



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 327 703**

② Número de solicitud: 200801267

⑤ Int. Cl.:
C12Q 1/62 (2006.01)
C12R 1/42 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **30.04.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **02.11.2009**

Fecha de la concesión: **24.06.2010**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **07.07.2010**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
07.07.2010

⑰ Titular/es: **Universidad del País Vasco
Barrio Sarriena, s/n
48940 Leioa, Vizcaya, ES
LABORATORIOS BROMATOLÓGICOS ARABA,
S.A.**

⑱ Inventor/es: **Garaizar Candina, Javier;
Rementeria Ruiz, Aitor;
Bikandi Bikandi, Joseba;
Lopitz Otsoa, Fernando;
Martínez Ballesteros, Llargi;
Pérez Aguirre, Fernando y
Santaolalla Ruiz de Galarreta, Isabel**

⑳ Agente: **Arias Sanz, Juan**

⑳ Título: **Métodos y reactivos para la detección de *Salmonella* sp.**

㉑ Resumen:

Métodos y reactivos para la detección de *Salmonella* sp. La invención se relaciona con un método *in vitro* para la detección de bacterias del género *Salmonella* sp. mediante una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa empleando cebadores específicos para dicho patógeno a partir de muestras de ADN y de ARN de dicho microorganismo. Dicho método resulta de utilidad en la detección de microorganismos viables y no viables de *Salmonella* sp. en muestras ambientales, clínicas y alimentarias. Asimismo, la invención también se relaciona con un kit para la puesta en práctica de dicho método.

ES 2 327 703 B1

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y reactivos para la detección de *Salmonella* sp.

5 **Campo de la invención**

La invención se relaciona con un método *in vitro* para la detección de bacterias del género *Salmonella* sp. mediante una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa empleando cebadores específicos para dicho patógeno a partir de muestras de ADN y de ARN de dicho microorganismo. Dicho método resulta de utilidad en la detección de microorganismos viables y no viables de *Salmonella* sp. en muestras ambientales, clínicas y alimentarias. Asimismo, la invención también se relaciona con un kit para la puesta en práctica de dicho método.

Antecedentes

15 La salmonelosis es una de las enfermedades alimentarias más comunes y más ampliamente extendida, producida por las bacterias del género *Salmonella* sp. Se ha estimado que *Salmonella* sp. es responsable de más de 1,4 millones de casos de enterocolitis y de más de 500 muertes al año en Estados Unidos.

20 El sistema taxonómico actual de *Salmonella* sp. ha reagrupando todas las cepas de *Salmonella* sp. (patógenas o no) en dos únicas especies: *S. enterica* y *S. bongori*. Ésta última (previamente subespecie V) parece no ser patógena para el ser humano.

25 La especie *S. entérica* tiene seis subespecies (a veces como subgrupos bajo numeración romana): *enterica* (I); *salamae* (II); *arizonae* (IIIa); *diarizonae* (IIIb); *houtenae* (IV); *S. bongori* (V), ya incluida en una especie distinta; e *indica* (VI).

30 Cada subespecie a su vez, está formada por diversos serotipos, habiéndose identificado hasta la fecha más de 2.500. Una de ellas es *S. enterica* subsp. *enterica* (o subgrupo I) se divide en cinco serogrupos: A, B, C, D y E. A su vez, cada serogrupo comprende múltiples componentes, dando lugar a las serovariedades (serotipos).

Con importancia clínico epidemiológica, las más de 2500 serovariedades de *Salmonella* sp. pueden agruparse en tres divisiones ecológicas (sp. son subespecies):

- 35 1. *Salmonella* sp. adaptadas a vivir en el ser humano, entre ellas, *S. Typhi*, *S. Paratyphi* A, B y C;
2. *Salmonella* sp. adaptadas a hospederos no humanos, que circunstancialmente pueden producir infección en el hombre, entre ellas, *S. Dublin* y *S. Choleraesuis*;
- 40 3. *Salmonella* sp. sin adaptación específica de hospedero, que incluye a unas 1.800 serovariedades de amplia distribución en la naturaleza, las cuales causan la mayoría de las salmonelosis en el mundo.

45 La detección habitual de este patógeno incluye procedimientos basados en el cultivo y la identificación bioquímica de las colonias. El procedimiento normalizado de trabajo basado en el cultivo requiere siete días para confirmar la presencia de este patógeno en la muestra analizada. Estos procedimientos, aunque eficientes, son demasiado lentos como para poder ser empleados de forma sistemática en un gran número de muestras.

50 Alternativamente a los procedimientos basados en el cultivo y la identificación bioquímica de las colonias de *Salmonella* sp., existen numerosas técnicas para la detección de dicho patógeno basadas en la tecnología PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Además, mediante dicha tecnología también es posible detectar células vivas si se parte de ARN para realizar la PCR o células vivas y muertas si se parte de ADN genómico.

La solicitud de patente US6893847 describe oligonucleótidos especialmente diseñados para detectar el ARNm del gen *invA* de *Salmonella* sp.

55 Fey *et al.* (Applied and Environmental Microbiology, 2004 vol. 70(6): 3618-3623) han desarrollado un método para la detección de ARN bacteriano en muestras de agua basado en el empleo de una PCR a tiempo real. Para poner a prueba el método desarrollado, emplean el gen *invA* y el ARNr 16S de *Salmonella enterica* serovariente Thyphimurium.

60 Fukushima, H. *et al.* (Journal of Clinical Microbiology, 2003, vol. 41(11): 5134-5146) describen un ensayo de PCR a Tiempo Real Duplex empleando SYBR Green para la detección de 17 especies de patógenas presentes en agua y comida partiendo de ADN genómico. Entre las especies patógenas detectadas se encuentra *Salmonella* sp. Para su detección emplean cebadores dirigidos a amplificar el gen *invA* de *Salmonella* sp.

65 Por otro lado, en el estado de la técnica también se han desarrollado métodos que permiten la detección de múltiples especies y serovariantes de *Salmonella* sp. mediante una única reacción de PCR:

ES 2 327 703 B1

Nam, H. *et al.* (International Journal of Food Microbiology, 2005, vol. 102: 161-171) describen un ensayo de PCR a Tiempo Real empleando SYBR Green para la detección de distintas especies de *Salmonella* sp. (ver Tabla 1 de dicha publicación) a partir de ADN. Para ello han diseñado una pareja de cebadores que amplifica de forma específica un fragmento de 119 pb del gen *invA* de *Salmonella*.

5

La solicitud de patente EP0739987 describe un método para la detección de distintas especies de *Salmonella* sp. a partir de ADN mediante una PCR que comprende el empleo de unos oligonucleótidos dirigidos de forma específica al gen *invA* de *Salmonella* sp.

10

Rahn *et al.* (Molecular and Cellular probes, 1992 vol. 6: 271-279) describen un método de detección de múltiples especies de *Salmonella* sp. a partir de ADN que comprende la amplificación de la secuencia del gen *invA* de *Salmonella* sp. mediante una reacción en cadena de la polimerasa.

15

Por tanto, existe en el estado de la técnica la necesidad desarrollar un método de detección de *Salmonella* sp. que permita detectar el mayor número serovariantes de dicho patógeno y que sea, a la vez que eficaz, rápido y económico.

Compendio de la invención

20

En un aspecto la invención se relaciona con un método *in vitro* para la detección de *Salmonella* sp. en una muestra que comprende

25

(i) realizar una reacción de amplificación a partir de una preparación de ácidos nucleicos derivada de dicha muestra empleando una pareja de cebadores capaz de amplificar una región del gen *invA* de *Salmonella* sp. que comprende la región de dicho gen que corresponde a la región comprendida entre los nucleótidos 1001 y 1069 en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1, y

(ii) detectar el producto de amplificación generado en la etapa (i).

30

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para la detección de *Salmonella* sp. en una muestra que comprende

35

(i) realizar una reacción de amplificación a partir de una preparación de ácidos nucleicos derivada de dicha muestra empleando una pareja de cebadores que comprende las secuencias SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 [INVAVITONE F/R]; y

(ii) detectar el producto de amplificación mediante el empleo de una sonda marcada, en donde dicha sonda comprende en su extremo 5' un pigmento reportero y en su extremo 3' un pigmento quencher y presenta la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 7 [INVAVITONE].

40

En otro aspecto, la invención se relaciona con un oligonucleótido cuya secuencia se selecciona del grupo de secuencias SEQ ID NO: 2 [cebador INVAVITWO F], SEQ ID NO: 3 [cebador INVAVITWO R], SEQ ID NO: 4 [sonda INVAVITWO], SEQ ID NO: 7 [sonda INVAVITONE].

45

En otro aspecto la invención se relaciona con un kit que comprende una pareja de cebadores capaz de amplificar una región del gen *invA* de *Salmonella* sp. que comprende la región de dicho gen que corresponde a la región comprendida entre los nucleótidos 1001 y 1069 en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1.

50

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit que comprende (i) la pareja de cebadores SEQ ID NO: 5/SEQ ID NO: 6 [INVAVITONE F/R] y (ii) una sonda marcada, en donde dicha sonda comprende en su extremo 5' un pigmento reportero y en su extremo 3' un pigmento quencher y presenta la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 7 [INVAVITONE].

55

Por último, el uso de los kits de la invención en la detección de *Salmonella* sp. constituyen aspectos incluidos dentro del contexto de la presente invención.

Así, en un aspecto, la invención se relaciona con el uso de un kit según se ha descrito en la presente invención para la detección de *Salmonella* sp. en una muestra.

Breve descripción de las figuras

60

La Figura 1 es una gráfica que muestra los resultados de amplificación del genoma de *Salmonella* por RT-PCR en las muestras analizadas. Los trazos en los que se observan valores superiores al Ct corresponden a distintas cepas de *Salmonella*. Los trazos en los que se observan inferiores al Ct corresponden a cepas de géneros distintos a *Salmonella*.

65

La Figura 2 es un alineamiento múltiple de secuencias. Las secuencias alineadas corresponden al gen *invA* de *Salmonella* sp., en donde la secuencia que aparece bajo el nombre "LT2" es la secuencia de nucleótidos que comprende la región comprendida entre los nucleótidos 1001 y 1069 en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1. La secuencia marcada con subrayado sencillo corresponde a la secuencia de nucleótidos de los cebadores INVAVITWO-

F e INVAVITWO-R; la secuencia marcada con subrayado doble corresponde a la secuencia de nucleótidos de la sonda INVAVITWO. El resto de secuencias que aparecen en el alineamiento corresponde a las siguientes especies de *Salmonella* sp. (en negrita se muestra el número de acceso a la base de datos de secuencias de nucleótidos del EMBL):

