



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 244 259**

⑫ Número de solicitud: 200202410

⑬ Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **10.10.2002**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2005**

Fecha de la concesión: **04.09.2006**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **01.10.2006**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.10.2006

⑲ Titular/es: **Universitat de València, Estudi General
Avda. Blasco Ibáñez, nº 13
46010 Valencia, ES**

⑳ Inventor/es: **Aznar Novella, Rosa y
Alarcón Hernandis, Benito**

㉑ Agente: **No consta**

㉒ Título: **Detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos por un ensayo basado en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

㉓ Resumen:

Detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos por un ensayo basado en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La invención consiste en el empleo conjunto de cebadores LM1-LM2 y LI1-U1 representados respectivamente por SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3-SEQ ID NO: 4, en una técnica de PCR donde las muestras se someten a un paso de purificación de DNA y opcionalmente a un paso de enriquecimiento en medio selectivo y/o completo. El procedimiento de la invención presenta mayor especificidad en la detección de *Listeria monocytogenes*, una mayor sensibilidad (10 cel./g), requiere un menor tiempo para obtener los resultados (40 h), está validado para equipos de bajo coste y es de aplicación especialmente en muestras de contaminación natural.

ES 2 244 259 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos por un ensayo basado en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Sector de la técnica

La técnica es de aplicación fundamentalmente en el sector de alimentación así como en agricultura y sanidad dado que se trata de un procedimiento de análisis microbiológico de utilidad para los laboratorios que realizan control tanto de materias primas como de alimentos elaborados para garantizar su inocuidad alimentaria.

Estado de la técnica

La listeriosis es una enfermedad atípica entre las toxiinfecciones alimentarias, sin embargo tiene gran impacto en salud pública por la severidad de las enfermedades que produce, la elevada tasa de mortalidad (20-30%) y su largo período de incubación.

De las especies descritas como pertenecientes al género *Listeria*, *Listeria monocytogenes* y *Listeria ivanovii*, son patógenas pero sólo la primera es preocupante a nivel de salud pública. A diferencia de otros patógenos es ubicua y resistente a diversas condiciones como pH ácido y elevada concentración de NaCl, siendo capaz de crecer a bajas concentraciones de oxígeno y a bajas temperaturas. Puede estar presente tanto en la materia prima como en los alimentos procesados, resultando preocupante para la industria agroalimentaria debido a sus diferentes vías de entrada a las plantas de procesamiento de alimentos, su capacidad para sobrevivir durante largos períodos de tiempo y su resistencia a los procedimientos habituales de conservación de alimentos.

Entre los alimentos típicamente susceptibles de contaminación por *Listeria monocytogenes* están la leche y derivados lácteos, fundamentalmente quesos frescos, vegetales, productos cárnicos (frescos y tratados por calor) y comidas preparadas. El aislamiento de esta bacteria de alimentos resulta difícil dado que por un lado, se encuentra en bajo número y en condiciones no óptimas de crecimiento por lo que se requiere de un paso de revivificación en condiciones de cultivo apropiadas, y por otro, normalmente co-existe con otras especies como *L. innocua* que crece mejor en las condiciones de aislamiento y enmascara su presencia.

La detección y aislamiento de *L. monocytogenes* se realiza siguiendo las recomendaciones de la F.D.A. (U.S. Food and Drug Administration) que incluye varios pasos de cultivo (en caldos de preenriquecimiento y/o enriquecimiento selectivo y en medios sólidos selectivos y/o diferenciales), seguidos de la identificación de los aislamientos mediante pruebas morfológicas, bioquímicas y/o inmunológicas. Estos procedimientos son muy laboriosos y se requiere de hasta 7 días para completar la identificación, que en ocasiones resulta incierta.

La aplicación de técnicas moleculares como la PCR para la detección de *L. monocytogenes* presenta como ventajas respecto a las técnicas de cultivo, la rapidez y fiabilidad en la identificación la cual no se ve afectada por la falta de reproducibilidad de las pruebas fenotípicas o la falta de crecimiento de las bacterias en determinados sustratos, permitiendo además, su detección sin necesidad de aislarla previamente de la microbiota acompañante.

La tecnología de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) consiste en la amplificación exponencial de una secuencia de DNA, que se utiliza como molde, mediante una DNA polimerasa termoestable, y un par de cebadores apropiados para el microorganismo a detectar. Por un lado, basta una sola copia de la secuencia para conseguir la amplificación lo que le confiere una elevada sensibilidad. Por otro lado, la especificidad de la reacción permite una identificación inequívoca de la bacteria, e incluso la detección de cepas atípicas que no podrían identificarse mediante pruebas bioquímicas.

Hasta la fecha son múltiples las publicaciones en las que se describen cebadores específicos de *L. monocytogenes* dirigidos a diferentes genes. La mayoría de cebadores han sido dirigidos al gen *hlyA* y existen numerosas publicaciones sobre detección de *L. monocytogenes* por PCR pero en muchas de ellas se utilizan cultivos puros, DNA procedente de cultivos puros o muestras inoculadas artificialmente, siendo escasos los trabajos con muestras reales. Autores como Candrian en su artículo "Polymerase chain reaction in food microbiology (J. Microbiol. Meth. 23 (1995): 89-103)" o Niederhauser *et al.* en su artículo "Comparison of "Gen-Probe" "DNA-Probe" and PCR for detection of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminate soft cheese and semi-soft cheese (Res. Microbiol. 144 (1993): 47-54)" remarcan la necesidad de validar los sistemas de detección desarrollados en muestras naturales. De hecho la inoculación artificial de las muestras para validar el método de detección se realiza con cepas cultivadas en el laboratorio, es decir se encuentran en condiciones óptimas de crecimiento y responden bien al procedimiento en prueba, sin embargo no reflejan la situación real en el caso de *L. monocytogenes* cuando se encuentra en el alimento de contaminación natural. Además, aunque en todos los trabajos en los que se describen cebadores se habla de PCR específica para *L. monocytogenes*, generalmente han sido ensayados en un número limitado de cepas lo cual lleva en muchos casos a invalidar dicha especificidad cuando se aumenta el número de cepas ensayadas, especialmente si se trata de nuevos aislamientos.

