

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 300 174**

21 Número de solicitud: 200600192

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12R 1/42 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **27.01.2006**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **01.06.2008**

Fecha de la concesión: **08.04.2009**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **01.05.2009**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.05.2009

73 Titular/es: **Universidad del País Vasco-Euskal-Herriko Unibertsitatea Barrio de Sarriena, s/n - UPV Campus de Leioa 48940 Leioa, Vizcaya, ES Laboratorios Bromatológicos Araba, S.A.**

72 Inventor/es: **Garaizar Candina, Javier; Álvarez Rubio, Jon; Lopitz Otsoa, Fernando; Vivanco Gómez, Ana Belén; Rementería Ruiz, Aitor; Bikandi Bikandi, Joseba; Pérez Aguirre, Fernando y Santaolalla Ruis de Galarreta, Isabel**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

54 Título: **Detección y tipificación de *Salmonella* en muestras alimentarias mediante PCR múltiple.**

57 Resumen:

Detección y tipificación de *Salmonella* en muestras alimentarias mediante PCR múltiple.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la detección y tipificación de *Salmonella* en muestras alimentarias caracterizado porque comprende: enriquecer los microorganismos presentes en la muestra alimentaria; extraer el ADN del cultivo resultante del paso anterior; realizar una PCR múltiple; y revelar la correspondiente amplificación de bandas. Asimismo, la invención se refiere a los oligonucleótidos empleados en dicha PCR múltiple y a un kit para realizar dicho procedimiento.

ES 2 300 174 B1

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

DESCRIPCIÓN

Detección y tipificación de *Salmonella* en muestras alimentarias mediante PCR múltiple.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se engloba dentro del campo de los métodos de detección de *Salmonella* en muestras alimentarias, ofreciendo además información sobre el serotipo y fagotipo de *Salmonella* presente en la muestra alimentaria.

10 **Estado de la técnica**

El género *Salmonella* constituye uno de los patógenos más importantes, presentes en muestras alimentarias en todo el mundo. Se ha estimado que *Salmonella* es responsable de más de 1,4 millones de casos de enterocolitis y de más de 500 muertes al año en Estados Unidos. A pesar de la importancia de *Salmonella* como patógeno alimentario, las técnicas disponibles hoy en día para la detección de *Salmonella* en alimentos siguen siendo tediosas y largas. Además, estas técnicas para la detección de *Salmonella* en alimentos no proporcionan información adicional de interés epidemiológico, sino sólo presencia o ausencia.

Los cuatro serotipos de *Salmonella enterica* aislados con mayor frecuencia en España son: Enteritidis, *Typhimurium*, Hadar y subsp. I ser. 4,5, 12:i:-. *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis se relaciona frecuentemente con gallinas, huevos y alimentos procesados que contienen derivados del huevo. *Salmonella enterica* serotipo *Typhimurium* posee una relación más estrecha con la carne porcina. El fagotipo más importante de *Salmonella Typhimurium* es el conocido como DT104. Este fagotipo de *Salmonella* se ha extendido por Europa desde 1990. El fagotipo DT104 generalmente es multirresistente a agentes antimicrobianos. Generalmente muestra un patrón de resistencia ACSSUT (Ampicilina, Cloranfenicol, Estreptomina, Sulfonamida y Tetraciclina). *Salmonella enterica* serotipo 4,5,12:i:- pertenece al fagotipo U302 de *Salmonella Typhimurium* que ha perdido su operón genético de cambio de fase y que se está extendiendo rápidamente en España. Esta cepa también está relacionada con la resistencia antimicrobiana.

Existen muchas técnicas disponibles para la detección de *Salmonella* en matrices alimentarias. Algunas de estas técnicas están basadas en tecnología PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Sin embargo, estas técnicas poseen diversos defectos. Las técnicas no basadas en PCR suelen ser lentas y tediosas. Es importante tener en cuenta que la detección de *Salmonella* en alimentos generalmente debe llevarse a cabo lo más rápido posible, puesto que la aprobación de lotes de comida o el inicio de investigaciones dependen de los resultados.

Un segundo factor a considerar en una técnica de detección de *Salmonella* es la versatilidad de la matriz. El amplio espectro de alimentos que pueden estar sujetos a investigaciones de *Salmonella* complica la estrategia de purificación de ADN. Muchas técnicas de detección de *Salmonella* emplean pasos complejos y caros de extracción de ADN que incluyen la separación inmunomagnética y el uso de columnas basadas en sílice que requieren varios pasos de centrifugación y un manejo intensivo de las muestras.

Un tercer punto crítico en las técnicas de detección de *Salmonella* es la inhibición de la PCR. Debido a la complejidad de las matrices alimentarias, la cantidad de sustancias que pueden causar la inhibición de la técnica es elevada. La eliminación de todas las sustancias que interfieren en la reacción es imposible para las técnicas de purificación de ADN disponibles hoy en día. Como consecuencia, aquellas técnicas de detección de *Salmonella* que carecen de un control para la inhibición de la detección pueden producir falsos resultados negativos. Es estrictamente necesario para aquellas técnicas diseñadas para la detección de *Salmonella* el incluir un control interno de amplificación que permita la detección de falsos negativos. Obviamente la no aparición del control interno, siempre y cuando aparezcan otros amplicones específicos de los serotipos detectados, no invalida el resultado.

Puesto que existen más de 2500 serotipos de *Salmonella* y sólo algunos de ellos se suelen relacionar con patologías humanas, es muy útil obtener información sobre el tipo de *Salmonella* presente en los alimentos. El serotipo de *Salmonella*, además del fagotipo o la información sobre susceptibilidad antimicrobiana son muy útiles para estimar el origen de la infección, para establecer relaciones entre diferentes muestras implicadas en el mismo brote, o para predecir la gravedad de ciertas infecciones. Sin embargo, la mayoría de las técnicas de detección de *Salmonella* sólo proporcionan información sobre la ausencia o presencia de *Salmonella*.