- 5 **DQ644615**: *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* cepa CNM-3685-03; **DQ644616**: *Salmonella enterica* subsp. *Salamae* cepa CNM-5936-02; **DQ644617**: *Salmonella enterica* subsp. *Salamae* cepa CNM-176; **DQ644618**: *Salmonella enterica* subsp. *Salamae* cepa CNM-169; **DQ644620**: *Salmonella enterica* subsp. *Arizonae* cepa CNM-771-03; **DQ644621**: *Salmonella enterica* subsp. *Arizonae* cepa CNM-247; **DQ644622**: *Salmonella enterica* subsp. *Arizonae* cepa CNM-259; **DQ644623**: *Salmonella enterica* subsp. *Diarizonae* cepa CNM-834-02; **DQ644624**: *Salmonella enterica* subsp. *Diarizonae* cepa CNM-750-02; **DQ644625**: *Salmonella enterica* subsp. *Diarizonae* cepa CNM-2667-02; **DQ644627**: *Salmonella enterica* subsp. *Houtenae* cepa ST-22; **DQ644629**: *Salmonella enterica* subsp. *Indica* cepa CNM-186; **DQ644630**: *Salmonella enterica* subsp. *Indica* cepa CDC-811; **DQ644631**: *Salmonella enterica* subsp. *Indica* cepa CDC-1937; **U43237**: *Salmonella enterica* cepa RKS4194; **U43238**: *Salmonella enterica* cepa RKS3333; **U43239**: *Salmonella enterica* cepa RKS3057; **U43240**: *Salmonella enterica* cepa RKS3044; **U43241**: *Salmonella enterica* cepa RKS3041; **U43242**: *Salmonella enterica* invasión cepa RKS3027; **U43243**: *Salmonella enterica* cepa RKS3015; **U43244**: *Salmonella enterica* cepa RKS3014; **U43245**: *Salmonella enterica* cepa RKS3013; **U43246**: *Salmonella enterica* cepa RKS2995; **U43247**: *Salmonella enterica* cepa RKS2993; **U43248**: *Salmonella enterica* cepa RKS2985; **U43249**: *Salmonella enterica* cepa RKS2983; **U43250**: *Salmonella enterica* cepa RKS2980; **U43251**: *Salmonella enterica* cepa RKS2979; **U43252**: *Salmonella enterica* cepa RKS2978; U43271: *Salmonella enterica* cepa RKS 1280; **U43272**: *Salmonella enterica* cepa RKS1518; U43273: *Salmonella Gallinarum* cepa RKS2962; **DQ644619**: *Salmonella enterica* subsp. *Arizonae* cepa CNM-822-02; **DQ644626**: *Salmonella enterica* subsp. *Houtenae* cepa CNM-2556-03; **DQ644628**: *Salmonella enterica* subsp. *Houtenae* cepa ST-15; **EU348366**: *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar *Gallinarum* cepa S9873; **EU348368**: *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar *Pullorum* cepa 1794; **EU348369**: *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar *Senftenberg* cepa JXS-04#01. Los nucleótidos que aparecen con letra mayúscula indican coincidencia de nucleótidos entre las secuencias comparadas; los nucleótidos en letra minúscula indican no coincidencia entre las secuencias comparadas. Al final del alineamiento, se muestra mediante asteriscos la secuencia consenso entre todas las secuencias comparadas.

Descripción de la invención

Sorprendentemente, los investigadores han diseñado unas parejas de cebadores que permiten la detección específica de los microorganismos del género *Salmonella* sp., debido a que amplifican una región del genoma de *Salmonella* sp. muy conservada entre todas las especies del género, e incluso a nivel de variante, lo que permite la detección de múltiples especies y serovariantes de *Salmonella* sp. con un único ensayo.

Así, en un aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para la detección de *Salmonella* sp. en una muestra (método 1 de la invención) que comprende

- (i) realizar una reacción de amplificación a partir de una preparación de ácidos nucleicos derivada de dicha muestra empleando una pareja de cebadores capaz de amplificar una región del gen *invA* de *Salmonella* sp. que comprende la región de dicho gen que corresponde a la región comprendida entre los nucleótidos 1001 y 1069 en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1, y
- (ii) detectar el producto de amplificación generado en la etapa (i).

En la presente invención, se entiende por “ácido nucleico” a la repetición de monómeros llamados nucleótidos, unidos mediante enlaces fosfodiéster. Existen dos tipos de ácidos nucleicos: ADN (ácido desoxirribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico). Adicionalmente, de forma artificial, a partir de ARN se puede obtener ADN complementario (ADNc) que también se considera un ácido nucleico.

Por tanto, en la presente invención, se entiende por “preparación de ácidos nucleicos” al conjunto de ácidos nucleicos, es decir, ADN y/o ADNc procedente de la retrotranscripción del ARN presentes en una preparación que va a ser sometida a una reacción de amplificación.

En la presente invención se entiende por “ADN” ó “ADN genómico” al material genético de los organismos vivos que controla la herencia y se localiza en el núcleo de las células.

En la presente invención se entiende por “ARN” a la molécula resultado de la transcripción de una secuencia de ADN.

En la presente invención, se entiende por “ADNc” al ADN obtenido a partir del ARNm por acción de la retrotranscriptasa inversa.

Como entiende el experto en la materia, la detección de *Salmonella* sp. a partir del ARN implica la existencia de células viables de *Salmonella* sp. en la muestra analizada. Por tanto, la puesta en práctica del método de la invención permite no sólo detectar *Salmonella* sp. (si la muestra de partida es una preparación de ADN genómico), sino también detectar exclusivamente células viables de *Salmonella* sp. presentes en la muestra analizada (si la muestra de partida es una preparación de ADNc obtenida a partir de una preparación ARN de *Salmonella* sp.).

El método de la invención requiere la extracción del ácido nucleico de una muestra. Las distintas técnicas de la extracción de ácidos nucleicos son ampliamente conocidas en el estado de la técnica, por ejemplo, cromatografía de penetrabilidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de adsorción, ultrafiltración, empleo de bolas magnéticas a las que los ácidos nucleicos se unen selectivamente, etc. (Sambrook *et al.*, 2001. "Molecular cloning: a Laboratory Manual", 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3). Adicionalmente, existen kits de extracción de ácidos nucleicos comercialmente disponibles para realizar dicha extracción.

Si el ácido nucleico es ADN, la extracción puede realizarse, por ejemplo, mediante el uso de resinas quelantes (e.g. CHELEX 100) y de intercambio iónico. Éstas 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 heteropolisacáridos (molibdofosfato amónico), sales complejas basadas en hexacianoferratos insolubles y zeolitas sintéticas. Éstas 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.

En el caso de que el ácido nucleico que se quiere extraer de la muestra sea ARN, existen kits comerciales exclusivamente diseñados para este propósito que contienen los componentes adecuados para extraer en perfectas condiciones el ARN: altas concentraciones de sales caotrópicas en el tampón de lisis para inactivar las ARNasas, membranas de sílica que favorecen la adsorción del ARN, DNasas que eliminan el ADN para alcanzar un aislado de ARN de gran pureza, etc. Un kit comercial que reúne las características antes citadas es, por ejemplo, y sin limitarse a, Nucleospin® RNA.

El método de la invención comprende una reacción de amplificación a partir de una preparación de ácidos nucleicos. Como entiende el experto en la materia, una reacción de amplificación consiste, básicamente, en la multiplicación exponencial de una molécula de ADN diana (o de una región diana de una molécula de ADN) mediante el empleo de oligonucleótidos que hibridan con las regiones que flanquean la región diana que se quiere amplificar. Las diferentes técnicas o procedimientos de llevar a cabo reacciones de amplificación están ampliamente descritas en el estado de la técnica, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, 2001. (*supra.*). Ejemplos de reacciones de amplificación son, sin limitarse a, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y variaciones de la misma [amplificación regional de la reacción en cadena de la polimerasa (RA-PCR, del inglés Regional Amplification PCR), la reacción en cadena de la polimerasa a Tiempo Real (RT-PCR del inglés Real Time PCR, etc.) El protocolo seguido para llevar a cabo una PCR es ampliamente conocido en el estado de la técnica y actualmente, existen kits comerciales que contienen los materiales necesarios para llevar a cabo dicha amplificación. Asimismo, las condiciones de temperatura, tiempo, concentraciones de reactivos y número de ciclos de la PCR dependerán de la ADN polimerasa utilizada en la reacción de amplificación, de la especificidad de los cebadores, etc. Si se emplea un kit comercial, las condiciones de la reacción serán las especificadas por el fabricante del kit.

Así, en una realización particular de la invención, la reacción de amplificación se lleva a cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa a Tiempo Real. Una reacción de PCR a Tiempo Real es, básicamente, una PCR convencional en la que los equipos de amplificación (termocicladores) llevan incorporados un sistema de detección de fluorescencia, basándose dicha detección en la utilización de unas moléculas específicas denominadas fluoróforos y quenchers.

Como entiende el experto en la materia, una reacción de amplificación requiere el empleo de una pareja de oligonucleótidos, denominados cebadores, que van a hibridar con la región/secuencia diana que se quiere amplificar. En el caso concreto del presente método, la región diana a amplificar es una región del gen *invA* de *Salmonella* sp. que comprende la región de dicho gen que corresponde a la región comprendida entre los nucleótidos 1001 y 1069 en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1. En la Figura 2 que acompaña a la presente descripción, se muestran la región del gen *invA* de distintas especies de *Salmonella* sp. que corresponden a la región comprendida entre los nucleótidos 1001 y 1069 en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1. Como entiende el experto en la materia, todas las secuencias mostradas en la Figura 2 son secuencias homólogas (que comparten una secuencia consenso) que serán detectadas al poner en práctica el método de la invención, permitiendo así la detección de las distintas especies/serovariantes de *Salmonella* sp. Asimismo, el experto en la materia apreciará que el método de la invención es adecuado para la detección de otras especies y cepas de *Salmonella* no recogidas en la figura 2 siempre que la región del gen *invA* correspondiente a la región recogida en dicha figura muestra una similitud de secuencia sustancial con la secuencia consenso deducida de dicho alineamiento y, en particular, con la región central del mismo frente a la que se dirige la sonda de hibridación.

En una realización particular de la invención, la pareja de cebadores empleada en la reacción de amplificación para amplificar dicha región diana comprende las secuencias SEQ ID NO: 2 y 3 [INAVITWO F/R].

Adicionalmente, la reacción de amplificación puede llevarse a cabo empleando un sistema de amplificación que permite eliminar la contaminación con amplificadores provenientes de anteriores ciclos de amplificación. Éste es el caso, por ejemplo, del master de amplificación AmpErase® uracil-N-glicosidasa, tal como se muestra en el Ejemplo que acompaña a la presente descripción (apartado B, sección 2). La uracil-N-glicosidasa es una enzima que degrada el ADN que lleva dUTPs incorporados en lugar de los dTTPs del "ADN natural". De esta manera se impide la aparición de falsos positivos debido a la citada contaminación.

ES 2 327 703 B1

Una vez llevada a cabo la reacción de amplificación es necesario detectar los productos de amplificación o amplificones. Nuevamente, las técnicas para detectar los productos de amplificación están ampliamente descritos en el estado de la técnica, como por ejemplo, en Sambrook *et al.*, 2001 (citado *at supra*). En dicha detección puede emplearse cualquiera de los procedimientos de identificación de fragmentos de amplificación conocidos del estado de la técnica, tales como hibridación con sondas marcadas (por ejemplo con un fluoróforo), tinción, por ejemplo, tinción de plata, con agentes intercalantes, como bromuro de etidio o SYBR Green®, etc.

Como es conocido del estado de la técnica, si el método de amplificación elegido es una PCR a tiempo real, la detección del producto de amplificación se realiza simultáneamente a la reacción de amplificación. Para ello, pueden emplearse tanto mecanismos de detección no específicos como específicos.

Los mecanismos de detección no específicos detectan todos los ADN de doble cadena producidos durante la reacción de amplificación (ya sea un producto específico, un producto inespecífico o dímeros de cebadores). Este mecanismo es el método estándar y básicamente consiste en añadir un agente intercalante de la doble cadena o un fluoróforo que emite fluorescencia cuando se une a esta. Agentes adecuados para este propósito incluyen SYTO 15, SYTO 25, SYTO 13, SYTO 9, SYBR Green I, SYTO 16, SYTO 17, SYTO 17, SYTO 21, SYTO 59, SYTO 16, SYTOX, SYTO BC, DAPI, Hoechst 33342, Hoechst 33258, y PicoGreen. Preferiblemente, se utiliza SYBR Green® que se excita a 497 nm y emite a 520 nm.

Así, en una realización particular, la detección del producto de amplificación se lleva a cabo mediante un agente intercalante fluorescente que, en otra realización todavía más particular, dicho agente intercalante es SYBR Green.

Por otro lado, los mecanismos de detección específicos son capaces de distinguir entre la secuencia de interés y las amplificaciones inespecíficas. Todos ellos se basan en la utilización de quenchers (pigmento quencher o extinguidor no fluorescente -NFQ- que incrementa la eficacia de detección y señal al no emitir fluorescencia) y sondas marcadas con un amplio rango de fluoróforos (pigmento reportero) con diferentes espectros de excitación y emisión.