Existen en el mercado múltiples medios de cultivo selectivos para *L. monocytogenes* algunos de ellos patentados (ES 2 078 007, Bio Merieux), así como sistemas para su identificación bioquímica (WO 92/01063, Biolog).

Entre las técnicas patentadas que incluyen métodos inmunológicos de detección de bacterias del género *Listeria* o específicamente de *L. monocytogenes* se pueden citar:

- EP 0 429 794 A2, Vicam, L.P.
- EP 0 463 222 A2, Vicam, L.P.
- DE 43 18 450 A1, Merck Patent GmbH
- WO 94/28420, Rhône Poulenc Diagnostic Ltd.
- WO 96/06115 National Jewish Center for Immunology and Respiratory Medicine.

En cuanto a técnicas moleculares basadas en la utilización de ácidos nucleicos existen de varios tipos:

1.- Técnica que aplica bacteriófagos recombinantes para detectar bacterias del género *Listeria* (US 5824468, Scherer *et al.*)

2.- Sondas de DNA que se aplican mediante métodos de hibridación y son:

a) Específicas de género *Listeria*:

- ES 2 010 794, Gene-Trak Systems
- WO 90/08841, Gene-Trak Systems
- US 5376528, King *et al.*
- WO 96/24686, Biomerieux

b) Específicas de especie *L. monocytogenes*:

- EP 0 314 294 A2, Gene-Trak Systems
- US 5389513, Baquero *et al.*
- WO 98/20157, Infectio Diagnostic (I.D.I.) Inc.

3.- Métodos basados en amplificación de ácidos nucleicos utilizando la reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR) y que incluyen secuencias de cebadores:

a) Específicos de género o especies del género que no sean *L. monocytogenes*

- WO 95/11996, Cornell Research Foundation, Inc.
- WO 01/68900, Vermicon AG

b) Específicos de *L. monocytogenes*

- CH 682 156, Candrian *et al.*
- US 5523205, Cossart, *et al.*
- EP 0 805 214, Università' Degli Studi di Udine.

Existen en la bibliografía múltiples publicaciones en las que se describen sondas de DNA y cebadores específicos de *L. monocytogenes* dirigidos a diferentes genes como son: *hlyA* (*lisA*, listeriolisina O), que codifica para la listeriolisina, *iap* (proteína asociada a la invasión), Dth-18 (tipo de hipersensibilidad retrasada), el 16S rRNA, un gen que codifica para una aminopeptidasa y el *inlA* (operon de la internalina). Muchas de ellas incluyen su adaptación como método de detección por PCR y generalmente se han aplicado a cultivos puros, a DNA o bien a muestras inoculadas artificialmente, siendo escasos los trabajos con muestras reales. A continuación figura una lista de dichas publicaciones:

Almeida, P. F. and Almeida, R. C. C.: A PCR protocol using *inl* gene as a target for specific detection of *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 11, 97 (2000).

Bickley, J., Short, J. K., McDowell, D. G. and Parkes, H. C.: Polymerase chain reaction (PCR) detection of

Listeria monocytogenes in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Lett. Appl. Microbiol.* 22, 153 (1996).

Cox, T., Frazier, C., Tuttle, J., Flood, S., Yagi, L., Yamashiro, C. T., Behari, R., Paszko, C. and Cano, R. J.: Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in dairy samples utilizing a PCR-based fluorogenic 5' nuclease assay. *J. Industr. Microbiol. Biotechnol.* 21, 167 (1998).

Curiale, M. S. and Lewus, C.: Detection of *Listeria monocytogenes* in samples containing *Listeria innocua*. *J. Food Prot.* 57, 1048 (1994).

Duffy, G., Cloak, O. M., Sheridan, J. J., Blair, I. S. and McDowell, D. A.: The development of a combined surface adhesion and polymerase chain reaction technique in the rapid detection of *Listeria monocytogenes* in meat and poultry. *Int. J. Food Microbiol.* 49, 151 (1999).

Ericsson, H. and Stalhandske, P.: PCR detection of *Listeria monocytogenes* in "gravad" rainbow trout. *Int. J. Food Microbiol.* 35, 281 (1997).

Fitter, S., Heuzenroeder, M. and Thomas, C. J.: A combined PCR and selective enrichment method for rapid detection of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.* 73, 53 (1992).

Golsteyn Thomas, E. J., King, R. K. and Gannon, V. P. J.: Sensitive and specific detection of *Listeria monocytogenes* in milk and ground beef with the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2576 (1991).

Niederhauser, C., Candrian, U., Höfelein, C., Jermini, M., Bühler, H.-P. and Lüthy, J.: Use of polymerase chain reaction for detection of *Listeria monocytogenes* in food. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1564 (1992).

Nogva, H. K., Rudi, K., Naterstad, K., Holck, A. and Lillehaug, D.: Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4266 (2000).

Simon, M. C., Gray, D. I. and Cook, N.: DNA extraction and PCR methods for the detection of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 822 (1996).

Wang, R.F., W.W. Cao & M.G. Johnson (1992) 16 rRNA-based probes and polymerase chain reaction method to detect *Listeria monocytogenes* cells added to foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2827-2831.

Wernars, K., Heuvelman, C. J., Chakraborty, T. and Notermans, S.: Use of the polymerase chain reaction for direct detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *J. Appl. Bacteriol.* 70, 121 (1991).