El documento más cercano del estado de la técnica es, J. of Clinical Microbiology Apr. 2004 pág. 1734-1738, en el que se describe una PCR múltiple que permite la detección y tipificación de *Salmonella* en muestras clínicas humanas. No obstante la presente invención se refiere a la detección de *Salmonella* en muestras alimentarias, las cuales poseen matrices mucho más complejas. Existen multitud de matrices alimentarias, diferentes en propiedades organolépticas, texturas, composición, aditivos como colorantes, estabilizantes, conservantes, etc. Estas matrices, debido a esta naturaleza tan diversa y compleja, presentan inhibidores que la presente invención supera, gracias a la exhaustiva puesta a punto de todas las condiciones implicadas en ella (diseño de oligonucleótidos específicos, el necesario enriquecimiento de *Salmonellas* y por tanto la dilución de los inhibidores, adición de facilitadores de PCR y optimización de concentraciones de reactivos). Esta optimización minimiza las interferencias, tanto de inhibidores como de otros microorganismos existentes en los alimentos. Se garantizaría así, la detección específica de *Salmonella* en muestras alimentarias, ofreciendo además información sobre el serotipo y fagotipo. Otra de las ventajas asociadas a la presente invención es la rapidez en la ejecución del procedimiento, además de la escasa complejidad técnica e instrumental aso-

ciada, fácilmente asumible por los Laboratorios, Empresas o Instituciones encargados del control alimentario. Todo esto sumado a una fácil interpretación de los resultados.

Breve descripción de las figuras

5

Las figuras muestran ejemplos de la interpretación de resultados positivos y negativos de la PCR múltiple en varios tipos de alimentos, debido a la presencia o ausencia de bandas de amplificación en geles de electroforesis en agarosa. Así mismo se observa la presencia de la banda de control interno de amplificación y marcadores de peso molecular, lo que facilita la detección de inhibición de la PCR y la determinación del tamaño molecular de los fragmentos genéticos a estudiar.

10

Figura 1. Las muestras que aparecen en el gel de agarosa al 2% son los productos de PCR resultantes de las 9 extracciones realizadas con la resina, a partir de una muestra de carne bovina cruda tal y como se describe en el ejemplo 1. En la calle izquierda está el marcador de peso molecular. A la derecha aparecen indicados con flechas los tamaños de las bandas (A: 204 pb, banda específica del género *Salmonella*; B: 401 pb, banda específica de *Salmonella Typhimurium*; C: 990 pb, control interno de amplificación [CIA]).

15

Figura 2. Las muestras que aparecen en el gel de agarosa al 2% son los productos de PCR procedentes de las 9 extracciones realizadas con la resina a partir de una muestra de bacalao, tal y como se describe en el ejemplo 2. En la calle izquierda está el marcador de peso molecular. A la derecha aparecen indicados con flechas los tamaños de las bandas (A: 204 pb, banda específica del género *Salmonella*; B: 304 pb banda específica del *Salmonella Enteritidis*; C: 990 pb, control interno de amplificación).

20

Figura 3. Las 9 primeras muestras corresponden a los productos de PCR procedentes de las nueve extracciones realizadas con la resina (tres réplicas en tres días diferentes) con crema pastelera como matriz alimentaria, tal y como se describe en el ejemplo 3. La muestra siguiente es una extracción de ADN de una cepa de *Salmonella enterica* serotipo *Typhimurium* realizada por ebullición. La muestra siguiente es un producto de PCR de la extracción de ADN de una cepa de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis realizada por ebullición. La muestra siguiente es un control negativo sin ADN. La calle de la derecha corresponde al marcador de peso molecular. A la derecha aparecen indicados con flechas los tamaños de las bandas. La no aparición del control interno, siempre y cuando aparezcan otros amplicones específicos de los serotipos detectados, no invalida el resultado, ya que el CIA compite en el proceso de amplificación con el resto de amplicones (A: 204 pb, banda específica del género *Salmonella*; B: 304 pb, banda específica de *Salmonella Typhimurium*; C: 401 pb, banda específica de *Salmonella Enteritidis*).

25

30

35 Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para la detección y tipificación de microorganismos del género *Salmonella* en muestras alimentarias, caracterizado porque comprende:

40

- a) enriquecer los microorganismos presentes en la muestra alimentaria;
- b) extraer el ADN del cultivo resultante del paso anterior,
- c) realizar una PCR múltiple, con la pareja de oligonucleótidos definida por las SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 6 y al menos una de las parejas de oligonucleótidos definidas en las SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 12; y ADN quimérico definido en SEQ ID NO: 15 como control interno de amplificación (CIA).
- d) revelar la correspondiente amplificación de bandas e interpretar los resultados obtenidos.

45

50

El paso b) de extracción de ADN del cultivo resultante puede realizarse por ejemplo, mediante el uso de resinas quelantes y de intercambio iónico. Estas resinas pueden ser naturales (aluminosilicatos) como zeolitas, arcillas minerales y feldspatos. O de naturaleza sintética como óxidos metálicos hidratados (óxido de titanio hidratado), sales insolubles de metales polivalentes (fosfato de titanio), sales insolubles de heteropoliácidos (molibdofosfato amónico), sales complejas basadas en hexacianoferratos insolubles y zeolitas sintéticas.

55

Estas resinas poseen una elevada afinidad por los iones metálicos polivalentes y se emplean para superar los inhibidores de PCR presentes en el ADN de la muestra.

60

En el apartado c) previo, que hace referencia a los oligonucleótidos diseñados para la PCR múltiple objeto de la presente invención, se han seguido una serie de premisas destinadas a la consecución de una óptima reacción de amplificación. Estas son las siguientes:

- a) Diseñar oligonucleótidos que no interaccionen entre sí, es decir, que no formen oligómeros.
- b) Que tengan temperaturas de anillamiento similares.
- c) Que cada pareja amplifique una única secuencia diana.

65

ES 2 300 174 B1

d) Que generen amplicones o bandas de tamaño lo suficientemente diferente, como para poder ser separados y diferenciados tras la amplificación.

Los iniciadores para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en formato múltiple se han diseñado a partir de secuencias genéticas diana publicadas y válidas en la bibliografía. Aun así todos los iniciadores diseñados fueron nuevos y no descritos anteriormente. Para el diseño de estos cebadores se utilizó el programa informático Jellyfish y secuencias genéticas obtenidas del Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Se tuvo en cuenta, que los productos de amplificación obtenidos con cada una de las parejas de iniciadores se ajustaran a tamaños idénticos a bandas de marcador de peso molecular, con la intención de facilitar la interpretación de los resultados. Los productos de amplificación diseñados iban dirigidos a los tipos de *Salmonella* más importantes y más frecuentemente descritos en el Estado de la técnica.