En la presente invención se entiende por “fluoróforo” a una molécula capaz de emitir una radiación electromagnética en respuesta a la absorción de una radiación de excitación en donde la longitud de onda de la radiación emitida es distinta que la longitud de onda de la radiación de excitación y en donde la emisión de radiación persiste únicamente mientras se mantiene la radiación de excitación. Ejemplos ilustrativos pero no limitativos de marcadores fluorescentes que pueden ser usados en el contexto de la presente invención incluyen:

TABLA 1

Colorantes fluorescentes comúnmente empleados

Molécula	Excitación (nm)	Emisión (nm)
FAM	488	518
HEX	488	556
TET	488	538
CY3	550	570
CY5.5	675	694
JOE	527	548
6-ROX	575	602
Cascade Blue	400	425
Fluoresceína	494	518
Texas Red	595	615
Rodamina	550	575
Rodamina Green	502	527
Rodamina Red	570	590
Rodamina 6G	525	555
6-TAMRA	555	580
5-TMR1A	543	567
Alexa 430	430	545
Alexa 488	493	516
Alexa 594	588	612
Bodipy R6G	528	550

En la presente invención se entiende por “quencher” a la molécula que acepta energía de un fluoróforo y la disipa en forma de calor o fluorescencia. Ejemplos de quenchers son, sin limitarse a, Methyl Red, ElleQuencher, Dabcyl, Dabsyl, TAMRA, etc.

ES 2 327 703 B1

Así, en una realización particular, la detección del producto de amplificación se lleva a cabo mediante una sonda marcada que, en otra realización todavía más particular, comprende en su extremo 5' un pigmento reportero y en su extremo 3' un pigmento quencher. Ejemplos de sondas que llevan este tipo de marcaje son, por ejemplo, sondas TaqMan, balizas moleculares (sondas del tipo "Molecular Beacon"), sondas Scorpions, sondas Amplifluor, sondas Eclipse, etc.

Adicionalmente, si se desea, la sonda puede comprender en su extremo 3' una molécula MGB entre la secuencia de nucleótidos y el pigmento quencher. Un MGB (enlazante al surco menor, del inglés, "minor groove binder") es una pequeña molécula en forma de media luna que encaja muy bien en el surco menor del ADN bicatenario. Así, cuando la sonda hibrida a la secuencia diana, el MGB estabiliza el apareamiento incorporándose al surco menor del ADN bicatenario creado entre la sonda y dicha secuencia diana. La estabilización es mucho más eficaz cuando las secuencias coinciden perfectamente (es decir, no hay desparejamiento). Además del superior potencial discriminador, la mayor estabilidad permite que las sondas sean muy cortas (normalmente de 13 a 20 bases) en comparación con las sondas estándar (de 18 a 40 bases), sin detrimento de las directrices en el diseño de los cebadores. El Ejemplo que ilustra la presente invención, en el apartado B, secciones 1 y 2 (desarrollo de las sondas INVAVITONE e INVAVITWO respectivamente) muestra el uso de dichas moléculas MGB.

En una realización particular, el producto de amplificación es detectado mediante una sonda que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 4 [INVAVITWO], que detectará de forma específica la región diana empleada en el método de detección de *Salmonella* sp. de la presente invención, es decir, la región del gen *invA* de *Salmonella* sp. que comprende la región de dicho gen que corresponde a la región comprendida entre los nucleótidos 1001 y 1069 en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1.

En la presente invención se entiende por "la región del gen *invA* de *Salmonella* sp. que comprende la región de dicho gen que corresponde a la región comprendida entre los nucleótidos 1001 y 1069 en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1", a la región o secuencia del gen *invA* de cualquier especie o variante de *Salmonella* sp. que es homóloga a la región comprendida entre los nucleótidos 1001 y 1069 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.

En la presente invención se entiende por "secuencias homólogas" a aquellas secuencias que tienen una identidad de secuencia entre sí de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%. La expresión "identidad de secuencia" se refiere al grado en que son idénticas dos secuencias de polinucleótidos en una base de nucleótido a nucleótido a lo largo de una región en particular de comparación. El porcentaje de identidad de secuencia puede calcularse, por ejemplo, comparando dos secuencias alineadas de forma óptima a lo largo de una región de comparación, determinando el número de posiciones en las que se encuentran bases de ácidos nucleicos idénticas (por ejemplo, A, T, C, G, U o I) en ambas secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la región de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100.

La homología entre varias secuencias de nucleótidos puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos estándar de alineamiento múltiple de secuencias conocidos en el estado de la técnica, tales como, por ejemplo, ClustalW (Chenna, *et al.* 2003 Nucleic Acids Res, 31:3497-3500). En la Figura 2 que acompaña a la presente descripción se muestra un alineamiento múltiple de secuencias en la que puede verse alineadas las secuencias del gen *invA* de distintas especies de *Salmonella* sp. que son homólogas entre sí.

Adicionalmente, una realización particular de la invención es la inclusión de un control interno de amplificación en los métodos de detección de *Salmonella* sp descritos en la presente descripción. De este modo, es posible llevar a cabo una reacción de amplificación en presencia de un ADN exógeno que sirva como control interno de la amplificación, de tal forma que se pueda asegurar que un resultado negativo en la detección del microorganismo (en la presente invención *Salmonella* sp.) no se debe a la inhibición de la *Taq* polimerasa por la presencia de sustancias inhibitoras, si no a la falta de complementariedad entre la sonda y los productos de amplificación o a la ausencia de amplificación por ausencia de anillamiento de los cebadores. La inclusión del control interno de amplificación permitirá identificar fácilmente los resultados falsos negativos. En la solicitud de patente WO2007/085675 y en la publicación de Alvarez, J. *et al.* 2004 (J. Clin. Microbiol., 42:1734-1738) se describe la elaboración de un control interno de amplificación.

Por tanto, en una realización particular, la amplificación se lleva a cabo en presencia de un ADN exógeno cuyos extremos contienen secuencias que pueden ser amplificadas usando los mismos cebadores que los usados para amplificar una región del gen *invA* de *Salmonella* sp. que comprende la región de dicho gen que corresponde a la región comprendida entre los nucleótidos 1001 y 1069 en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1.

En otra realización todavía más particular, el ADN exógeno comprende un fragmento del genoma del fago λ .

Entre las parejas de cebadores identificadas por los inventores que permiten la detección específica de los microorganismos del género *Salmonella* sp. e incluso a nivel de variante, se encuentra la pareja de cebadores formada por las secuencias SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 [INVAVITONE F/R].

ES 2 327 703 B1

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para la detección de *Salmonella* sp. en una muestra (método 2 de la invención) que comprende

- (i) realizar una reacción de amplificación a partir de una preparación de ácidos nucleicos derivada de dicha muestra empleando una pareja de cebadores que comprende las secuencias SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 [INVAVITONE F/R]; y
- (ii) detectar el producto de amplificación mediante el empleo de una sonda marcada, en donde dicha sonda comprende en su extremo 5' un pigmento reportero y en su extremo 3' un pigmento quencher y presenta la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 7 [INVAVITONE].

Tal como se ha indicado en párrafos anteriores, en la presente invención se entiende por "preparación de ácidos nucleicos" al conjunto de ácidos nucleicos, es decir, ADN, ARN y/o ADNc presentes en una muestra.

Las diferentes técnicas de extracción de ácido nucleicos, de detección de productos de amplificación, marcaje de sondas, etc. anteriormente descritos para el método 1 de la invención, son aplicables al presente método 2 de la invención.

Al igual que en el método 1 de la invención, la reacción de amplificación puede realizarse en presencia de un ADN exógeno que sirva como control interno de la amplificación. Por tanto, en una realización particular, la amplificación se lleva a cabo en presencia de un ADN exógeno cuyos extremos contienen secuencias que pueden ser amplificadas usando pareja de cebadores que comprende las secuencias SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 [INVAVITONE F/R].

En otra realización todavía más particular, el ADN exógeno comprende un fragmento del genoma del fago λ .

Como entiende el experto en la materia, *Salmonella* sp. es un microorganismo ampliamente distribuido que puede sobrevivir en multitud de ambientes distintos. Así, en la puesta en práctica de los métodos de detección de *Salmonella* sp. descritos en la presente invención, puede emplearse cualquier tipo de muestra donde se tenga sospecha de contaminación por *Salmonella* sp. Típicamente, la muestra es una población bacteriana asociada a un procedimiento industrial de producción de bienes de consumo como por ejemplo industrias papeleras, industrias heladeras, industrias petroleras, industrias aceiteras, cerveceras y de tratamiento de aguas residuales o asociada a un procedimiento de manipulación de fluidos biológicos en el entorno sanitario como sistema de perfusión entéricos, sistemas de diálisis, catéteres y similares. Alternativamente, la muestra puede ser de origen biológico y comprender tejidos, células, extractos celulares, homogenados celulares, fracciones proteicas, fluidos biológicos (sangre, suero, plasma, orina, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, heces, sudor, etc.). Alternativamente, la muestra puede consistir en órganos enteros tales como músculo, ojo, piel, gónadas, nódulos linfáticos, corazón, cerebro, pulmón, hígado, riñón, bazo, tumores.

Por tanto, en una realización particular de la invención, la muestra se selecciona del grupo que comprende una muestra ambiental (como por ejemplo, una muestra de agua o tierra), una muestra clínica (fluidos biológicos, heces, etc.) y una muestra alimentaria (productos alimentarios perecederos, carne de pollo, huevos, cremas, etc). De forma preferida, la muestra a analizar será una muestra alimentaria.

Tal como se ha indicado anteriormente, los inventores han desarrollado un conjunto de cebadores y sondas que permiten la detección específica de *Salmonella* sp.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un oligonucleótido cuya secuencia se selecciona del grupo de secuencias SEQ ID NO: 2 [cebador INVAVITWO F], SEQ ID NO: 3 [cebador INVAVITWO R], SEQ ID NO: 4 [sonda INVAVITWO], SEQ ID NO: 7 [sonda INVAVITONE].

Los kits que comprenden los reactivos y agentes necesarios para la puesta en práctica de los métodos descritos en la presente invención constituyen aspectos adicionales de la misma.

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un kit (kit 1 de la invención) que comprende una pareja de cebadores capaz de amplificar una región del gen *invA* de *Salmonella* sp. que comprende la región de dicho gen que corresponde a la región comprendida entre los nucleótidos 1001 y 1069 en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1.

En una realización particular del kit, la pareja de cebadores comprende las secuencias SEQ ID NO: 2 y 3 [INVAVITWO F/R].

En otra realización particular, dicho kit comprende, además, una sonda marcada capaz de detectar el producto de amplificación.

En otra realización particular, la sonda comprende en su extremo 5' un pigmento reportero y en su extremo 3' un pigmento quencher.

En otra realización particular, la sonda comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 4 [INVAVITWO].

ES 2 327 703 B1

En otra realización particular, el kit comprende, además, un agente intercalante fluorescente, que en una realización todavía más particular, es SYBR Green.

En otra realización particular, el kit de la invención comprende, además, un ADN exógeno cuyos extremos contienen secuencias que pueden ser amplificadas usando los mismos cebadores que los usados para amplificar una región del gen *invA* de *Salmonella* sp. que comprende la región de dicho gen que corresponde a la región comprendida entre los nucleótidos 1001 y 1069 en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1.

En otra realización todavía más particular de dicho kit, el ADN exógeno comprende un fragmento del genoma del fago λ .

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit (kit 2 de la invención) que comprende (i) la pareja de cebadores SEQ ID NO: 5/SEQ ID NO: 6 [INVAVITONE F/R] y (ii) una sonda marcada, en donde dicha sonda comprende en su extremo 5' un pigmento reportero y en su extremo 3' un pigmento quencher y presenta la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 7 [INVAVITONE].