Winters, D. K., Maloney, T. P. and Johnson, M. G.: Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by a PCR assay specific for an aminopeptidase. *Mol. Cel. Probes* 13, 127 (1999).

Entre los productos que hay en el mercado para identificación de *L. monocytogenes* se encuentran métodos bioquímicos (LM-139 con HGMF, QA Life Sciences; API, BioMerieux; Microlog, BIOLOG, etc.), de aglutinación inmunológica (*Listeria* Rapid Test, Oxoid) de hibridación de ácidos nucleicos (Riboprinter, Qualicon). Entre los productos para detección basados en ácidos nucleicos están los que utilizan sistemas de hibridación con sondas específicas de *Listeria* (GENE-TRAK; AccuProbe, GEN-PROBE) y los que utilizan la técnica de PCR (BAX, Qualicon Europe, Ltd.; Probelia, Sanofi Pasteur; *Listeria* test-PCR, Helix Biotechnologies).

De las tres patentes de PCR para detección de *L. monocytogenes* mencionadas en el apartado anterior, la CH 682156 incluye 4 cebadores dirigidos al gen *HlyA*, entre los que se encuentran los denominados LMA-LMB y 4 cebadores dirigidos al gen *iap*, entre los que se encuentran los denominados IAP1-IAP2 y como ejemplo su aplicación en muestras de leche inoculadas artificialmente. La patente US 5523205, incluye cebadores dirigidos al gen *HlyA*, entre los que se encuentran los denominados PCRG0-PCRDO y se menciona su aplicación en alimentos inoculados artificialmente y en alimentos sin inocular. En la patente EP 0 805 214, se describen cebadores dirigidos al gen *iap*, un método de detección directa en alimentos y su aplicación en alimentos inoculados artificialmente pero no su aplicación en muestras de contaminación natural.

En el trabajo "On the specificity of PCR detection of *Listeria monocytogenes* in food: a comparison of published primers" (Aznar & Alarcón, System. Appl. Microbiol., 25 (2002): 109-119) se han ensayado seis pares de cebadores, descritos en la bibliografía como específicos para *L. monocytogenes*, en 72 cepas y, sólo un par (LM1-LM2) ha resultado realmente específico. Con el resto incluyendo LMA-LMB, IAP1-IAP2 y PCRG0-PCRDO mencionados anteriormente, se obtienen falsos positivos en las amplificaciones con cepas de las especies *L. innocua* y *L. seeligeri*, fundamentalmente. En la invención los cebadores LM1-LM2 se han ensayado en un total de 180 cepas confirmandose su especificidad; se ha determinado su nivel de sensibilidad en muestras inoculadas artificialmente (Figura 1) y su aplicación en 278 muestras de contaminación natural. La presente invención resuelve los problemas del Estado de la Técnica mencionados referentes a la falta de especificidad para *L. monocytogenes* y de sensibilidad en muestras con

contaminación natural desarrollando un nuevo dispositivo de ensayo basado en el uso conjunto de cebadores LM1-LM2 y LI1-U1.

Descripción de la invención

La invención presenta un procedimiento de detección de *L. monocytogenes* por PCR que combina los diferentes factores que afectan a este tipo de procedimiento: el tiempo mínimo de incubación (enriquecimiento) para conseguir la máxima recuperación en muestras reales, la accesibilidad del DNA a los cebadores, la ausencia de inhibidores de la reacción, las condiciones óptimas de reacción y la especificidad de los cebadores. Se propone la utilización de los cebadores LM1-LM2 específicos de *L. monocytogenes* conjuntamente con los cebadores LI1-U1 específicos de género *Listeria* (Figura 1) como describen Border *et al.* (1990) en su artículo "Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. Letts. Appl. Microbiol. 11: 158-162."

El procedimiento que se propone es un método rápido ya que se obtienen los resultados en un plazo de 4 h tras el enriquecimiento (en total 40 h) y además, tiene como ventajas con respecto a los métodos de PCR que existen en el mercado (BAX, PROBELIA y *Listeria* test-PCR): a) la especificidad de la reacción de amplificación corroborada por el número de cepas de *L. monocytogenes* y de otras especies del género, tanto de colección como aisladas de alimentos, que han sido probadas. Todas ellas identificadas por diferentes técnicas para garantizar su correcta adscripción a género y especie; b) su nivel de sensibilidad que permite detectar al menos 10 células por g (Figura 2); c) su aplicación en muestras reales de diferentes tipos de alimentos contrastada con técnicas clásicas de cultivo; d) su validación en equipos termocicladores de bajo coste.

El procedimiento que aquí se propone tiene como ventaja respecto a los métodos de PCR patentados específicos de *L. monocytogenes* (CH 682 156, Candrian *et al.*; US 5523205, Cossart, *et al.*; EP 0 805 21497, Università Degli Studi di Udine) que utilizan cebadores de especificidad garantizada, que incluye un procedimiento de purificación de DNA para eliminar inhibidores de la reacción de PCR, que ha sido ensayado en muestras reales y comparado utilizando diferentes tiempos y temperaturas de incubación para los pasos de pre-enriquecimiento y enriquecimiento selectivo.

Su aplicación industrial se centrará en proporcionar los componentes básicos de la reacción de amplificación, a excepción de la DNA polimerasa, para su utilización en laboratorios que realizan análisis microbiológico de alimentos. Este procedimiento ha sido validado utilizando dos equipos termocicladores: 1) GeneAmp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems) y 2) Techne. Ambos incluyen un sistema Peltier de enfriamiento pero el precio del primero es tres veces mayor. La validación del procedimiento que se presenta, en ambos equipos, ofrece la ventaja de elección del equipo a laboratorios que procesan pequeño número de muestras y que requieren sistemas de bajo coste.