Se diseñaron cebadores específicos de género *Salmonella* para que amplificaran un fragmento de 204 pb. Estos iniciadores se diseñaron sobre las secuencias del GenBank AY081185, Y15844, X07835, AL627274, AF039309 y M31424. En base a la secuencia AF370707 se diseñó una pareja de cebadores específicos del serotipo Enteritidis y que amplificaban un fragmento de 304 pb.

Se diseñó una pareja de cebadores que amplifica un fragmento de 401 pb en *Salmonella Typhimurium* sobre la secuencia del GenBank AE008757. Se diseñó una pareja de cebadores (104F y 104R) sobre la secuencia AF275268 que producía un amplicón de 102 pb. Esta secuencia sería específica de los fagotipos DT104 y U302 dentro de *Salmonella Typhimurium*. Se desarrolló una pareja de cebadores sobre la secuencia de la abejuosa sintasa (X61917) que amplifica un producto de 502 pb en aquellas salmonelas pertenecientes al grupo serológico C2. Utilizamos la secuencia de la delección del flagelo de segunda fase del trabajo previo de Garaizar y colaboradores. (Garaizar, J., Porwollik, S., Echeita, A., Rementeria, A., Herrera, S., Wong, M-Y., Frye, J., Usera, M. A., McClelland, M. (2002) DNA microarray-based typing of an atypical monophasic *Salmonella enterica* serovar. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 2074-2078), para cebadores que permitieran amplificar un fragmento de 705 pb, cuya amplificación diferenciaría *Salmonella Typhimurium* DT104/U302 y *Salmonella* I 4,5,12:i:-.

Los iniciadores utilizados, junto a la diana de amplificación reconocida y el tamaño del producto de amplificación esperado aparecen en la Tabla 1.

TABLA 1

Oligonucleótidos, dianas de amplificación y longitud del amplicón

Oligonucleótidos (SEQ ID NO)	Diana de amplificación	Longitud del amplicón (pb)
SAL-1F (SEQ ID NO 1)	<i>Salmonella</i> Typhimurium DT104/U302	102
SAL-1R (SEQ ID NO 2)		
SAL-2F (SEQ ID NO 3)	<i>Salmonella</i> genus	204
SAL-2R (SEQ ID NO 4)		
SAL-3F (SEQ ID NO 5)	<i>Salmonella</i> Enteritidis	304
SAL-3R (SEQ ID NO 6)		
SAL-4F (SEQ ID NO 7)	<i>Salmonella</i> Typhimurium	401
SAL-4R (SEQ ID NO 8)		
SAL-5F (SEQ ID NO 9)	<i>Salmonella</i> grupo serológico C2	502
SAL-5R (SEQ ID NO 10)		
SAL-6F (SEQ ID NO 11)	<i>Salmonella</i> serotipo 4,5,12:i:-	705
SAL-6R (SEQ ID NO 12)		

ES 2 300 174 B1

Se creó un control interno de amplificación (CIA) de PCR diseñando una pareja de cebadores u oligonucleótidos quiméricos. La mitad interna de estos cebadores iba dirigida a amplificar un fragmento de 948 pb de una muestra de ADN del fago lambda (SEQ ID NO: 15), mientras que la mitad más externa eran dos de los iniciadores utilizados en la PCR múltiple (SAL-1F y SAL-3R). La secuencia de estos oligonucleótidos quiméricos se muestra en la Tabla 2. Se hizo una primera amplificación con estos oligonucleótidos en condiciones estándar de PCR dando lugar a un producto amplificado que una vez purificado y diluido se utilizaba como control interno de amplificación de la PCR múltiple, dado que era amplificado por los mismos cebadores de la reacción de detección de *Salmonella*. Este CIA quimérico tenía un tamaño total de 990 pb.

En una realización preferente del procedimiento objeto de la presente invención, en el paso b correspondiente a la PCR múltiple se incluyen todas las parejas de oligonucleótidos definidos por las secuencias SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 12. Esta realización es la más adecuada si el objetivo es la detección de los principales serotipos de *Salmonella*. Las parejas de iniciadores también podrían ser seleccionadas específicamente en la detección/confirmación de colonias de *Salmonella* en cultivo.

Sin embargo, para poder seguir contando con el control interno de amplificación debe incluirse en la reacción los oligonucleótidos Sal-1F (SEQ ID NO: 1) y Sal-3R (SEQ ID NO: 6).

El procedimiento para la detección y tipificación de microorganismos del género *Salmonella* en muestras alimentarias objeto de la presente invención, tiene como origen el enriquecimiento de microorganismos presentes en la muestra alimentaria y consiste en homogeneizar una porción de la muestra alimentaria a estudiar de un rango de 1-50 g en 9-450 ml de un medio de cultivo como LB, TSB, BPW o caldo nutritivo estándar I y II e incubarla durante 18-24 h en un rango de temperaturas de 35-37°C. Este procedimiento puede realizarse con porciones de la muestra alimentaria de tamaño comprendido entre 1 y 50 g, con el correspondiente ajuste del volumen de medio de cultivo en el que se realiza el homogeneizado.

Los procedimientos clásicos consisten en 18-24 h de enriquecimiento primario, 24 a 48 h de cultivo selectivo en placas de cultivo y confirmación bioquímica o serológica de las colonias sospechosas (de acuerdo con la normativa ISO 6579/2001).

En una realización concreta de la presente invención, la PCR múltiple comprende, de forma secuencial, los siguientes pasos:

- 1) desnaturalización inicial: 2 min a 95°C,
- 2) amplificación: 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 57°C y 2 min a 72°C, y
- 3) elongación final: 5 min a 72°C.

Además, en una realización preferente de dicho procedimiento para la detección y tipificación de microorganismos del género *Salmonella* en muestras alimentarias, el procedimiento está caracterizado porque dicha PCR comprende una mezcla de reacción que contiene glicerol. Este glicerol actúa como un agente facilitador de la PCR, minimizando la posible interferencia por parte de los inhibidores de PCR presentes en las matrices alimentarias. Este facilitador de la PCR puede añadirse a la mezcla de reacción en una proporción de entre 0,1 y 5% del volumen final.

