE M1F	FV373 R	IH 1229a		EAE N1F
	EAE G2F	EAE C2	FV 3676		EAE I1F	LP7	68.4	
FV 3671		EAE et1F	EAE et2R	O157- 156		EAE G1F	EAE C1	VTB 351
EAE B5R	EPEC 9		EAE D2F	EAE D3R	VTB 286		EAE ep1F	EAE ep2R
EAE B6R	EPEC 4		EAE F	EAE B6R	FV359		EAE F	EAE B4F
EAE A	IH 2498a		IH2498 aF	EAE A2R	EAE A2R2	EPEC 4		EAE B3F
MG 1655	16s	EPEC 8	<i>ee</i> Univ	EAE1	EAE2	EPEC 8		EAE A1F

FIG. 1

MPX-PCR

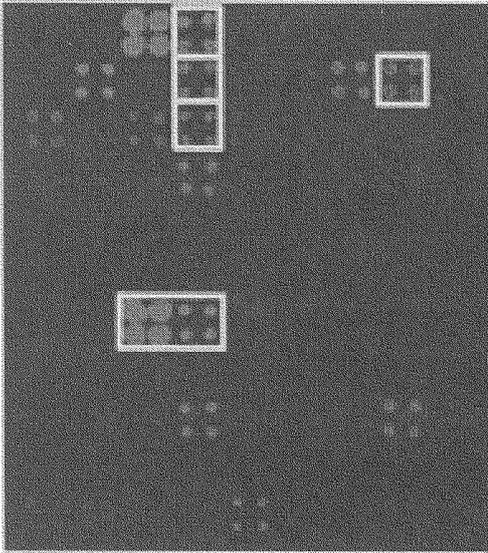


FIG. 2

LR-PCR

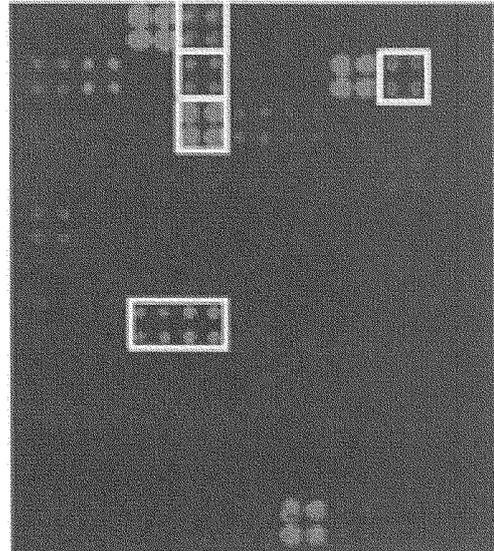


FIG. 3

Crom

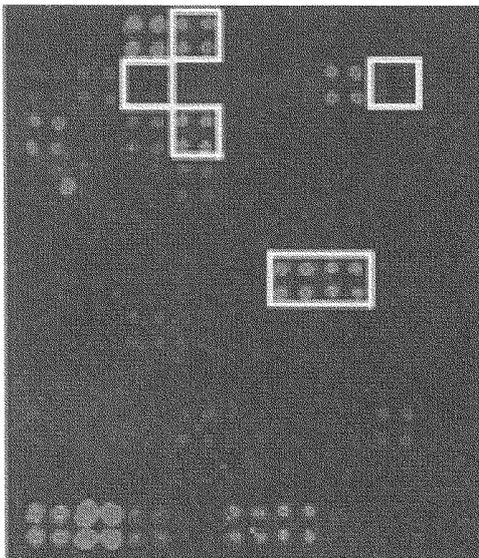


FIG. 4

Φ 29-MDA

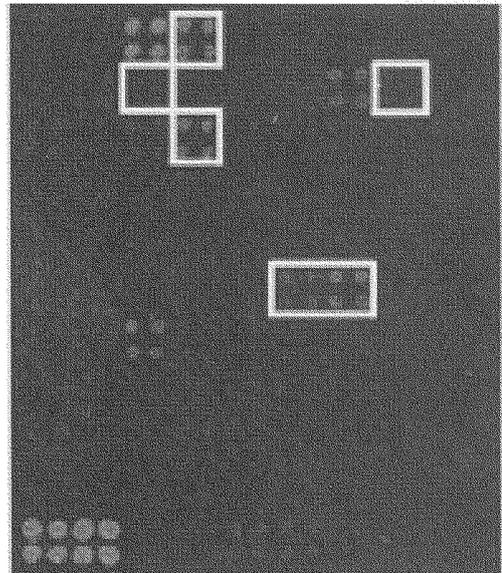


FIG. 5



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 323 911

② Nº de solicitud: 200503220

③ Fecha de presentación de la solicitud: 28.12.2005

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C12Q 1/68 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	CHINA, B. et al., "Comparison of eae, tir, espA and espB genes of bovine and human attaching and effacing Escherichia coli by multiplex polymerase chain reaction.", FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, 1999, Vol. 178, No. 1, páginas 177-182, Materiales y Métodos; Resultados.	1-8
Y	WO 2005005659 A1 (STATENS SERUM INSTITUT) 20.01.2005, página 8, línea 4 - página 9, línea 9; Tabla 3; Ejemplos.	1-8
A	GOFFAUX, F. et al., "Organisation and in vitro expression of esp genes of the LEE (locus of enterocyte effacement) of bovine enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli.", VETERINARY MICROBIOLOGY, 2001, Vol.83, No.3, páginas 275-286, todo el documento.	1-8
A	BLANCO, J.E. et al., "Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing Escherichia coli isolates from human patients: prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999.", JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 2004, Vol. 42, No.1, páginas 311-319, todo el documento.	1-8
A	JIN, H-Y. et al., "Microarray analysis of Escherichia coli O157:H7.", WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY, 2005 Oct, Vol. 11, No.37, páginas 5811-5815, todo el documento.	1-8
A	BEKAL, S. et al., "Rapid identification of Escherichia coli pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays.", JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 2003, Vol.41, No.5, páginas 2113-2125. todo el documento.	1-8

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

01.07.2009

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/2



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 323 911

② Nº de solicitud: 200503220

③ Fecha de presentación de la solicitud: **28.12.2005**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C12Q 1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	DOBRINDT, U. et al., "Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal Escherichia coli isolates by use of DNA arrays.", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 2003, Vol.185, No. 6, páginas 1831-1840. todo el documento.	1-8

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

01.07.2009

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

2/2