Descripción detallada de la invención

Con el fin de determinar el procedimiento que se propone como óptimo para la detección de *L. monocytogenes* por PCR se analizaron diferentes factores que afectan a la sensibilidad de la técnica.

- Detección sin enriquecimiento
- Enriquecimiento a 36.5-37.5°C
- Extracción de DNA
- Pares de cebadores descritas en la bibliografía como específicos para *L. monocytogenes*.

Para ello se prepararon muestras de carne homogeneizadas (40 g en 360 ml de caldo Fraser semi-concentrado (composición por l: peptona de proteosa 5 g, peptona de caseína 5 g, extracto de levadura 5 g, extracto de carne 5 g, cloruro sódico 20 g, hidrógeno fosfato di-sódico 12 g, di-hidrógeno fosfato potásico 1.35 g, esculina 1 g, cloruro de litio 3 g, citrato de amonio y hierro (III) 500 mg, acriflvina 12.5 mg, ácido nalidíxico 10 mg) y se inocularon con diluciones decimales seriadas de un cultivo de toda la noche de *L. monocytogenes* CECT 4031 cubriendo el rango entre 1 y 10⁷ células/ml (determinado por recuento en placa) incluyéndose un control negativo sin inocular. En todos los casos se realizó la detección por PCR de las diferentes diluciones ensayadas para calcular el nivel de detección y seleccionar las condiciones que favorecían la mayor sensibilidad del método (Figura 2).

La invención establece un protocolo de detección que consiste en tomar 1 ml del caldo de enriquecimiento que se someterá a lisis celular mediante la recogida de las células por centrifugación entre 10.000 y 13.000 rpm al menos 3 minutos, preferentemente en centrífuga de mesa. Tras eliminar el sobrenadante el precipitado se resuspende en 500-1000 µl de tampón TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM Na₂EDTA). Se centrifuga a 13.000 rpm durante 3 minutos y se resuspende en 150-200 µl de tampón de lisis (50 mg/ml de lisozima en TE) y se deja incubar a 37°C al menos 30 minutos. Para recuperar el DNA de la muestra se utiliza la columna cromatográfica para purificación de ácidos nucleicos, DNeasy Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Al lisado se añade 20-30 µl de proteinasa K, y 150-250 µl de tampón AL, se agita y se deja incubar a 70°C durante 30 minutos. Después se añaden 150-250 µl de etanol (95-100%) y se agita hasta obtener una solución homogénea. A continuación se pasa todo el volumen a la columna DNeasy y se centrifuga a 8.000 rpm durante 1 min. Después se lava la columna primero con tampón AW1, centrifugando a 8.000 rpm durante 1 minuto, y luego con tampón AW2, centrifugando a 13.000 rpm durante

ES 2 244 259 B1

3 minutos. Finalmente se añaden 50-200 μ l de tampón AE, se incuba a temperatura ambiente durante 1 minuto y se centrifuga a 8.000 rpm durante 1 minuto para recuperar el DNA de la muestra.

La reacción de amplificación se realiza con 1-10 μ l de la solución de DNA, obtenida como se indica en el párrafo anterior, se añaden a la mezcla de PCR (50-100 μ l vol total) que contiene el tampón de PCR (10 mM Tris-HCl, pH 8.8; 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 50-200 μ M de cada nucleótido trifosfato (dNTP), 0.5-2 μ M de cada uno de los cebadores y 0,1-1 unidades de DNA polimerasa termoestable. Las mezclas de reacción se someten a amplificación en un termociclador. El DNA se desnaturaliza entre 94-98°C de 5 a 10 minutos a continuación se somete a 30-35 ciclos que consisten cada uno en 30-60 segundos a 92-94°C, 40-60 segundos entre 50 y 56°C y 40-60 segundos a 70-74°C. A continuación la mezcla de amplificación se somete a 5-10 minutos de extensión a 70-74°C.

10-20 μ l del producto de la PCR se someten a electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE (40 mM Tris-acetato, pH 8.0 y 1 mM Na₂EDTA). Los resultados del ensayo de PCR se compararon con los resultados de los controles negativo y positivo: el control positivo utiliza como molde 5 μ l de DNA purificado de *L. monocytogenes* (200 ng) y el control negativo contiene 5 μ l de agua destilada estéril en lugar de DNA. Por comparación con un marcador de tamaño molecular se identifica la presencia de un fragmento amplificado de 938 pares de bases que corresponde a *Listeria* y otro de 702 pares de bases que corresponde a *L. monocytogenes* (Figura 1). La ausencia de banda en la posición correspondiente a 702 pb indica la ausencia de *L. monocytogenes*.