Al respecto de esta mezcla de reacción, en una realización preferente de la invención, comprende:

- 1,5 mM MgCl₂,
- 200 μM desoxinucleótidos trifosfato,
- 1 U Taq polimerasa, y
- 60 pmol ADN de control interno de amplificación (CIA) por muestra.

Las concentraciones anteriores pueden modificarse dentro de los rangos de: 1-2,5 mM de MgCl₂, 150-300 μM de desoxinucleótidos trifosfato, 0,5-2 U Taq polimerasa y 10-100 pmol ADN de control interno de amplificación (SEQ ID NO: 15).

Finalmente, en una realización preferente de dicho procedimiento para la detección y tipificación de microorganismos del género *Salmonella* en muestras alimentarias objeto de la presente solicitud de patente, el revelado de la amplificación de bandas se realiza mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2,5% en tampón TBE (peso/volumen) teñido con 2 μg de bromuro de etidio por ml, y posterior visualización con luz ultravioleta. Pudiendo realizarse también en un gel de agarosa de concentraciones comprendidas entre 1,5-3% y cuya concentración de bromuro de etidio se encuentre entre 1 y 4 μg por ml. Como alternativa puede utilizarse una tinción con menor riesgo químico basada en el uso de colorantes intercalantes no mutagénicos, como azul de metileno o violeta cristal, aunque con menor sensibilidad de detección en el ensayo.

ES 2 300 174 B1

El principio básico de la PCR múltiple es la amplificación (hasta un millón de veces) de las secuencias de ADN específicas de interés. Los productos de amplificación (amplicones) se separan en función de su tamaño mediante electroforesis en gel. Este método puede realizarse en pocas horas. La posibilidad de tener un resultado en un tiempo tan corto puede traducirse en un mejor control de la salud pública puesto que los alimentos industriales contaminados pueden eliminarse de la cadena alimentaria en periodos menores de tiempo previniendo las intoxicaciones. Se trata de un método muy sencillo capaz de detectar *lufc*. Esta sensibilidad no se ve alterada por la presencia de otras bacterias, como puede comprobarse en el Ejemplo 3 descrito más adelante.

Por otro lado, la presente invención se refiere a un oligonucleótido definido en las secuencias SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 12. Así como al uso de al menos una pareja de dichos oligonucleótidos para la detección de *Salmonella* según el procedimiento previamente descrito.

Por último, la presente invención también se refiere a un kit para la detección y tipificación de microorganismos del género *Salmonella* en muestras alimentarias, caracterizado porque comprende los reactivos necesarios para llevar a cabo el procedimiento objeto de la presente invención. En una realización preferente, este kit contiene los oligonucleótidos previamente definidos, los tampones y reactivos citados, así como recipientes, y las instrucciones para su correcto uso.

Modo de realización de la invención

A continuación se describen, con carácter ilustrativo, unos ejemplos de realización de la invención, en modo alguno limitativo de la misma.

Ejemplo 1

Detección de Salmonella enterica serotipo Typhimurium en carne bovina cruda

Se realizaron tres inoculaciones en tres días separados. Cada día se realizaron tres extracciones, dando como resultado nueve ensayos de PCR múltiple.

En un primer paso del método según la presente invención, se lleva a cabo un paso de enriquecimiento. Porciones de 25 g de carne bovina cruda se añaden a 225 ml de BPW, se procesan en un homogeneizador digestor durante 2 minutos y posteriormente se incuban a 37°C durante 24 horas.

El nivel de inoculación de *Salmonella enterica* serotipo *Typhimurium* fue de 200 ufc por 25 g. El ADN molde empleado en la PCR múltiple se obtiene a partir del homogeneizado de carne bovina cruda empleando un método de extracción de ADN, basado en la utilización de resinas. Estas resinas poseen una elevada afinidad por los iones metálicos polivalentes y se emplean para superar los inhibidores de PCR presentes en el ADN de la muestra. 1,5 g de resina fue resuspendida en 25 ml de H₂O bidestilada. Las muestras fueron centrifugadas a 10.000 g y 4°C durante 5 min. Los depósitos resultantes fueron resuspendidos en 300 μ l de la resina al 6% mediante vórtex y fueron incubados a 56°C durante 20 min. A continuación se someten a vórtex a alta velocidad durante 10 segundos. Los tubos fueron situados en una placa térmica o un baño a 100°C durante 8 min. Después fueron vortexeadas durante 10 segundos a alta velocidad y enfriados inmediatamente en hielo. Los tubos fueron centrifugados durante 5 min a 14.000 g a 4°C y los sobrenadantes fueron transferidos a tubos nuevos.

5 μ l del ADN extraído del homogeneizado de matriz alimentaria fue añadida a la mezcla de reacción de PCR.

La mezcla optimizada consistía en MgCl₂ 1,5 mM, 200 μ M de cada uno de los desoxinucleótidos trifosfato, 1 U de Taq polimerasa y 60 pmol del ADN control interno de amplificación (CIA), por muestra en un volumen final de 25 μ l. Las secuencias y concentraciones de los oligonucleótidos se encuentran en las tablas 1 a 3. Adicionalmente, se utilizó 1,25 μ l de una solución al 10% de glicerol como facilitador de la PCR en la mezcla de reacción.

El proceso de amplificación se realizó en un termociclador siguiendo las siguientes condiciones: (i) un paso inicial de desnaturalización de 2 min a 95°C; (ii) 30 ciclos, donde cada ciclo consiste en 1 min a 95°C, 1 min a 57°C, y 2 min a 72°C; y (iii) un paso final de elongación de 5 min a 72°C.

Los productos de PCR fueron sometidos a una electroforesis en un gel de agarosa al 2,5% (peso/volumen), teñido con 2 μ g de bromuro de etidio por ml, y fotografiados bajo luz UV. En cada PCR, se añadió un control con ADN no molde para detectar posibles contaminaciones con ADN exógeno. Ver la figura 1.

Un resultado positivo debería dar una banda de 990 pb que corresponde al CIA, una banda de 401 pb que corresponde a la detección de *Salmonella enterica* serotipo *Typhimurium* y una banda de 204 pb que corresponde al género *Salmonella*. Estas bandas fueron observadas en los nueve experimentos.

ES 2 300 174 B1

Ejemplo 2

Detección de Salmonella enterica serotipo Enteritidis en bacalao

5 Se realizaron tres inoculaciones en tres días separados. Cada día se realizaron tres extracciones, dando como resultado nueve ensayos de PCR múltiple de muestras extraídas en días consecutivos.