En una realización particular, dicho kit comprende, además, un ADN exógeno cuyos extremos contienen secuencias que pueden ser amplificadas usando la pareja de cebadores SEQ ID NO: 5/SEQ ID NO: 6 [INVAVITONE F/R] que, en una realización todavía más particular, dicho ADN exógeno comprende un fragmento del genoma del fago λ .

Por último, el uso de los kits 1 y 2 de la invención constituyen aspectos adicionales de la misma.

Así, en un aspecto, la invención se relaciona con el uso de un kit según se ha descrito e la presente invención para la detección de *Salmonella* sp. en una muestra.

En una realización particular, la muestra se selecciona del grupo que comprende una muestra ambiental, una muestra clínica y una muestra alimentaria.

El siguientes Ejemplo es ilustrativo de la invención y no pretende ser limitativo de la misma.

Ejemplo

Detección de ADN y ARN de *Salmonella* sp. en alimentos

A. Protocolo de detección de ADN de *Salmonella* sp.

1. Extracción con CHELEX® 100-6%

La resina CHELEX 100-6% se preparó mediante resuspensión de 1,5 gramos de Chelex 100 en 25 ml de agua bidestilada y manteniendo bajo agitación moderada. La solución de Chelex 100-6% se conservó a 4°C.

Para la extracción del ADN a partir de *Salmonella* sp., las muestras con 1 ml de cultivo pre-enriquecido se centrifugaron en un tubo eppendorf de 1,5 ml durante 5 minutos a 13.000 rpm. Se eliminó el sobrenadante con pipeta y se resuspendió el pellet en 300 μ l de CHELEX 100-6, utilizando vortex. Las muestras se incubaron a 56°C durante 15-20 minutos y se agitaron usando un vortex durante 10 segundos. Las muestras se incubaron en un baño a 100°C durante 5 minutos, se mezclaron usando vortex durante 10 segundos y fueron transferidas de forma inmediata los tubos a hielo. Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 13.000 rpm. 200 μ l del sobrenadante (que contiene DNA) fue transferido a otro tubo en donde se conservó a 4°C si iba a ser utilizado en pocos días o a -20°C para su conservación durante periodos más prolongados.

2. Creación del control interno de amplificación de PCR a tiempo real con SYBR Green

Para obtener un control interno, se utilizaron los cebadores *invA* ICF (SEQ ID NO: 8) e *invA* ICR (SEQ ID NO: 9) de secuencia:

invA ICF (SEQ ID NO: 8):

5' - GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA**GCAGAACGAAAAGGTGAGC** - 3'

invA ICR (SEQ ID NO: 9):

5' - TCATCGCACCGTCAAAGGAACC**CTGCACTGCTCAATGCGCCA** - 3'

ES 2 327 703 B1

Las secuencias subrayadas pertenecen a los cebadores 139 y 141 que amplifican el gen *invA* de *Salmonella* (Mallory *et al.*, 2003, Appl. Environ. Microbiol. 69:290-296), mientras que las secuencias en negrita pertenecen al fago λ que se incorporan para que formen parte de los cebadores y puedan amplificar un fragmento de fago λ para convertirlo en control interno. Con estos cebadores se amplifica un fragmento de 348 pb de fago λ (SEQ ID NO: 10):

5' -

gtgaaattatcgccacgttcgggcaaGCAGAACGAAAAGGTGAGCCGGTCACCT
GGCAGGGGCGACAGTATCAGCCGTATCCCATTGAGGGGAGCGGTTTTGAACTGAA
TGGCAAAGGCACCAGTACGCGCCCCACGCTGACGGTTTCTAACCTGTACGGTATG
GTCACCGGGATGGCGGAAGATATGCAGAGTCTGGTCGGCGGAACGGTGGTCCGGC
GTAAGGTTTACGCCCGTTTTCTGGATGCGGTGAACTTCGTCAACGGAAACAGTTA
CGCCGATCCGGAGCAGGAGGTGATCAGCCGCT**TGGCGCATTGAGCAGTGCAGggtt**
cctttgacggtgcatga -3'

Este fragmento corresponde al control interno, que en la PCR a tiempo real con SYBR-GREEN permite amplificar un fragmento del fago lambda con los mismos cebadores que se utilizan para detectar *Salmonella* (cebadores 139 y 141).

Para obtener el control interno se realizó una PCR convencional usando como molde una preparación de fago λ digerida con EcoRI y HindIII (SIGMA) usando la siguiente mezcla de reacción

	Concentración [inicial]	Concentración [final]	x1
PCR Buffer	10X	1X	2,5 μ l
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	0,75 μ l
dNTP Mix	25 mM	0,25 mM	0,25 μ l
<i>invA</i> ICF	10 μ M	0,4 μ M	1 μ l
<i>invA</i> ICR	10 μ M	0,4 μ M	1 μ l
Taq Polimerasa	5U	1U	0,2 μ l
ADN (fago λ)			1 μ l
Agua			18,30 μ l
Volumen final			25 μ l

y las siguientes condiciones de PCR:f7

1 ciclo	95°C	1 minuto
35 ciclos	95°C	30 segundo
	60°C	30 segunDo
	72°C	30 segundo
1 ciclo	72°C	10 minuto

Una vez realizada la PCR, se comprobó que hubo amplificación de los productos. Para eso se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2%. Se cargó parte de las muestras en los pocillos del gel, por ejemplo: 5 μ l muestra + 5 μ l de tampón de carga. Se tiñó el gel con bromuro de etidio y se comprobó que apareciera la banda del tamaño deseado.

Posteriormente se realizó una purificación del ADN obtenido en la PCR utilizando el resto de la muestra que no se había cargado en el gel. La purificación se hizo con kit específico para ello, como el kit QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN), siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial.

ES 2 327 703 B1

El producto obtenido fue el control interno, que se guardó a -20°C como stock. Partiendo del stock se utilizó la dilución 10^{-5} en la PCR a tiempo real con SYBR-GREEN.

3. Detección de *Salmonella* sp. con SYBR-Green PREMIX EX TAQ® (TAKARA)

La detección de *Salmonella* mediante PCR en tiempo real usando SYBR-Green se llevó a cabo usando la mezcla de reacción:

10	MASTER SYBR-GREEN	10 µl
	Primer F (139)	1 µl
	Primer R (141)	1 µl
15	ROX	0,4 µl
	Control Interno (R2 dil -5)	1 µl
	DNA	3 µl
	Agua	3,6 µl
20	Volumen final=	20 µl

y las siguientes condiciones de amplificación

25	1 CICLO	95°C 1 minuto
30	40 CICLOS	95°C 15 segundos 60°C 1 minuto

4. Detección del gen *invA* de *Salmonella* sp. mediante PCR a tiempo real y SYBR-GREEN

Durante la primera parte de la invención se llevó a cabo un estudio genómico del género *Salmonella* sp. para la selección de dianas adecuadas para detección de este patógeno en muestras alimentarias. La diana genómica elegida fue el gen *invA*, ya propuesto por varios autores (Malorny *et al.*, *supra*). Este gen desempeña un papel imprescindible en los mecanismos de invasión y supervivencia de *Salmonella* sp., por lo que la secuencia de dicho gen tenía que encontrarse transcrita en el ARN mensajero en la mayoría de los serotipos del género. A continuación se puso a punto la metodología de PCR convencional (ya publicada, cebadores 139 y 141) (Malorny *et al.*, *supra.*) en base al gen *invA* de *Salmonella* sp. Así mismo, se puso a punto la metodología de extracción de ADN basado en la resina de sílice comercial CHELEX 100 (ver apartado 1).

La amplificación se realizó utilizando un equipo ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) de PCR a tiempo real. Esta técnica permitió la detección específica y rápida de ADN de *Salmonella* sp. (véase Tabla 1).

TABLA 1

Detección de ADN en serotipos de *Salmonella* sp. mediante PCR a tiempo real utilizando SYBR-GREEN y cebadores 139 y 141

Número cepa	Microorganismo	SYBR (Takara)
75 UPV/EHU	<i>S. typhimurium</i> DT169	+
26 UPV/EHU	<i>S. enteritidis</i> PT4	+
340 UPV/EHU	<i>S. californica</i>	+
4 UPV/EHU	<i>S. arizonae</i>	+
456 UPV/EHU	<i>S. hadar</i>	+
240 UPV/EHU	<i>Salmonella</i> IV 48	+
328 UPV/EHU	<i>S. montevideo</i>	+

ES 2 327 703 B1

	Número cepa	Microorganismo	SYBR (Takara)
	291 UPV/EHU	<i>Salmonella</i> 4,5,12:i:-	+
5	128 UPV/EHU	<i>S. typhimurium</i> DT104	+
	39 UPV/EHU	<i>S. enteritidis</i> PT4	+
	7 UPV/EHU	<i>S. virchow</i>	+
	8 UPV/EHU	<i>S. miami</i>	+
10	10 UPV/EHU	<i>S. abony</i>	+
	59 UPV/EHU	<i>S. dublin</i>	+
	247 UPV/EHU	<i>S. blockley</i>	+
15	312 UPV/EHU	<i>S. heidelberg</i>	+
	271 UPV/EHU	<i>S. anatum</i>	+
	270 UPV/EHU	<i>S. muenchen</i>	+
	273 UPV/EHU	<i>S. litchfield</i>	+
20	276 UPV/EHU	<i>S. fayed</i>	+
	275 UPV/EHU	<i>S. hadar</i>	+
	119 UPV/EHU	<i>S. enteritidis</i> PT1	+
25	235 UPV/EHU	<i>S. lindenburg</i>	+
	232 UPV/EHU	<i>S. cremieu</i>	+
	246 UPV/EHU	<i>S. duesseldorf</i>	+
	238 UPV/EHU	<i>S. cubana</i>	+
30	241 UPV/EHU	<i>S. braenderup</i>	+
	259 UPV/EHU	<i>S. IV</i> 6, 14	+
	257 UPV/EHU	<i>S. IIIb</i> 58	+
35	264 UPV/EHU	<i>S. IIIa</i> 48	+
	261 UPV/EHU	<i>S. miami</i>	+
	268 UPV/EHU	<i>S. hadar</i>	+
	263 UPV/EHU	<i>S. agona</i>	+
40	169 UPV/EHU	<i>S. enteritidis</i> PT4	+
	175 UPV/EHU	<i>S. enteritidis</i> PT1	+
	183 UPV/EHU	<i>S. enteritidis</i> PT1	+
45	192 UPV/EHU	<i>S. enteritidis</i> PT8	+
	202 UPV/EHU	<i>S. enteritidis</i> PT2	+
	205 UPV/EHU	<i>S. enteritidis</i> PT8	+
	69 UPV/EHU	<i>S. typhimurium</i> 59	+
50	72 UPV/EHU	<i>S. typhimurium</i> DT66	+
	74 UPV/EHU	<i>S. typhimurium</i> DT12	+
	76 UPV/EHU	<i>S. typhimurium</i> DT120	+
	78 UPV/EHU	<i>S. typhimurium</i> DT193	+
55	245 UPV/EHU	<i>S. typhimurium</i> DT52	+
	20 UPV/EHU	<i>S. arizonae</i>	+
	250 UPV/EHU	<i>S. IIIb</i> 48	+
60	314 UPV/EHU	<i>S. IIIa</i> 48	+
	UPV/EHU	<i>P. vulgaris</i> (CECT 484)	-
	UPV/EHU	<i>E. cloacae</i> (CECT 679)	-
	UPV/EHU	<i>C. freundii</i>	-
65	UPV/EHU	<i>K. pneumoniae</i>	-
	UPV/EHU	<i>P. aeruginosa</i>	-

Número cepa	Microorganismo	SYBR (Takara)
UPV/EHU	<i>E.coli</i> (CECT 679)	-
UPV/EHU	<i>H. alvei</i> (CECT 158T)	-
UPV/EHU	<i>Shigella sp.</i> (CECT 583)	-

B. Protocolo de detección de ARN de *Salmonella sp*

1. Desarrollo de la sonda INVAVITONE

En la segunda parte de la invención se extrapoló la metodología desarrollada para el ADN para la detección de ARN mensajero, con el fin de que el ensayo permitiera discernir entre la detección de células vivas y muertas de *Salmonella* y por lo tanto, dar un valor añadido al sistema de detección desarrollado en la presente invención. Para ello, se diseñaron cebadores y una sonda teniendo en cuenta su inclusión en el gen *invA*. En el diseño de la sonda y de los cebadores que la flanquean, se analizaron las bases genéticas donde existe la información conocida de *Salmonella sp.* y así generar unas secuencias específicas que estuvieran presentes en todos los serotipos de *Salmonella sp.* Finalmente y mediante el programa Primer Express[®] se diseñó una sonda que se denominó INVAVITONE.