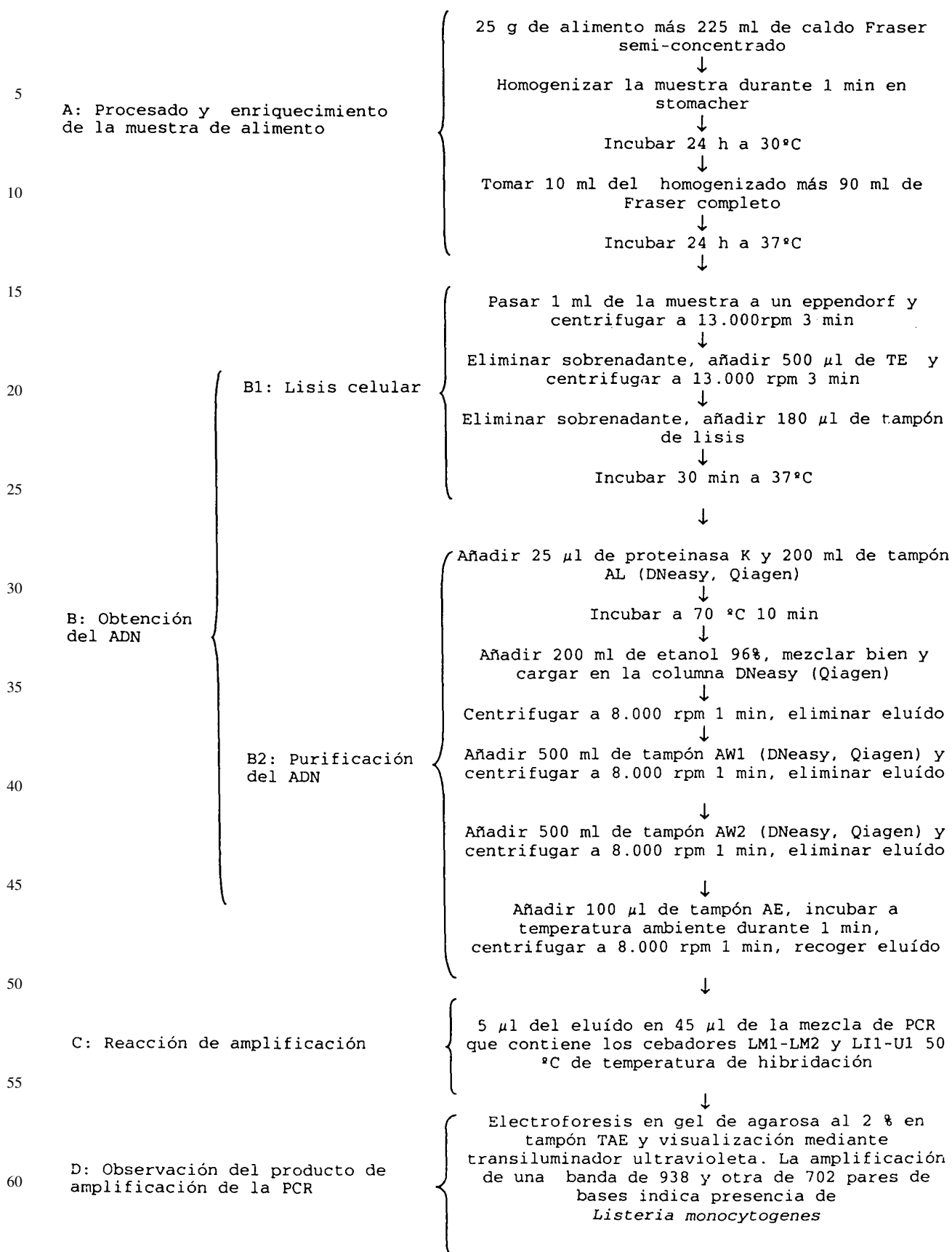
Para comprobar la especificidad de los cebadores ensayados se partió de los DNAs purificados de un total de 180 cepas de *Listeria* de las que 96 pertenecen a la especie *L. monocytogenes* y 84 a otras especies del género. Se incluyeron 39 cepas de referencia suministradas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) siendo 12 *L. monocytogenes*, 6 *L. innocua*, 7 *L. ivanovii*, 4 *L. welshimeri*, 7 *L. seeligeri*, y 3 *L. gray*. Además, se probaron cepas de otras especies 2 *Staphylococcus sp.*, 1 *Providencia rettgeri*, 2 *Escherichia coli*, 2 *Salmonella*, 2 *Bacillus cereus*, 2 *Bacillus mycoides*, 4 *Staphylococcus aureus*. Se aplicó la reacción de amplificación como se indica en el párrafo anterior. Todos los cultivos fueron sometidos a identificación por métodos bioquímicos (API, BioMérieux) y por métodos genéticos (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA, se describe en Aznar & Alarcón, System. Appl. Microbiol., 25 (2002): 109-119) para asegurar su pertenencia a la especie *L. monocytogenes* u otras especies del género. Sólo con los cebadores LM1 (SEQ ID NO: 1) y LM2 (SEQ ID NO:2) se obtuvo el amplificado de 702 pares de bases en todas las cepas identificadas como *L. monocytogenes* mientras que se observó la ausencia de dicha banda en el resto de cepas ensayadas.

Este protocolo se aplicó a 278 muestras de diferentes tipos de alimentos incluyendo productos cárnicos, derivados lácteos, platos preparados cocinados y crudos, pescado, y además, se analizaron en paralelo siguiendo el procedimiento clásico de cultivo. De ellas, 60 se sometieron a dos tipos de enriquecimiento: A) 6 h a 28-32°C y 24-48 h a 36.5-37.5°C, B) 24 h a 28-32°C y 24-48 h a 36.5-37.5°C. El resultado de este ensayo indica la necesidad de realizar un paso de pre-enriquecimiento en caldo Fraser (Merck, Darmstadt, Germany) semi-concentrado a 28-32°C, entre 18 y 24 h, y un paso posterior de enriquecimiento selectivo en caldo Fraser completo (composición por 1: peptona de proteosa 5 g, peptona de caseína 5 g, extracto de levadura 5 g, extracto de carne 5 g, cloruro sódico 20 g, hidrógeno fosfato disódico 12 g, di-hidrógeno fosfato potásico 1.35 g, esculina 1 g, cloruro de litio 3 g, citrato de amonio y hierro (III) 500 mg, acriflavina 25 mg, ácido nalidíxico 20 mg) a 36.5-37.5°C, de entre 18 h y 24 h, para garantizar la detección de *L. monocytogenes* en alimentos y evitar la obtención de falsos negativos.