En un primer paso del método según la presente invención, se lleva a cabo un paso de enriquecimiento. Porciones de 25 g de bacalao se añadieron a 225 ml de BPW, se procesan en un homogeneizador digestor durante 2 minutos y posteriormente se incuban a 37°C durante 24 horas.

El nivel de inoculación de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis fue de 100 ufc por 25 g. El ADN molde empleado en la PCR múltiple se obtiene a partir del homogeneizado de bacalao empleando el método de extracción de ADN. 5 µl del ADN extraído del homogeneizado de matriz alimentaria fue añadida a la mezcla de reacción de PCR.

La mezcla optimizada consistía en MgCl₂ 1,5 mM, 200 µM de cada uno de los desoxinucleótidos trifosfato, 1 U de Taq polimerasa y 60 pmol del ADN control interno de amplificación (CIA), por muestra. Las secuencias y concentraciones de los oligonucleótidos se encuentran en las tablas 1 a 3. Adicionalmente, se utilizó 1,25 µl de una solución al 10% de glicerol como favorecedor de la PCR en la mezcla de reacción.

El proceso de amplificación se realizó en un termociclador siguiendo las siguientes condiciones: (i) un paso inicial de desnaturalización de 2 min a 95°C; (ii) 30 ciclos, donde cada ciclo consiste en 1 min a 95°C, 1 min a 57°C, y 2 min a 72°C; y (iii) un paso final de elongación de 5 min a 72°C.

Los productos de PCR fueron sometidos a una electroforesis en un gel de agarosa al 2,5% (peso/volumen), teñido con 2 µg de bromuro de etidio por ml, y fotografiados bajo luz UV. En cada PCR, se añadió un control con ADN no molde para detectar posibles contaminaciones con ADN exógeno. Figura 2.

Un resultado positivo debería dar una banda de 990 pb que corresponde al CIA, una banda de 304 pb que corresponde a la detección de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis y una banda de 204 pb que corresponde al género *Salmonella*. Estas bandas fueron observadas en los nueve experimentos.

Ejemplo 3

Detección de Salmonella enterica serotipos Enteritidis y Typhimurium en crema pastelera

Se realizaron tres inoculaciones en tres días separados. Cada día se realizaron tres extracciones, dando como resultado nueve ensayos de PCR múltiple de muestras extraídas en días consecutivos.

En un primer paso del método según la presente invención, se lleva a cabo un paso de enriquecimiento. Porciones de 25 g de crema pastelera se añaden a 225 ml de BPW, se procesan en un homogeneizador digestor durante 2 minutos y posteriormente se incuban a 37°C durante 24 horas.

En este ensayo se inocularon dos serotipos diferentes de *Salmonella enterica*, Enteritidis y Typhimurium. Además se inocularon *Escherichia coli* CECT 679 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Los niveles de inoculación de *Salmonella enterica* serotipos Enteritidis y Typhimurium fueron 10 y lufc por 25 g, respectivamente. Los niveles de inoculación de *Escherichia coli* CECT 679 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 fueron de 5 y 60 ufc por 25 g, respectivamente. El ADN molde a utilizar en la PCR múltiple se obtiene a partir de homogeneizado de crema pastelera empleando el método de extracción de ADN. 5 µl del ADN extraído del homogeneizado de matriz alimentaria fue añadido a la mezcla de reacción de PCR.

La mezcla de reacción PCR optimizada consistió en MgCl₂ 1,5 mM, 200 µM de cada uno de los cuatro desoxinucleótidos trifosfato, 1 U de Taq polimerasa y 60 pmol de ADN IAC por muestra. Las secuencias y concentraciones de los oligonucleótidos se indican en las Tablas 1 a 3. Adicionalmente, se empleó 1,25 µl de una solución de glicerol al 10% como favorecedor de la mezcla de reacción de PCR.

El proceso de amplificación se realizó en un termociclador siguiendo las siguientes condiciones: (i) un paso inicial de desnaturalización de 2 min a 95°C; (ii) 30 ciclos, donde cada ciclo consiste en 1 min a 95°C, 1 min a 57°C, y 2 min a 72°C; y (iii) un paso final de elongación de 5 min a 72°C.

Los productos de PCR fueron sometidos a una electroforesis en un gel de agarosa al 2,5% (peso/volumen), teñido con 2 µg de bromuro de etidio por ml, y fotografiados bajo luz UV. En cada PCR, se añadió un control con ADN no molde para detectar posibles contaminaciones con ADN exógeno. Ver la figura 3.

Un resultado positivo debería dar una banda de 990 pb que corresponda al CIA, una banda de 401 pb correspondiente a la detección de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium, una banda de 304 pb correspondiente a la

ES 2 300 174 B1

detección de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis y una banda de 204 pb que corresponde al género *Salmonella*. Estas bandas fueron observadas en los nueve experimentos. En el control negativo sólo debería aparecer una banda de 990 pb correspondiente al CIA, indicando la ausencia de inhibición de la PCR y de contaminación por ADN exógeno. Esto ocurrió en todos los experimentos.

TABLA 2

Oligonucleótidos y sus secuencias

Oligonucleótidos	Secuencias
SAL-1F (SEQ ID NO 1)	ATG CGT TTG GTC TCA CAG CC
SAL-1R (SEQ ID NO 2)	GCT GAG GCC ACG GAT ATT TA
SAL-2F (SEQ ID NO 3)	ATC GCT GAC TTA TGC AAT CG
SAL-2R (SEQ ID NO 4)	CGG GTT GCG TTA TAG GTC TG
SAL-3F (SEQ ID NO 5)	TGT GTT TTA TCT GAT GCA AGA GG
SAL-3R (SEQ ID NO 6)	TGA ACT ACG TTC GTT CTT CTG G
SAL-4F (SEQ ID NO 7)	TTG TTC ACT TTT TAC CCC TGA A
SAL-4R (SEQ ID NO 8)	CCC TGA CAG CCG TTA GAT ATT
SAL-5F (SEQ ID NO 9)	ACC GAG CCA ACG ATT ATC AA
SAL-5R (SEQ ID NO 10)	AAT AGG CCG AAA CAA CAT CG
SAL-6F (SEQ ID NO 11)	CGC TGT GGT GTA GCT GTT TC
SAL-6R (SEQ ID NO 12)	TCT GCC ACT TCT TCA CGT TG
IC-F ^a (SEQ ID NO 13)	atg cgt ttg gtc tca cag ccT TCA TTT CAG CAT TTA TTG GTT GT
IC-R ^a (SEQ ID NO 14)	tga act acg ttc gtt ctt ctg gGC TTT TCT AAT TTA ACC TTT GTC AGG

^a Oligonucleótidos empleados para crear el control interno de amplificación químérico (CIA). Los extremos 3' (en mayúsculas) fueron diseñados para amplificar un fragmento del interior de la secuencia del fago lambda, y los extremos 5' (en minúsculas) correspondían a las secuencias SAL-1F y SAL-3R.