INVAVITONE-F	SEQ ID NO: 5	5' -TTAAATTCCTGAAGCAAACGTA-3'
INVAVITONE-R	SEQ ID NO: 6	5' -AACCAGCAAAGGCGAGCA-3'
Sonda INVAVITONE	SEQ ID NO: 7	5' -CGCAGGCACGCC-3'

El ensayo de detección de *Salmonella sp.* mediante la utilización de sonda TagMan-MGB[®] (INVAVITONE) y los cebadores que la flanquean (INVAVITONE-F e INVAVITONE-R) se realizó utilizando el equipo ABI PRISM[®] 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems), de PCR a tiempo real. La sonda TaqMan-MGB[®], sintetizada por Applied Biosystems, presenta el fluoróforo VIC en su extremo 5' que actúa como "reporter" y en su extremo 3' un extinguidor no fluorescente (NFQ) y una cola terminal MGB (*minor groove-binder*).

Se analizaron diferentes serotipos de *Salmonella sp.*, además de otra serie de microorganismos relacionados que se utilizaron como controles negativos de detección. La inclusión de estos controles negativos sirvió también para comprobar la especificidad de la sonda. Todos los aislamientos se analizaron en repetidas ocasiones para comprobar la reproducibilidad de la técnica. Estos microorganismos y sus valores Ct (*Cycle threshold*) aparecen reflejados en la Tabla 2. Este valor de Ct es el ciclo en el que la muestra atraviesa o supera un nivel de fluorescencia que separa la fluorescencia de fondo o "background" de la fluorescencia propia de la amplificación. Cuando se trabaja con extracciones de ADN reales, en las que se desconoce la cantidad de moléculas de partida, el valor de Ct varía en función de esta cantidad (Figura 1). Los resultados de la detección se muestran en la Tabla 2.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 327 703 B1

TABLA 2

Detección de ADN en serotipos de *Salmonella* mediante PCR a tiempo real utilizando la sonda INVAVITONE

Microorganismo		Ct	Microorganismo		Ct
<i>S. enteritidis</i> 26 UPV/EHU	+	15,81	<i>S. enteritidis</i> 169 UPV/EHU /PT4	+	15,81
<i>S. typhimurium</i> 75 UPV/EHU	+	13,33	<i>S. enteritidis</i> 175 UPV/EHU /PT1	+	19,34
<i>S. californica</i> 340 UPV/EHU	+	15,61	<i>S. enteritidis</i> 183 UPV/EHU /PT1	+	12,81
<i>S. hadar</i> 456 UPV/EHU	+	19,00	<i>S. enteritidis</i> 192 UPV/EHU /PT8	+	13,22
<i>Salmonella</i> IV 48 240 UPV/EHU	-	Undet.	<i>S. enteritidis</i> 202 UPV/EHU /PT2	+	12,39
<i>S. montevideo</i> 328 UPV/EHU	+	19,77	<i>S. enteritidis</i> 205 UPV/EHU / PT8	+	13,95
<i>S. 4,5,12:i:-</i> 291 UPV/EHU	+	14,01	<i>S. typhimurium</i> 59 UPV/EHU	+	13,00
<i>S. typhimurium</i> DT 104 128 UPV/EHU	+	14,25	<i>S. typhimurium</i> 72 UPV/EHU	+	13,20
<i>S. enteritidis</i> PT4 39 UPV/EHU	+	16,13	<i>S. typhimurium</i> 74 UPV/EHU	+	13,75
<i>S. virchow</i> 7 UPV/EHU	+	17,80	<i>S. typhimurium</i> 76 UPV/EHU /DT120	+	12,75
<i>S. miami</i> 8 UPV/EHU	+	19,21.	<i>S. typhimurium</i> 78 UPV/EHU	+	18,22
<i>S. abony</i> 10 UPV/EHU	+	16,30	<i>S. typhimurium</i> 245 UPV/EHU	+	11,77
<i>S. dublin</i> 59 UPV/EHU	+	13,28	<i>S. arizonae</i> 20 UPV/EHU	-	Indet
<i>S. block</i> 247 UPV/EHU	+	13,24	<i>Salmonella</i> IIIb 48 250 UPV/EHU	-	Indet

Microorganismo		Ct	Microorganismo		Ct
<i>S. heidelberg</i> 312 UPV/EHU	+	19,65	<i>Salmonella</i> IIIa 48 314 UPV/EHU	-	Indet
<i>S. anatum</i> 271 UPV/EHU	+	21,98	<i>Salmonella</i> IIIb 58 257 UPV/EHU	-	Indet
<i>S. muenchen</i> 270 UPV/EHU	+	18,04	<i>Salmonella</i> IIIa 48 264 UPV/EHU	-	Indet
<i>S. lynch</i> 273 UPV/EHU	+	15,82	<i>S. miami</i> 261 UPV/EHU	+	19,88
<i>S. fayed</i> 276 UPV/EHU	+	19,64	<i>S. hadar</i> 268 UPV/EHU	+	16,13
<i>S. hadar</i> 275 UPV/EHU	+	19,38	<i>S. agona</i> 263 UPV/EHU	+	9,24
<i>S. enteritidis</i> 119 UPV/EHU	+	11,12	<i>P. vulgaris</i> UPV/EHU	-	Indet
<i>S. linder</i> 235 UPV/EHU	+	12,08	<i>E. cloacae</i> UPV/EHU	-	Indet
<i>S. cremieu</i> 232 UPV/EHU	+	15,19	<i>C. freundii</i> UPV/EHU	-	Indet
<i>S. duess</i> 246 UPV/EHU	+	13,40	<i>K. pneumoniae</i> UPV/EHU	-	Indet
<i>S. cubana</i> 238 UPV/EHU	+	9,56	<i>P. aeruginosa</i> UPV/EHU	-	Indet
<i>S. branderup</i> 241 UPV/EHU	+	17,41	<i>E. coli</i> CECT 679 UPV/EHU	-	Indet
<i>Salmonella</i> IV 6, 14 259 UPV/EHU	+	19,24	<i>H. alvei</i> UPV/EHU	-	Indet
			<i>Shigella</i> sp. UPV/EHU	-	Indet

Como se observa en la Tabla 2, la sonda diseñada fue capaz de detectar los serotipos de *Salmonella* sp. más comunes en nuestro entorno. No obstante, algún ensayo con serotipos foráneos no comunes en nuestra zona no dieron el resultado positivo esperado. Con el fin de asegurar un resultado óptimo en la detección de *Salmonella* sp., se propuso el diseño de una nueva sonda de las mismas características que la testada, pero con la capacidad de detectar un mayor número de serotipos.

La sonda INVAVITONE también se utilizó para detectar *Salmonella* sp. en muestras reales de alimentos procedentes de Laboratorios Bromatológicos Araba. Las muestras se obtuvieron de diversas matrices alimentarias reales. El ADN fue extraído mediante el protocolo de extracción con Chelex y se realizó la hibridación en el termociclador. Se analizó en paralelo la detección mediante inmunocentración con el equipo MiniVidas® de la empresa Biomerieux. El número de muestras analizado fue de 170, incluyendo en algunas ocasiones réplicas del mismo alimento o colonias pertenecientes a la misma muestra.

Así mismo, la sonda INVAVITONE se utilizó para comprobar la detección de ARN mensajero en matrices alimentarias inoculadas con serotipos de *Salmonella* sp. Tras su incubación en caldos de enriquecimiento durante 24 horas a 37°C, el ARN fue extraído mediante un kit comercial (Nalgery-Machinery®). La aplicación de la retrotranscripción del ARN procedente de las diferentes pruebas de extracción a ADNc, mediante el uso del kit comercial de Applied-Biosystems, permitió su detección a tiempo real tras la amplificación e hibridación con la sonda INVAVITONE en el termociclador ABI-PRISM 7000 SDS® (Applied Biosystems).

Durante esta fase de la invención se ha abordado la mejora de la sonda específica de *Salmonella* sp. INVAVITONE, controles internos de amplificación así como el desarrollo de otra sonda con capacidad para detectar al control interno, con el objetivo de obtener los reactivos necesarios y suficientes para el desarrollo de un kit comercial de detección de este patógeno. Tomando como base la secuencia genética *invA*, se diseñaron cebadores flanqueadores de la región correspondiente a la amplificación e hibridación de la sonda INVAVITONE, que generarían un fragmento de aproximadamente 300 pares de bases que podría ser secuenciado por procesos automáticos. Una vez sintetizados los cebadores por la empresa Qiagen-Izasa, se utilizaron para amplificar por PCR la citada secuencia en los serotipos de *Salmonella* sp. con hibridación negativa a la sonda INVAVITONE, junto con controles positivos. Se obtuvieron bandas de ADN de los tamaños esperados que, tras su purificación mediante kit comercial, fueron enviados para su

ES 2 327 703 B1

secuenciación a la empresa Sistemas Genómicos. Las secuencias genéticas obtenidas fueron analizadas mediante el programa de alineamiento ClustalW con el objetivo de determinar los motivos que provocaban la falta de amplificación e hibridación con la sonda INVAVITONE. Se encontraron polimorfismos genéticos a nivel de nucleótido que justificaban con claridad la ausencia de reactividad. Es decir, aunque el gen esté presente en la mayoría de los serotipos, no es posible su detección debido a mutaciones silentes que pudieran invalidar esta secuencia para su utilización diagnóstica por su falta de hibridación con la sonda. Un problema añadido es la existencia de varios miles de serotipos distintos de este microorganismo, de los cuales solo unos pocos están completamente secuenciados y sus secuencias depositadas en bases de datos internacionales a disposición de la comunidad científica.

10

2. Desarrollo de la sonda INVAVITWO

Partiendo de la información obtenida mediante la secuenciación de los serotipos que no reaccionaban con la sonda INVAVITONE más la información disponible en aquel momento en las bases genéticas, se desarrolló una nueva versión de sonda específica de *Salmonella* sp., buscando un lugar dentro del gen *invA* más estable y con menor alteración a nivel de nucleótido.

Para el desarrollo de la segunda sonda, se adquirió un equipo de PCR a tiempo real denominado iQcycler® de la casa comercial Bio-Rad que no presentaba el filtro necesario para la lectura con el fluoróforo VIC (empleado en la sonda INVAVITONE), lo que determinó la selección de fluoróforos para el marcaje de la segunda sonda. Ésta se diseñó mediante el programa Primer Express® y se solicitó a la empresa Applied Biosystems su marcaje en 5' con el fluoróforo 6-FAM, compatible para su detección en ambos equipos de PCR a tiempo real.

La segunda sonda desarrollada por nuestro equipo fue denominada INVAVTTWO. La secuencia de los nuevos cebadores y de la nueva sonda TaqMan-MGB® es la siguiente:

INVAVITWO-F	SEQ ID NO:2	5´-AAAGGAAGGGACGTCGTTAGG-3´
INVAVITWO-R	SEQ ID NO:3	5´-CAGTGGTACGGTCTCTGTAGAAACTT-3´
Sonda INVAVITWO	SEQ ID NO:4	5´-FAM-CTGATTGGCGATCTC-MGB-3´

35

Así mismo, se optimizaron las concentraciones de nueva sonda TagMan-MGB® así como la concentración de los dos cebadores. Las concentraciones óptimas de los cebadores y de la sonda TaqMan-MGB® por reacción aparecen en la Tabla 3.