El esquema de protocolo de detección de *L. monocytogenes* que se propone, es el siguiente:

(Esquema pasa a página siguiente)

ES 2 244 259 B1



Descripción de las figuras

Figura 1- Ensayo de especificidad de la reacción de PCR con cebadores LM1-LM2 y LI1-U1 por separado o conjuntamente realizado con las cepas tipo de las seis especies integrantes del género *Listeria*. La presencia de la banda de 938 pares de bases indica la pertenencia al género *Listeria* (10 a 23). La presencia de las bandas de 938 y 702 pares de bases, simultáneamente, indica la pertenencia a la especie *Listeria monocytogenes* (12).

10	1.- Marcador de peso molecular (escalera de 100 pb)	
	2.- <i>Listeria seeligeri</i>	Amplificación con cebadores LM1-LM2
	3.- <i>Listeria innocua</i>	
	4.- <i>Listeria monocytogenes</i>	
15	5.- <i>Listeria welshimeri</i>	
	6.- <i>Listeria ivanovii</i>	
	7.- <i>Listeria grayi</i>	
20	8.- Control negativo (sin DNA)	
	9.- Marcador de peso molecular (escalera de 100 pb)	
	10.- <i>Listeria seeligeri</i>	Amplificación con cebadores LM1-LM2 y LI1- U1
25	11.- <i>Listeria innocua</i>	
	12.- <i>Listeria monocytogenes</i>	
	13.- <i>Listeria welshimeri</i>	
	14.- <i>Listeria ivanovii</i>	
30	15.- <i>Listeria grayi</i>	
	16.- Control negativo (sin DNA)	
	17.- Marcador de peso molecular (escalera de 100 pb)	
35	18.- <i>Listeria seeligeri</i>	Amplificación con cebadores LI1-U1
	19.- <i>Listeria innocua</i>	
	20.- <i>Listeria monocytogenes</i>	
40	21.- <i>Listeria welshimeri</i>	
	22.- <i>Listeria ivanovii</i>	
	23.- <i>Listeria grayi</i>	
45	24.- Control negativo (sin DNA)	

Figura 2- Resultados de sensibilidad de la reacción de PCR con los cebadores LM1-LM2 y LI1-U1. Se presentan los resultados de amplificación en muestras inoculadas con diluciones decimales de un cultivo puro de *L. monocytogenes*. La presencia de las bandas en 7 indica el límite de detección que corresponde a 1 célula por ml (10 células por g de alimento).

55	1.- Marcador de peso molecular (escalera de 100 pb)
	2.- 10^5 u.f.c./ml
60	3.- 10^4 u.f.c./ml
	4.- 10^3 u.f.c./ml
	5.- 10^2 u.f.c./ml
65	6.- 10^1 u.f.c./ml
	7.- 1 u.f.c./ml

ES 2 244 259 B1

8.- 10^{-1} u.f.c./ml

9.- Control negativo (sin DNA)

5 Ejemplo de realización de la invención

A.- Procesado y enriquecimiento de la muestra de alimento

Se toman 25 g de diferentes partes del alimento y se colocan en una bolsa estéril con filtro lateral (BagPage S 400, BagSystem, Interscience, St-Nom-la-Breteche, France). Se añaden 225 ml de caldo Fraser (Merck, Darmstadt, Germany), semi-concentrado, se tritura en homogenizador ("Stomacher") durante 1 minuto y se incuba en la misma bolsa durante 24 h a 30°C. Seguidamente se toman 10 ml y se añaden a una botella de 250 ml de capacidad que contiene 90 ml de caldo Fraser completo y se deja incubar durante 24 h a 37°C. Transcurridos estos se pasa 1 ml a un tubo eppendorf estéril para analizar.

B.- Obtención del DNA

B1.- Lisis celular

En una centrífuga para tubos Eppendorf, se centrifuga la muestra (1 ml) a 13.000 rpm durante 3 minutos. Se elimina el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 500 μ l de tampón TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM Na₂EDTA). Se centrifuga a 13.000 rpm durante 3 minutos y se resuspende en 180 μ l de tampón de lisis (50mg/ml de lisozima en TE) y se deja incubar a 37°C durante 30 minutos.

B2.- Purificación del DNA

Se lleva a cabo mediante la utilización de las columnas comerciales para la purificación de ácidos nucleicos, DNeasy Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). A los 180 μ l de lisis, se añaden 25 μ l de proteinasa K, y 200 μ l de tampón AL, se agita y se deja incubar a 70°C durante 30 minutos. Después se añaden 200 μ l de etanol (95-100%) y se agita hasta obtener una solución homogénea. A continuación se pasa todo el volumen a la columna DNeasy y se centrifuga a 8.000 rpm durante 1 min. Después se lava la columna primero con 500 μ l tampón AW1 centrifugando a 8000 rpm durante 1 minuto y luego con 500 μ l tampón AW2 centrifugando a 13.000 rpm durante 3 minutos. Finalmente se añaden 100 μ l de tampón AE, se incuba a temperatura ambiente durante 1 minuto y se centrifuga a 8.000 rpm durante 1 minuto para recuperar el DNA de la muestra.