ES 2 300 174 B1

TABLA 3

Oligonucleótidos y concentraciones

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Oligonucleótidos	Concentraciones
SAL-3R, SAL-4R, SAL-4F	200 nM
SAL-1F, SAL-5F, SAL-5R, SAL-6F, SAL-6R, SAL-3F	100 nM
SAL-1R	75 nM
SAL-2F, SAL-2R	25 nM

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para la detección y tipificación de microorganismos del género *Salmonella* en muestras alimentarias, **caracterizado** porque comprende:
- a) enriquecer los microorganismos presentes en la muestra alimentaria;
 - b) extraer el ADN del cultivo resultante del paso anterior,
 - 10 c) realizar una PCR múltiple, con la pareja de oligonucleótidos definida por las SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 6 y al menos una de las parejas de oligonucleótidos definidas en las SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 12; y ADN quimérico definido en SEQ ID NO: 15 como control interno de amplificación (CIA).
 - 15 d) revelar la correspondiente amplificación de bandas.
2. Un procedimiento para la detección y tipificación de microorganismos del género *Salmonella* en muestras alimentarias según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicha etapa b correspondiente a la PCR múltiple se realiza con todos los oligonucleótidos definidos en las secuencias SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 12.
- 20 3. Un procedimiento para la detección y tipificación de microorganismos del género *Salmonella* en muestras alimentarias según una de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado** porque dicha etapa de enriquecimiento de microorganismos presentes en la muestra alimentaria comprende homogeneizar una porción de la muestra alimentaria a estudiar de 25 g e incubarla durante 24 h a 37°C en 225 ml de medio de cultivo BPW.
- 25 4. Un procedimiento para la detección y tipificación de microorganismos del género *Salmonella* en muestras alimentarias según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque dicha PCR múltiple comprende, de forma secuencial, los siguientes pasos:
- 30 1) desnaturalización: 2 min a 95°C,
 - 2) amplificación: 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 57°C y 2 min a 72°C, y
 - 35 3) elongación: 5 min a 72°C.
5. Un procedimiento para la detección y tipificación de microorganismos del género *Salmonella* en muestras alimentarias según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque dicha PCR comprende una mezcla de reacción que contiene un 0,5% de una solución de glicerol al 10%.
- 40 6. Un procedimiento para la detección y tipificación de microorganismos del género *Salmonella* en muestras alimentarias según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque dicha PCR comprende una mezcla de reacción que contiene:
- 45 - 1,5 mM MgCl₂,
 - 200 μM desoxinucleótidos trifosfato,
 - 1 U Taq polimerasa, y
 - 50 - 60 pmol ADN de control interno de amplificación(CIA) por muestra.
7. Un procedimiento para la detección y tipificación de microorganismos del género *Salmonella* en muestras alimentarias según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque dicho revelado de la amplificación de bandas se realiza mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2,5% (peso/volumen) teñido con 2 μg de bromuro de etidio por ml, posterior visualización con luz ultravioleta.
- 55 8. Un oligonucleótido definido en las secuencias SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 12.
9. Uso de al menos una pareja de oligonucleótidos definidos en la reivindicación 8 para la detección de *Salmonella* según el procedimiento descrito en las reivindicaciones 1 a 7.
- 60 10. Un kit para la detección y tipificación de microorganismos del género *Salmonella* en muestras alimentarias, **caracterizado** porque comprende los reactivos necesarios para llevar a cabo el procedimiento definido en las reivindicaciones 1 a 7.
- 65