40

TABLA 3

45

Concentraciones óptimas de los cebadores y de la sonda INVAVITWO

CEBADORES ¹ Y SONDA ²	CONCENTRACIÓN
INVAVITWO-F ¹	400 nM
INVAVITWO-R ¹	400 nM
INVAVITWO ²	100 nM

50

55

60

65

ES 2 327 703 B1

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo usando la siguiente mezcla de reacción

5	MASTER	12,5 µl
	Primer INVAVITWO-F	1 µl
	Primer INVAVITWO-R	1 µl
10	Sonda INVAVITWO	0,25 µl
	Control Interno (dil.10-4)	3 µl
	Sonda CI	0,25µl
	DNA	5 µl
15	Agua	2 µl
	Volumen Final=	25 µl

20

y las siguientes condiciones de la amplificación:

25

1 CICLO 50°C 2 minutos

30

1 CICLO 95°C 10 minutos

35

36 CICLOS 95°C 15 minutos
60°C 1 minuto

40

Se eligió una master de amplificación que tuviera AmpErase® uracil-N-glicosilasa (UNG). UNG es un enzima recombinante de 26-kDa, que permite eliminar la contaminación con amplificados provenientes de anteriores ciclos de amplificación el enzima degrada el ADN que lleva dUTPs incorporados en lugar de los dTTPs del “ADN natural”. Esto va a impedir la aparición de falsos positivos por la mencionada contaminación.

45

La sonda INVAVITWO fue evaluada en cuanto a los test de inclusividad como de exclusividad con una amplia colección de ADNs procedentes de la colección de serotipos de *Salmonella* sp. disponibles en la Facultad de Farmacia de la UPV/EHU, junto con cepas de otros microorganismos pertenecientes a otras especies. Como puede observarse en la tabla adjunta (Tabla 4), los resultados mejoraron notablemente con respecto a la sonda INVAVITONE, ya que detectó la práctica totalidad de los serotipos probados (inclusividad), junto con una gran exclusividad, ya que no se detectaba ningún falso positivo en otros microorganismos estudiados (Tabla 4).

50

(Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

ES 2 327 703 B1

TABLA 4

Resultados de la detección de serotipos de *Salmonella* sp. mediante la sonda INVAITWO

Microorganismo		Ct	Microorganismo		Ct
<i>S. enteritidis</i> 26 UPV/EHU	+	27,16	<i>S. enteritidis</i> PT4 169 UPV/EHU	+	27,89
<i>S. typhimurium</i> 75 UPV/EHU	+	17,9	<i>S. enteritidis</i> PT1 175 UPV/EHU	+	29,46
<i>S. californica</i> 340 UPV/EHU	+	28,21	<i>S. enteritidis</i> PT1 183 UPV/EHU	+	29,22
<i>S. hadar</i> 456 UPV/EHU	+	28,6	<i>S. enteritidis</i> PT8 192 UPV/EHU	+	27,9
S. IV 48 240 UPV/EHU	+	14,23	<i>S. enteritidis</i> PT2 202 UPV/EHU	+	27,36
<i>S. montevideo</i> 328 UPV/EHU	-	Undet	<i>S. enteritidis</i> PT8 205 UPV/EHU	+	31,47
S. 4:5:12:I:- 10B- UPV/EHU	+	17,43	<i>S. typhimurium</i> 59 UPV/EHU	+	18,06
<i>S. typhimurium</i> DT104 128 UPV/EHU	+	19,02	<i>S. typhimurium</i> DT66 72 UPV/EHU	+	18,45
<i>S. enteritidis</i> PT4 39 UPV/EHU	+	28,08	<i>S. typhimurium</i> DT12 74 UPV/EHU	+	17,46
<i>S. virchow</i> 7 UPV/EHU	+	17,37	<i>S. typhimurium</i> DT120 76 UPV/EHU	+	18,19
<i>S. miami</i> 8 UPV/EHU	+	26,31	<i>S. typhimurium</i> DT193 78 UPV/EHU	+	18,15
<i>S. abony</i> 10 UPV/EHU	+	18,37	<i>S. typhimurium</i> DT52 245 UPV/EHU	+	17,65
<i>S. dublin</i> 59 UPV/EHU	+	30,5	<i>S. arizonae</i> 20 UPV/EHU	+	12,61
<i>S. blockley</i> 247 UPV/EHU	+	18,36	S. IIIb 48 250 UPV/EHU	+	12,87
<i>S. heidelberg</i> 312 UPV/EHU	+	18,72	S. IIIa 48 314 UPV/EHU	+	14,34
<i>S. anatum</i> 271 UPV/EHU	+	18,79	S. IIIb 58 257 UPV/EHU	+	16,26
<i>S. muenchen</i> 270 UPV/EHU	+	22,23	S. IIIa 48 264 UPV/EHU	+	15,02
<i>S. litchfield</i> 273 UPV/EHU	+	19,05	<i>S. miami</i> 261 UPV/EHU	+	24,5
<i>S. fayed</i> 276 UPV/EHU	+	32,55	<i>S. hadar</i> 268 UPV/EHU	+	17,99
<i>S. hadar</i> 275 UPV/EHU	+	18,22	<i>S. agona</i> 263 UPV/EHU	+	23,42
<i>S. enteritidis</i> PT1 119 UPV/EHU	+	30,58	<i>P. vulgaris</i> UPV/EHU	-	Indet
<i>S. lindenburg</i> 235 UPV/EHU	+	16,89	<i>E. cloacae</i> UPV/EHU	-	Indet
<i>S. cremieu</i> 232 UPV/EHU	+	18,53	<i>C. freundii</i> UPV/EHU	-	Indet
<i>S. duesseldorf</i> 246 UPV/EHU	+	25,38	<i>K. pneumoniae</i> UPV/EHU	-	Indet
<i>S. cubana</i> 238 UPV/EHU	+	24,98	<i>P. aeruginosa</i> UPV/EHU	-	Indet
S. Branderup 241 UPV/EHU	+	18	<i>E. coli</i> CECT 679 UPV/EHU	-	Indet
S. IV 6, 14 259 UPV/EHU	+	19,04	<i>H. alvei</i> UPV/EHU	-	Indet
			<i>Shigella</i> sp. UPV/EHU	-	Indet

ES 2 327 703 B1

La sonda INVAVITWO fue probada con muestras reales en Laboratorios Bromatológicos Araba mediante la extracción de ADN utilizando el protocolo de Chelex y en paralelo con la técnica de inmunocentración con el equipamiento MiniVidas de la casa Biomerieux, y utilizando el equipo iQcycler de la casa Bio-Rad. El número de muestras alimentarias analizado con ambos procedimientos supera las 200.

3. Desarrollo del control interno de amplificación para la sonda INVAVITWO

El estudio de la PCR para la detección de patógenos en alimentos puede verse afectada por la presencia de sustancias presentes en las matrices alimentarias con capacidad para la inhibición de la enzima *Taq* polimerasa presente en la reacción. Por este motivo se diseñó un ADN control que pueda co-amplificarse, de tal manera que se pueda asegurar que un resultado negativo con la sonda específica del microorganismo no se debe a inhibición de la *Taq* polimerasa, si no a falta de complementariedad entre la sonda y la secuencia o a ausencia de amplificación por ausencia de anillamiento de los cebadores.

Se diseñó una estrategia de obtención mediante PCR de un ADN quimérico generado por amplificación de un fragmento específico del bacteriófago λ modificado mediante la adición de extremos complementarios a los cebadores INVAVITWO-F e INVAVITWO-R. Tras su detección mediante electroforesis y purificación mediante kit comercial, el control interno se diluyó hasta 1/10.000 para su incorporación como ADN control positivo en las muestras.

Posteriormente se realizó una purificación del ADN que se había obtenido en la PCR utilizando el resto de la muestra que no se ha cargado en el gel. La purificación se hizo con un kit específico para ello [kit QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)] siguiendo las instrucciones del fabricante.

El producto obtenido es el control interno, que se guardó a -20°C como stock.

La amplificación del ADN del fago lambda se llevó a cabo con la pareja de cebadores CI INVAVITWO-F (SEQ ID NO: 11) y CI INVAVITWO-R (SEQ ID NO: 12) de secuencia:

CI INVAVITWO-F (SEQ ID NO: 11):

5'-AAAGGAAGGGACGTCGTTAGGGTGCGGTTATAGCGGTC-3'

CI INVAVITWO-R (SEQ ID NO: 12):

5'-TCAGTGGTACGGTCTCTGTAGAACTTCGGAACTTACAACC-3'

Las secuencias subrayadas pertenecen a los cebadores INVAVITWO-F e INVAVITWO-R que amplifican el gen *invA* de *Salmonella*, mientras que las secuencias en negrita pertenecen al fago λ que se incorporan para que formen parte de los cebadores y puedan amplificar un fragmento de fago λ convirtiéndolo en control interno.

La reacción de PCR para la generación del control interno se lleva a cabo mediante amplificación de una muestra de ADN del fago lambda digerido con EcoRI y HindIII (SIGMA) usando la siguiente mezcla de reacción:

	[inicial]	[final]	x1
PCR Buffer	10X	1X	2,5 μ l
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	0,75 μ l
dNTP Mix	25 mM	0,25 mM	0,25 μ l
CI INVAVITWO-F	10 μ M	0,4 μ M	1 μ l
CI INVAVITWO-R	10 μ M	0,4 μ M	1 μ l
Taq Polimerasa	5U	1U	0,2 μ l
ADN (fago λ)			1 μ l
Agua			18,30 μ l
Volumen final			25 μ l

ES 2 327 703 B1

y las siguientes condiciones de PCR

1 ciclo	95°C	1 minuto
35 ciclos	95°C	30 segundos
	60°C	30 segundos
	72°C	30 segundos
1 ciclo	72°C	10 minutos

Una vez realizada la PCR, se comprobó que había habido amplificación de los productos. Para eso se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2%. Se cargó parte de las muestras en los pocillos del gel (5 μ l muestra + 5 μ l de tampón de carga.) y se tiñó el gel con bromuro de etidio para comprobar que aparecía la banda del tamaño deseado. Con estos cebadores se amplificó un fragmento de 150 pb de fago λ (SEQ ID NO: 13):

5' **AAAGGAAGGGACGTCGTTAGGGTGCGGTTATAGCGGTC**CGGCTGTCGCGGATGA
 ATATGACCAGCCAACGTCGGATATCACGAAGGATAAATGCAGCAAATGCCTGAGCG
GTTGTAAGTTCCGAAGTTTCTACAGAGACCGTACCACTGA3'

Este fragmento será el control interno, que en la PCR a tiempo real amplificará con los mismos cebadores que se utilizan para detectar *Salmonella* (INVAVITWO-F e INVAVITWO-R). El producto de amplificación del control interno se detecta mediante el uso de una sonda específica de secuencia TGCGGTTATAGCGGTCGGCTG (SEQ ID NO:14) marcada en 5' con el fluoróforo TAMRA y en 3' con DDQI (Deep Dark Quencher I) de forma que la sonda tiene la secuencia

5'TAMRA-TGCGGTTATAGCGGTCGGCTG-DDQI 3'

5' AAAGGAAGGGACGTCGTTAGGG**TGCGGTTATAGCGGTCGGCTG**TGCGGATGAATATGACC
 AGCCAACGTCGGATATCACGAAGGATAAATGCAGCAAATGCCTGAGCGGTTGTAAGTTCCGAAG
 TTTCTACAGAGACCGTACCACTGA3'

en donde la zona del control interno donde hibridará la sonda se muestra en negrita y subrayado.