C.- Reacción de amplificación

5 μ l de la solución de DNA, obtenida como se indica en el apartado anterior, se añaden a 45 μ l de la mezcla de PCR que contiene en tampón de PCR (10 mM Tris-HCl, pH 8.8; 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 100 μ M de cada nucleótido trifosfato (dNTP), 1 μ M de cada uno de los cebadores LM1 (SEQ ID NO:1), LM2 (SEQ ID NO: 2), LI1 (SEQ ID NO: 3), U1 (SEQ ID NO: 4) y 0,5 unidades de DNA polimerasa termoestable (DyNAzyme II DNA polymerase, Finnzymes Oy, Finland). Las mezclas de reacción se someten a amplificación en un termociclador Perkin-Elmer 2.400 con el siguiente programa: 94°C durante 5min.; 35 ciclos de 94°C 30 seg., 50°C 45 seg. y 72°C 45 seg.; por último 72°C durante 5 min. Cuando se utiliza el equipo Techne (Progene) las condiciones de reacción son igual que en 3 pero el programa incluye una variable denominada "rate" que modula el tiempo que tarda el equipo en cambiar de temperatura y cuyos valores se indican a continuación para cada paso de la reacción:

un ciclo a	94°C, 5 minutos, rate mx
35 ciclos de	94°C, 30 segundos, rate 45
	56°C, 45 segundos, rate mx
	72°C, 45 segundos, rate 48
un ciclo a	72°C, 5 minutos, rate mx

D.- Observación del producto de amplificación de la PCR

El producto de la PCR se visualiza mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE (40 mM Tris-acetato, pH 8.0 y 1 mM Na₂EDTA). Para la identificación del producto de la PCR se utiliza como marcador de tamaño una escalera de fragmentos de DNA el 100 pb, el 100 Base-Pair Ladder (Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, New York, USA).

El resultado es positivo cuando se obtiene una banda de 938 pares de bases (*Listeria*) y otra de 702 pares de bases (*L. monocytogenes*).

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento de detección específica de *Listeria monocytogenes* mediante un dispositivo de ensayo basado en tecnología de PCR utilizando conjuntamente al menos 2 parejas de cebadores LM1-LM2 y LI1-U1 representados respectivamente por SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3-SEQ ID NO:4, **caracterizado** por comprender un paso de purificación de DNA para eliminar inhibidores de la reacción PCR mediante cromatografía.

10 2. Procedimiento de detección específica de *L. monocytogenes* según la reivindicación 1, **caracterizado** porque las muestras utilizadas proceden de cultivos puros, de inóculos artificiales o de contaminación natural, preferentemente de alimentos.

15 3. Procedimiento de detección específica de *L. monocytogenes* según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque comprende al menos una etapa de enriquecimiento en medio semi-concentrado a 30°C durante 6-24 h.

4. Procedimiento de detección específica de *L. monocytogenes* según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque comprende al menos una etapa de enriquecimiento en medio completo a 37°C durante 18-24 h.

20 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende secuencialmente:

Homogeneizar una muestra de alimento

Someter al homogeneizado al menos a una etapa de enriquecimiento previo

25 Someter al homogeneizado enriquecido a un procedimiento de lisis celular

Aislar y purificar el DNA del lisado

30 Amplificar por PCR el DNA obtenido utilizando como cebadores conjuntamente las parejas LM1-LM2 y LI1-U1 representadas respectivamente por SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3-SEQ ID NO:4

Visualizar el resultado de la amplificación preferentemente por electroforesis.

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

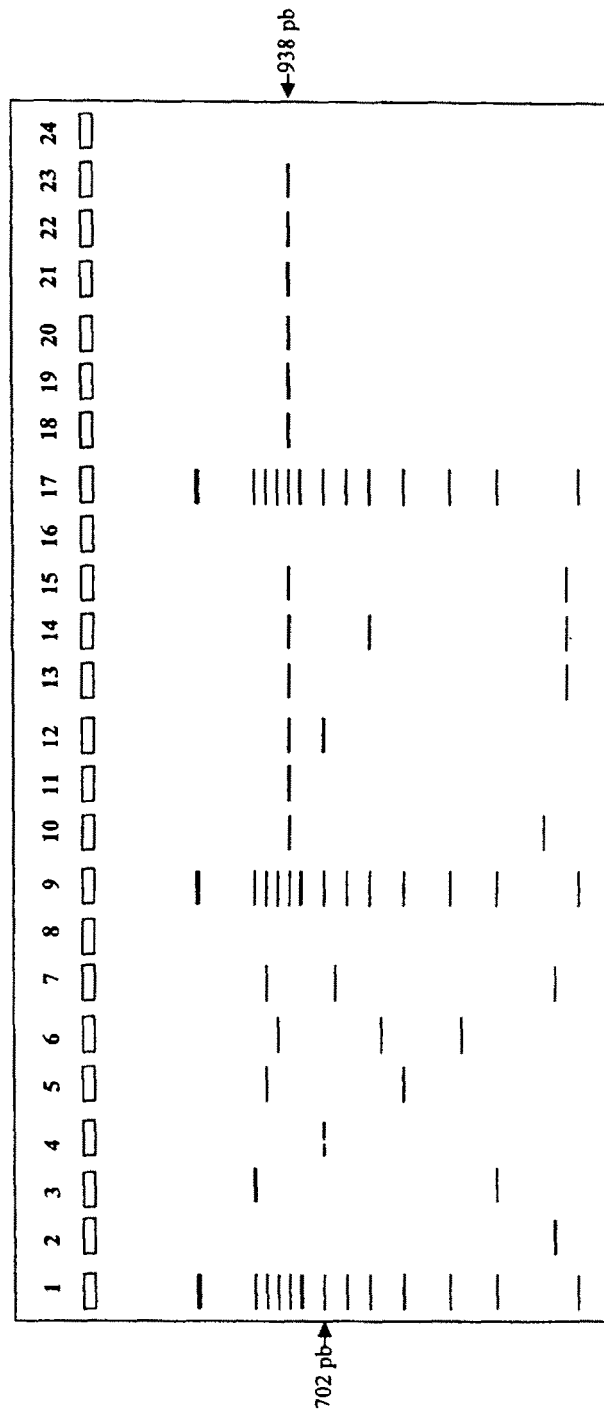
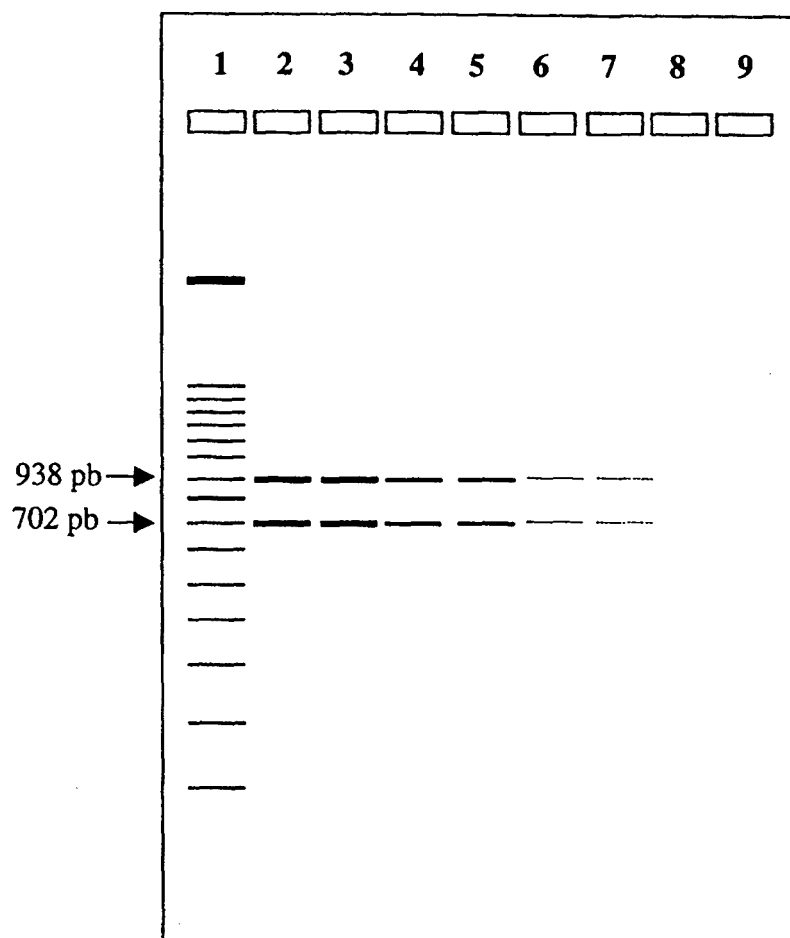