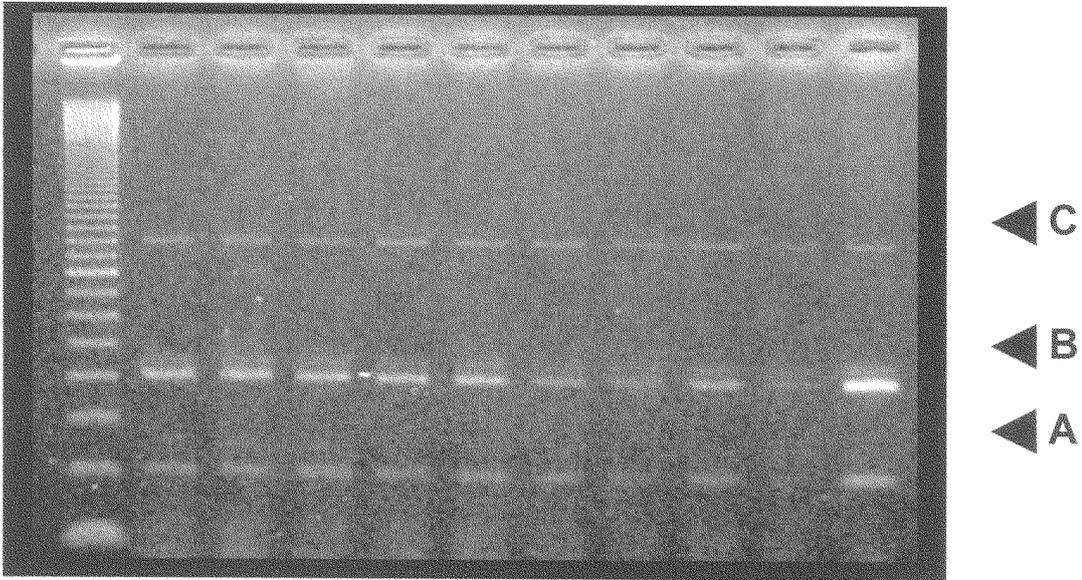


Figura 1

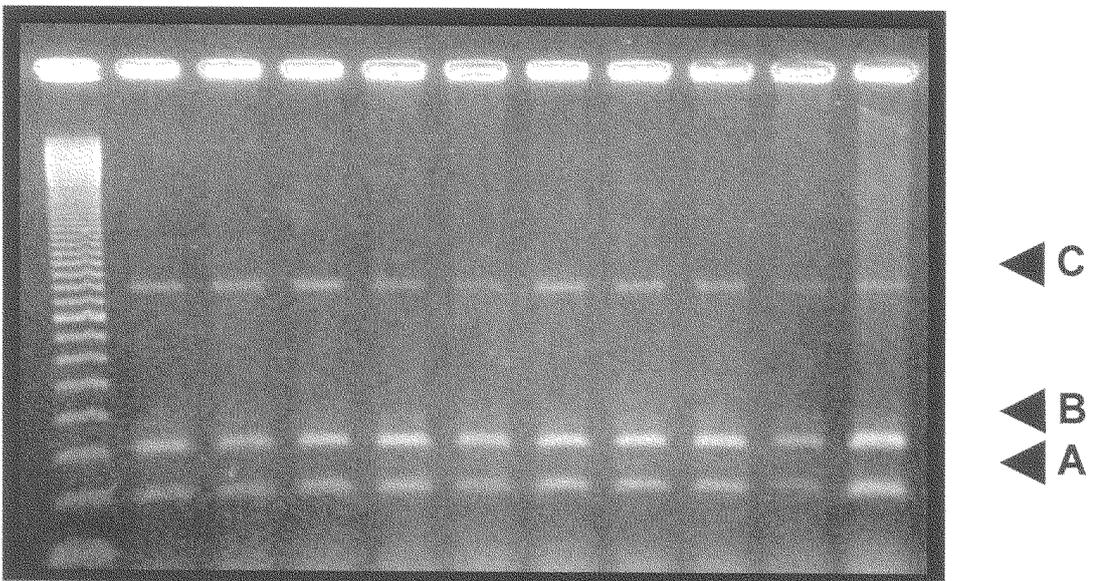


Figura 2

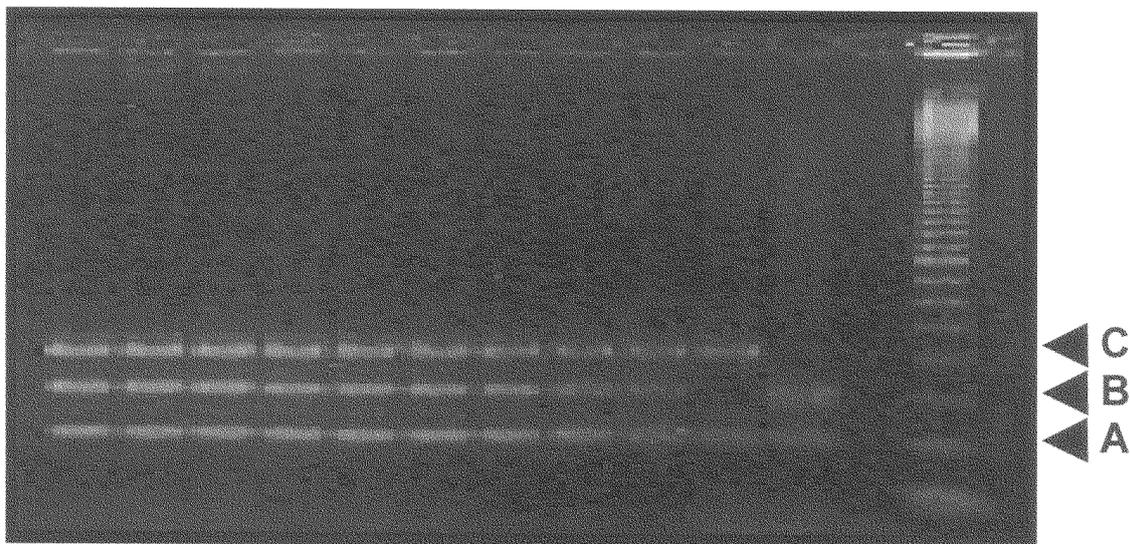


Figura 3

ES 2 300 174 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea y Laboratorios Bromatológicos Araba S.A.

- 5 <120> Detección y tipificación de Salmonella en muestras alimentarias mediante PCR
- <130> 5.050.033BIL
- 10 <160> 14
- <170> PatentIn version 3.3
- 15 <210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> *Salmonella enterica* serotipo *Typhimurium* DT104/U302
- 20 <223> SAL-1F
- <400> 1
- 25 atgcgtttgg tctcacagcc 20
- <210> 2
<211> 20
- 30 <212> DNA
<213> *Salmonella enterica* serotipo *Typhimurium* DT104/U302
- <223> SAL-1R
- 35 <400> 2
- gctgaggcca cggatattta 20
- 40 <210> 3
<211> 20
<212> DNA
- 45 <213> *Salmonella* genus
<223> SAL-2F
- <400> 3
- 50 atcgctgact tatgcaatcg 20
- <210> 4
- 55 <211> 20
<212> DNA
<213> *Salmonella* genus
- <223> SAL-2R
- 60 <400> 4
- cgggttgcgt tataggtctg 20
- 65 <210> 5
<211> 23

ES 2 300 174 B1

	<212> DNA	
	<213> <i>Salmonella enterica</i> serotipo Enteritidis	
	<223> SAL-3F	
5	<400> 5	
	tggttttat ctgatgcaag agg	23
10	<210> 6	
	<211> 22	
	<212> DNA	
15	<213> <i>Salmonella enterica</i> serotipo Enteritidis	
	<223> SAL-3R	
	<400> 6	
20	tgaactacgt tcgttcttct gg	22
	<210> 7	
25	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> <i>Salmonella enterica</i> serotipo Typhimurium	
30	<223> SAL-4F	
	<400> 7	
	ttgttcaactt tttaccctg aa	22
35	<210> 8	
	<211> 21	
	<212> DNA	
40	<213> <i>Salmonella enterica</i> serotipo Typhimurium	
	<223> SAL-4R	
45	<400> 8	
	ccctgacagc cgtagatat t	21
50	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> <i>Salmonella enterica</i> grupo serológico C2	
55	<223> SAL-5F	
	<400> 9	
60	accgagccaa cgattatcaa	20
	<210> 10	
	<211> 20	
65	<212> DNA	
	<213> <i>Salmonella enterica</i> grupo serológico C2	
	<223> SAL-5R	