4. Aislamiento del ARN y retrotranscripción del mismo

El ADN bacteriano tras ser sometido a tratamientos de pasteurización, esterilización o radiación puede ser detectado por PCR. Esto es un hecho constatado que ha sido observado al someter diferentes extracciones de ADN a diferentes tratamientos de pasteurización y esterilización. Esto implica, que una bacteria muerta, podría ser detectada (su ADN) y considerarse, como un resultado positivo, dando lugar a un falso positivo. Parece entonces claro que la estrategia para detectar células vivas, o en fase de replicación, puede pasar por la detección del ARNm.

Una vez aislado el ARNm, éste se transformó en ADNc mediante la enzima transcriptasa inversa en el proceso denominado retrotranscripción mediante PCR (RT-PCR). Una vez transformado en ADNc se detectó por PCR a tiempo real mediante la sonda INVAVITWO (SEQ ID NO: 4) marcada con fluorescencia.

A continuación, se procedió a extraer ARN de *Salmonella* con métodos comerciales (NucleoSpin® Machery-Nagel for ARN) (ver protocolo en la sección 4.1) tras lo cual se trató con DNasa para eliminar el posible ADN contaminante que pudiese dar origen a un falso positivo. El ARN se almacenó a -80°C para su conservación o a -20°C si el análisis posterior va a ser realizado inmediatamente.

Las extracciones de ARN se midieron en un espectrofotómetro NanoDrop® ND-100 y se obtuvieron buenas medidas. Los ratios obtenidos 260/280 fueron 2 o valores cercanos a 2. La cantidad de ARN extraído fue baja por lo que no se pudo visualizar ARN al hacer geles de agarosa desnaturalizantes con formaldehído. Sin embargo la cantidad de ARN fue suficiente para ser utilizado como diana en una RT-PCR. En las RT-PCRs la eficacia de transferencia desde ARN a cADN, no es alta, aun así, la posterior detección con sondas TaqMan-MGB® fue lo suficientemente sensible como para solventar este inconveniente. Se utilizó un protocolo de RT-PCR de la casa comercial Applied Biosystems con 5 μ l de muestra inicial de ARN (ver protocolo en la sección 4.1).

ES 2 327 703 B1

La extracción del ADN se llevó a cabo mediante el kit NUCLEOSPIN®. Para ello, se centrifugaron muestras de 1 ml de cultivo en un tupo de 1.5 ml durante 5 min a 13000 rpm. El pellet se resuspendió en 50 µl de TEL (TE buffer que contiene 0,2 mg/ml de lisozima) y se incubó 10 minutos a 37°C. A continuación se añadieron 350 µl de buffer RA1 y 3,5 µl de β-mercaptoetanol. El contenido se transfirió a las unidades NucleoSpin® Filter que fueron centrifugadas durante 1 minuto a 11.000 r.p.m. Se añadieron 350 µl de etanol (70%) al filtrado y se transfirió a las columnas NucleoSpin® RNA II column, se centrifugó durante breves segundos a 8.000 rpm. y se transfirió la columna a un nuevo colector. A continuación se añadieron 350 µl de MDB (Membrane Desalting Buffer), se centrifugaron las columnas durante 1 minuto a 11000 rpm.

A continuación, se añadió a cada columna 95 µl de una solución patrón de DNase formada por 10 µl de DNasa I y 90 µl de tampón de reacción de DNasa. Las columnas se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron a cada columna 200 µl de buffer RA2 y se dio un pulso con la la centrifuga a 8.000 rpm. Las columnas fueron transferidas a un nuevo colector. A continuación, se añadieron 600 µl de buffer RA3, se dio un pulso en la centrifuga a 8000 rpm, se descartó el líquido filtrado y se volvió a poner la columna en ese mismo colector. A continuación se añadieron 250 pl de buffer RA3. Se centrifugaron las columnas durante 2 minutos a 11.000 rpm para secar el filtro por completo. La columna se transfirió a un tubo de 1,5 ml y, a continuación, se añadieron 60 µl de H₂O (RNase-free) y se centrifugaron las columnas durante 1 minuto a 11.000 rpm. Se recogió el contenido del tubo.

La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo usando la siguiente mezcla de reacción:

10 X TaqMan RT buffer	1,0 µl
25 mM MgCl ₂	2,2 µl
DeoxyNTPs (2.5 mM)	2,0 µl
Random Hexamers (50 µM)	0,5 µl
Rnase Inhibitor (20U/µl)	0,2 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase	0,25 µl
RNA sample	3,85 µl
Volumen final=	10 µl

usando las siguientes condiciones:

1 CICLO	25°C 10 MINUTOS.
1 CICLO	48°C 30 MINUTOS.
1 CICLO	95°C 5 MINUTOS.

Las extracciones de ARN se guardaron congeladas, aunque si se iban a utilizar en breve se guardaron a -20°C y si se iban a utilizar más tarde a -80°C.

Los resultados obtenidos fueron válidos, detectando ADNc en todos los ensayos realizados y no se detectó ningún tipo de ADN contaminante en las extracciones de ARN. Esto implicó que el ADNc detectado era copia del ARN extraído, que a su vez es indicador de la actividad bacteriana. Se han realizaron ensayos de RT-PCR a tiempo real en el que se han empleando cultivos puros de varias especies bacterianas diferentes del genero *Salmonella* procedentes del archivo de aislamiento del Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología de la UPV/EHU. Paralelamente, se realizaron pruebas con muestras de cultivo puro de varias cepas de *Salmonella* hervidas, esterilizadas y pasteurizadas. Como controles negativos se emplearon muestras de *E. coli* cepa CECT 679 y *Shigella sp* cepa CECT 583. Los resultados obtenidos fueron muy satisfactorios, de forma que las diferentes muestras de *Salmonella* testadas fueron detectadas. Los controles negativos y las muestras pasteurizadas y hervidas dieron también el resultado esperado. La especificidad y la resolución de la tecnología TaqMan MGB demostró ser capaz de detectar cantidades muy bajas de ARNm, por lo que la técnica de RT-PCR a tiempo real testada es válida para la detección de células viables de *Salmonella sp*.

ES 2 327 703 B1

C. Detección de ARNm de *Salmonella* sp. en alimentos

La finalidad del ensayo fue comprobar los métodos de detección de ADN y ARN mensajero, la retrotranscripción, la hibridación con sondas a tiempo real y la detección de los controles internos de amplificación en distintas matrices alimentarias, inoculando todas ellas de manera artificial con la cepa control *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium nº 75 del cepario de la UPV/EHU.

Las matrices alimentarias que se utilizaron en este ensayo, numeradas de esta misma forma, fueron las siguientes:

1. Pollo autoclavado e inoculado posteriormente con la cepa control en agua de peptona tamponada, incubado a 37°C, durante 24 horas.
2. Pescado autoclavado e inoculado posteriormente con la cepa control en agua de peptona tamponada, incubado a 37°C, durante 24 horas.
3. Bollo autoclavado e inoculado posteriormente con la cepa control en agua de peptona tamponada, incubado a 37°C, durante 24 horas.
4. Medio TSB inoculado con la cepa control, incubado a 37°C, durante 24 horas.

Se utilizaron dos métodos para extraer el material genético:

- Extracción de ADN con el protocolo Chelex.
- Extracción de ARN con el kit comercial NucleoSpin.

Una vez obtenidas las extracciones de ADN de cada una de esas muestras, se guardaron a 4°C para su uso posterior. En el caso del ARN, una vez realizados los protocolos de extracción, se realizó la retrotranscripción para convertir así el ARN en ADNc. Una vez conseguidas las muestras de ADN y cADN, se realizó la amplificación/detección con la sonda INVAITWO en una PCR a tiempo real. Esta sonda está marcada con el fluoróforo FAM y se encarga de detectar la presencia de *Salmonella*. También se añadió en cada muestra un Control Interno de Amplificación que es detectado por una sonda marcada en TAMRA, que sirve como indicador de que no se ha producido inhibición en la amplificación.

Además de las muestras de ADN y ADNc procedentes de las distintas matrices alimentarias también se amplificó un Control Positivo que se trataba de una muestra de ADN de la *Salmonella* serotipo Typhimurium nº 75 obtenida por hervido y un Control Negativo (NTC) en el que en vez de ADN se añade agua estéril.

Resultado

Tanto los controles positivos como los negativos dieron resultados esperados: el Control Positivo dio un resultado positivo y en el Control Negativo el resultado fue negativo. No se produjo inhibición de la PCR ya que se obtuvo amplificación del Control Interno de Amplificación.

Los resultados que se obtuvieron tras la PCR a tiempo real con las matrices alimentarias se muestran en la Tabla 5.

TABLA 5

Detección de ADN y ARN de Salmonella sp. mediante PCR a tiempo real y sonda INVAITWO en matrices alimentarias artificialmente contaminadas

MUESTRA	EXTRACCIÓN ADN CHELEX	EXTRACCIÓN ARN NUCLEOSPIN
1. Pollo autoclavado	+	+
2. Pescado autoclavado	+	+
3. Bollo autoclavado	+	+
4. TSB	+	+

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método *in vitro* para la detección de *Salmonella* sp. en una muestra que comprende
- (i) realizar una reacción de amplificación a partir de una preparación de ácidos nucleicos derivada de dicha muestra empleando una pareja de cebadores capaz de amplificar una región del gen *invA* de *Salmonella* sp. que comprende la región de dicho gen que corresponde a la región comprendida entre los nucleótidos 1001 y 1069 en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1, y
- 10 (ii) detectar el producto de amplificación generado en la etapa (i).
- 15 2. Método según la reivindicación 1, en donde la pareja de cebadores comprende las secuencias SEQ ID NO: 2 y 3.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde la reacción de amplificación se lleva a cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.
- 20 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la detección del producto de amplificación se lleva a cabo mediante un agente intercalante fluorescente.
5. Método según la reivindicación 4, en donde el agente intercalante es SYBR Green.
- 25 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la detección del producto de amplificación se lleva a cabo mediante una sonda marcada.
7. Método según la reivindicación 6, en donde la sonda comprende en su extremo 5' un pigmento reportero y en su extremo 3' un pigmento quencher.
- 30 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 y 7, en donde la sonda comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 4.
- 35 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la amplificación se lleva a cabo en presencia de un ADN exógeno cuyos extremos contienen secuencias que pueden ser amplificadas usando los mismos cebadores que los usados para amplificar una región del gen *invA* de *Salmonella* sp. que comprende la región de dicho gen que corresponde a la región comprendida entre los nucleótidos 1001 y 1069 en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1.
- 40 10. Método según la reivindicación 9, en donde el ADN exógeno comprende un fragmento del genoma del fago λ .
11. Método *in vitro* para la detección de *Salmonella* sp. en una muestra que comprende
- 45 (i) realizar una reacción de amplificación a partir de una preparación de ácidos nucleicos derivada de dicha muestra empleando una pareja de cebadores que comprende las secuencias SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6; y
- (ii) detectar el producto de amplificación mediante el empleo de una sonda marcada, en donde dicha sonda comprende en su extremo 5' un pigmento reportero y en su extremo 3' un pigmento quencher y presenta la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 7.
- 50
12. Método según la reivindicación 11, en donde la amplificación se lleva a cabo en presencia de un ADN exógeno cuyos extremos contienen secuencias que pueden ser amplificadas usando la pareja de cebadores que comprende las secuencias SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.
- 55
13. Método según la reivindicación 12, en donde el ADN exógeno comprende un fragmento del genoma del fago λ .
- 60 14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde preparación de ácidos nucleicos comprende ADN genómico y/o ADNc obtenido a partir del ARN.
15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde la muestra es seleccionada del grupo que comprende una muestra ambiental, una muestra clínica y una muestra alimentaria.
- 65 16. Un oligonucleótido cuya secuencia se selecciona del grupo de las secuencias SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7.