Figura 2



ES 2 244 259 B1

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> UNIVERSIDAD DE VALENCIA	
5	<120> Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> en alimentos por un ensayo basado en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	
	<160> 4	
	<210> 1	
10	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador LM1	
	<400>	
20	CCTAAGACGC CAATCGAA	18
	<210> 2	
	<211> 18	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador LM2	
	<400>	
35	AAGCGCTTGC AACTGCTC	18
	<210> 3	
	<211> 18	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador LI1	
45	<400>	
50	CTCCATAAAG GTGACCCT	18
	<210> 4	
	<211> 18	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador U1	
60	<400>	
65	CAGCMGCCGC GGTAATWC	18



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 244 259

⑫ Nº de solicitud: 200202410

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 10.10.2002

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.7: C12Q 1/68

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	HERMAN, L. et al. Cheese components reduce the sensitivity of detection of Listeria monocytogenes by the polymerase chain reaction.", NETH. MILK DAIRY J., 1993, Vol. 47, páginas 23-29. Ver todo el documento.	1-4
Y	WERNARS, K. et al. Use of the polymerase chain reaction for direct detection of Listeria monocytogenes in soft cheese.", J. APPL. BACTERIOL., 1991, Vol. 70, Nº 2, páginas 121-126. Ver todo el documento; en particular Materiales y Métodos.	1,2
Y	AZNAR, R. et al. On the specificity of PCR detection of Listeria monocytogenes in food: a comparison of published primers.", SYST. APPL. MICROBIOL., 2002, Vol. 25, Nº 1, páginas 109-119. Ver todo el documento.	1,2
A	BORDER, P.M. et al. "Detection of Listeria species and Listeria monocytogenes using polymerase chain reaction.", LETT. APPL. MICROBIOL., 1990, Vol. 11, Nº 3, páginas 158-162. Ver todo el documento.	1-5
A	HERMAN, L. et al. Comparison of different methods for detection of Listeria monocytogenes in dairy products.", MILCHWISSENSCHAFT, 1993, Vol. 48, páginas 684-686. Ver todo el documento.	1-5
A	FITTER, S. et al. A combined PCR and selective enrichment method for rapid detection of Listeria monocytogenes.", J. APPL. BACTERIOL., 1992, Vol. 73, Nº 1, páginas 53-59. Ver todo el documento.	1.5

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

11.11.2005

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/2



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 244 259

⑫ Nº de solicitud: 200202410

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 10.10.2002

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.7: C12Q 1/68

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	NIEDERHAUSER, C. et al. "Use of polymerase chain reaction for detection of Listeria monocytogenes in food.", APPL. ENVIRON. MICROBIOL., 1992, Vol. 58, Nº 5, páginas 1564-1568. Ver todo el documento.	1-5
A	NIEDERHAUSER, C. et al. "Direct detection of Listeria monocytogenes using paramagnetic bead DNA extraction and enzymatic DNA amplification.", MOL. CELL. PROBES, 1994, Vol. 8, Nº 3, páginas 223-228. Ver todo el documento.	1-5
A	GOLSTEYN THOMAS, E.J. et al. "Sensitive and specific detection of Listeria monocytogenes in milk and ground beef with the polymerase chain reaction.", APPL. ENVIRON. MICROBIOL., 1991, Vol. 57, Nº 9, páginas 2576-2580. Ver todo el documento.	1-5

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

11.11.2005

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

2/2