ES 2 300 174 B1

	<code><400> 10</code>			
		<code>aataggccga aacaacatcg</code>		20
5				
		<code><210> 11</code>		
		<code><211> 20</code>		
		<code><212> DNA</code>		
10		<code><213> <i>Salmonella enterica</i> serotipo 4,5,12:i:-</code>		
		<code><223> SAL-6F</code>		
		<code><400> 11</code>		
15				
		<code>cgctgtggtg tagctgtttc</code>		20
		<code><210> 12</code>		
20		<code><211> 20</code>		
		<code><212> DNA</code>		
		<code><213> <i>Salmonella enterica</i> serotipo 4,5,12:i:-</code>		
		<code><223> SAL-6R</code>		
25				
		<code><400> 12</code>		
		<code>tctgccactt cttcacgttg</code>		20
30				
		<code><210> 13</code>		
		<code><211> 44</code>		
		<code><212> DNA</code>		
35		<code><213> Oligonucleótido quimérico para CIA (Control Interno de Amplificación)</code>		
		<code><223> IC-F^a</code>		
		<code><400> 13</code>		
40				
		<code>atgcgtttgg ttcacagcc ttcattcag cattattgg ttgt</code>		44
		<code><210> 14</code>		
45		<code><211> 48</code>		
		<code><212> DNA</code>		
		<code><213> Oligonucleótido quimérico para CIA (Control Interno de Amplificación)</code>		
50		<code><223> IC-R^a</code>		
		<code><400> 14</code>		
		<code>tgaactacgt tegtcttct gggctttct aatttaacct ttgtcagg</code>		48
55				
		<code><210> 15</code>		
		<code><211> 948</code>		
60		<code><212> DNA</code>		
		<code><213> Artificial</code>		
		<code><220></code>		
65		<code><223> fragmento del fago lambda</code>		

ES 2 300 174 B1

<400> 15

5 ttcatttcag catttattgg ttgtatgaga gtagatagaa aaagacaact ctggcttgaa 60
 gctatcaaaa aactaagtag tgatgaaaac ttttcaaata tggaactcat cagcctcatt 120
10 tctaaatatg aagagttaag acgtaatgaa ccacagattc aagtggacga tgataaattc 180
 actaaattgt tttatgacaa tatccagaaa tatctgcttc gaatgagctc tggacatgca 240
15 attgttttat ttactatcac aagattagta gatgtcgttg gcgaaaagtc attagtttta 300
 ttcgatgaac cagaggttca tctgcatcca cctttgctct ctgctttttt acgaacatta 360
20 agcgacttac tcgatgcacg caatgggtga gcaataattg caactcattc cccagtagta 420
25 ctgcaagagg ttccaaaatc ctgcatgtgg aaagtcctac ggtcaagaga agcaataaat 480
 attatccgtc cggatattga gacattcggg gagaacttag gtgttttaac tcgtgaggtg 540
30 tttttacttg aagtgacaaa ttctggatac caccacttat tatcgcagtc cgttgattca 600
 gagcttttctt atgaaacat tctaaaaaat tataatggtc agataggatt agaaggtcga 660
35 accgttttaa aagcgatgat aatgaacaga gatgaaggta aagtacaatg aaaaaactac 720
40 ctcttccagc gagaacttat agcgaaatgc ttaataaatg ctcggaaggt atgatgcaga 780
 taaagttag aaataatttc attactcact tccccacttt tttgcagaaa gaacaacaat 840
45 atagaatatt aagctcgaca ggtcagttat ttacctacga caggacacac cctcttgagc 900
50 ctacaacctt agtagttggt aacctgacaa aggttaaatt agaaaagc 948

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 300 174

② Nº de solicitud: 200600192

③ Fecha de presentación de la solicitud: 27.01.2006

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C12Q 1/68 (2006.01)
C12R 1/42 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ALVAREZ, J. et al., "Development of a Multiplex PCR Technique for Detection and Epidemiological Typing of Salmonella in Human Clinical Samples.", J. CLIN. MICROBIOL., 2004, Vol. 42, No. 2, páginas 1734-1738. Tablas 1 y 2; página 1737.	1,2,4,6-10
Y	Todo el documento.	3,5
Y	MYINT, M.S. et al., "The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated Salmonella in raw poultry compared to conventional culture.", FOOD MICROBIOL., 2006 Sep, Vol. 23, No. 6, páginas 599-604. [publicación 'on line': 08.11.2005]. Materiales y Métodos.	3
Y	AL-SOUD, W.A. et al., "Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat.", J. CLIN. MICROBIOL., 2000, Vol. 38, No. 12, páginas 4463-4470. Materiales y Métodos; Tabla 1.	5
A	PRITCHETT, L.C. et al., "Identification of DT104 and U302 phage types among Salmonella enterica serotype Typhimurium by PCR.", J. CLIN. MICROBIOL., 2000, Vol. 38, No. 9, páginas 3484-3488. Todo el documento.	1-10
A	US 6004747 A (OLSEN et al.) 21.12.1999, todo el documento.	1-10
A	AGRON, P.G. et al., "Identification by subtractive hybridization of sequences specific for Salmonella enterica serovar enteritidis.", APPL. ENVIRON. MICROBIOL., 2001, Vol. 67, No. 11, páginas 4984-4991. Todo el documento.	1-10

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
05.05.2008

Examinador
J.L. Vizán Arroyo

Página
1/2



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 300 174

② Nº de solicitud: 200600192

③ Fecha de presentación de la solicitud: 27.01.2006

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C12Q 1/68 (2006.01)
C12R 1/42 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	OLIVEIRA, S.D. et al., "Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for Salmonella detection.", LETT. APPL. MICROBIOL., 2003, Vol. 36, No. 4, páginas 217-221. Todo el documento.	1-10
A	EP 1538222 A1 (INSTITUT PASTEUR) 08.06.2005, todo el documento.	1-10
A	CANDRIAN, U. "Polymerase chain reaction in food microbiology", J. MICROBIOL. METHODS, 1995, Vol. 23, No. 1, páginas 89-103. Todo el documento.	1-10

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
05.05.2008

Examinador
J.L. Vizán Arroyo

Página
2/2