ES 2 327 703 B1

17. Un kit que comprende una pareja de cebadores capaz de amplificar una región del gen *invA* de *Salmonella* sp. que comprende la región de dicho gen que corresponde a la región comprendida entre los nucleótidos 1001 y 1069 en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1.
- 5 18. Kit según la reivindicación 17, en donde la pareja de cebadores comprende las secuencias SEQ ID NO: 2 y 3.
19. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 17 ó 18 que comprende, además, una sonda marcada capaz de detectar el producto de amplificación.
- 10 20. Kit según la reivindicación 19, en donde la sonda comprende en su extremo 5' un pigmento reportero y en su extremo 3' un pigmento quencher.
21. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 19 ó 20, en donde la sonda comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 4.
- 15 22. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 17 ó 18 que comprende, además, un agente intercalante fluorescente.
23. Kit según la reivindicación 22, en donde el agente intercalante es SYBR Green.
- 20 24. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 23 que comprende, además, un ADN exógeno cuyos extremos contienen secuencias que pueden ser amplificadas usando los mismos cebadores que los usados para amplificar una región del gen *invA* de *Salmonella* sp. que comprende la región de dicho gen que corresponde a la región comprendida entre los nucleótidos 1001 y 1069 en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1.
- 25 25. Kit según la reivindicación 24, en donde el ADN exógeno comprende un fragmento del genoma del fago λ .
26. Un Kit que comprende (i) la pareja de cebadores SEQ ID NO: 5/SEQ ID NO: 6 y (ii) una sonda marcada, en donde dicha sonda comprende en su extremo 5' un pigmento reportero y en su extremo 3' un pigmento quencher y presenta la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 7.
- 30 27. Kit según la reivindicación 26 que comprende, además, un ADN exógeno cuyos extremos contienen secuencias que pueden ser amplificadas usando la pareja de cebadores SEQ ID NO: 5/SEQ ID NO: 6.
- 35 28. Kit según la reivindicación 27, en donde el ADN exógeno comprende un fragmento del genoma del fago λ .
29. Uso de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 28 para la detección de *Salmonella* sp. en una muestra.
- 40 30. Uso según la reivindicación 29, en donde la muestra se selecciona del grupo que comprende una muestra ambiental, una muestra clínica y una muestra alimentaria.

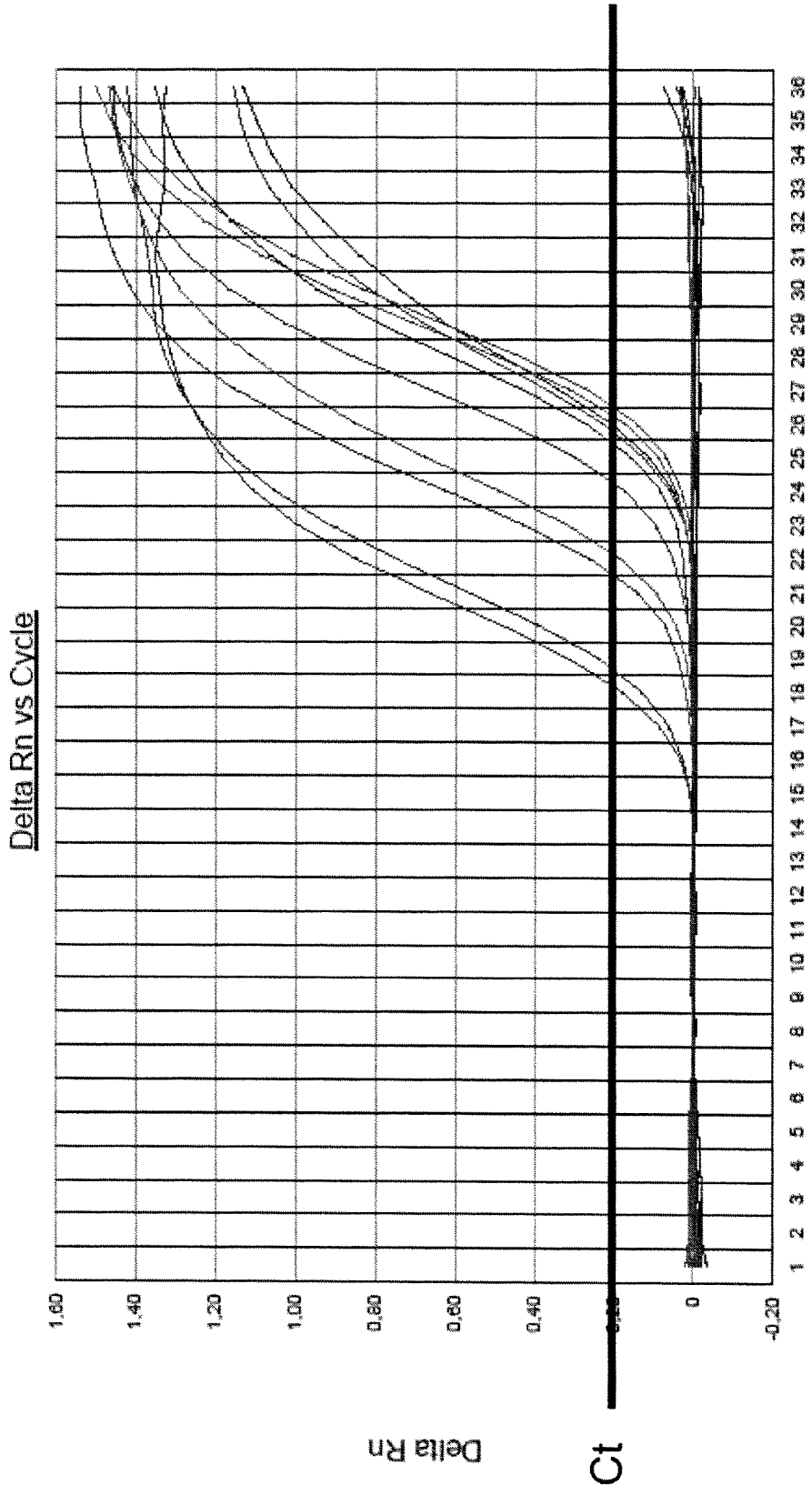
45

50

55

60

65



Cycle Number

Selected Detector: INVAVITWO; Start: 6; End: 15; Threshold: 0.20000000
Well(s): A1-H12
Document: INVAVITWO 13-12-2006 (Absolute Quantification)

FIGURA 1

ES 2 327 703 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO

<110> LABORATORIOS ARABA

5

<120> MÉTODOS Y REACTIVOS PARA LA DETECCIÓN DE *SALMONELLA* SP.

<130> P3640ES00

10

<160> 14

<170> PatentIn version 3.3

15

<210> 1

<211> 1950

<212> ADN

20

<213> *Salmonella enterica*

<400> 1

25

aacagtgctc gtttacgacc cgaattactg atcctggtac taatggtgat gatcatttct 60

atgttcgtca ttccattacc tacctatctg gttgatttcc tgatcgcgct gaatatcgta 120

30

ctggcgatat tgggtgtttat ggggtcgttc tatattgaca gaatcctcag tttttcaacg 180

tttctctgcg tattgttaat aacaacactc tttcgtctgg cattatcgat cagtaccagc 240

cgtcttatct tgatcgaggc cgatgccggg gaaattatcg ccacgttcgg gcaatttggt 300

35

attggcgata gcctggcggg gggttttggt gtcttctcta ttgtcactgt ggttcagttt 360

atcgttatta ccaaaggttc agaacgcgtc gcggaagtcg cggcacgttt ttctctggat 420

40

ggtatgcccg gtaaacaat gagtatagat gccgatttga aggccggtat tattgatgcg 480

gatgccgcac gcgaacggcg aagcgtactg gaaagggaaa gtcagcttta cggttccttt 540

45

gacggtgcca tgaagtttat caaagggtgac gccattgccg gtatcattat catctttgtg 600

aactttattg gcggtatttc ggtggggatg acccgccatg ggatggattt atcctccgct 660

ctgtctactt atactatgct gaccatcggc gatggtcttg tcgcccagat ccctgcactg 720

50

ttaattgcca ttagtgccgg ttttatcgtg actcgcgtaa atggcgatac ggataaatatg 780

ggccggaata ttatgacgca actgttgaac aaccatttg ttttggttgt tacggctatt 840

55

ctgaccattt caatgggaac cctgccagga tttccgctgc cggtttttgt cattctgtcg 900

gtggttttaa gcgtactctt ctattttaaa ttccgtgaag caaaacgtag cgcaggcacg 960

cctaaaacca gcaaaggcga gcagccgctc agtattgagg aaaaggaagg gacgtcgtta 1020

60

ggactgattg gcgatctcga taaagtttct acagagaccg taccactgat attacttgtg 1080

ccgaagagtc gacgtgaaga tctggaaaaa gcacagcttg cggatcgtct acgcagtcag 1140

65

ttctttattg actatggctg gcgcctgccg gaagtattgt tacgcgatgg tgaggggctg 1200

gacgataaca gcattgtatt gttgattaat gagatccgtg ttgaacaatt tacggtctat 1260

ES 2 327 703 B1

	tttgatttga tgcgagtggg aaattattcg gatgaagtcg tttcctttgg cattaatcca	1320
5	actacccatc agcaaggtag cagtcagtat ttctgggtga cgcatagaaga aggggaaaag	1380
	cttcgtgagc ttggttatgt gctgcggaac gcgcttgacg agctctacca ctgtctggcg	1440
	gtgacactgg cgcgcaacgt caatgaatat ttcggtattc aggaaacaaa acatatgctg	1500
10	gatcagttgg aggcaaaatt tcctgattta cttaaagaag tgctcagaca tgctaccgtg	1560
	caacgtatat cggaagtttt gcagcgctg ttaagtgaac gtgtttccgt gcgtaatatg	1620
15	aaattaatta tggaagcgct cgcattatgg gcgccaagag aaaaagacgt cattaacctg	1680
	gtggaacata ttcgtggagc tatggcgcggt tataatctgcc ataaattcgc caatgggtgg	1740
20	gaattacgag cagtaatggt atctgctgaa gttgaggatg ttattcgcaa agggatccgt	1800
	cagacctctg gcagtacctt cctcagcctt gaaccggaag cctccgctaa tttgatggat	1860
25	ctcattacac ttaagctgga tgatttattg attgcacata aagaccttgt cctccttacg	1920
	tctgtcgatg tccgtcgatt tattaagaaa	1950

<210> 2

30 <211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

35 <220>

<223> cebador INVAVITWO directo

<400> 2

40	aaaggaaggg acgtcgtag g	21
----	------------------------	----

<210> 3

45 <211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

50 <220>

<223> cebador INVAVITWO inverso

<400> 3

55	cagtgtagc gtctctgtag aaac	24
----	---------------------------	----

<210> 4

60 <211> 15

<212> ADN

<213> Artificial

65 <220>

<223> sonda INVAVITWO

ES 2 327 703 B1

	<400> 4	
	ctgattggcg atctc	15
5	<210> 5	
	<211> 24	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador INVAVITONE directo	
15	<400> 5	
	ttaaattccg tgaagcaaaa cgta	24
20	<210> 6	
	<211> 18	
	<212> ADN	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador INVAVITONE inverso	
30	<400> 6	
	aaccagcaaa ggcgagca	18
35	<210> 7	
	<211> 12	
	<212> ADN	
40	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> sonda INVAVITONE	
45	<400> 7	
	cgcaggcacg cc	12
50	<210> 8	
	<211> 46	
	<212> ADN	
55	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador invA ICF	
60	<400> 8	
	gtgaaattat cgccacgttc gggcaagcag aacgaaaaag gtgagc	46
65	<210> 9	
	<211> 42	

ES 2 327 703 B1

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> cebador invA ICR	
	<400> 9	
10	tcatcgacc gtcaaaggaa cctgcactg ctcaatgcgc ca	42
	<210> 10	
15	<211> 348	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> fragmento de 348 pb de fago lambda amplificado con los cebadores SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9	
	<400> 10	
25	gtgaaattat cgccacgttc gggcaagcag aacgaaaaag gtgagccggt cacctggcag	60
	gggcgacagt atcagccgta tcccattcag gggagcggtt ttgaaactgaa tggcaaaggc	120
30	accagtacgc gccccacgct gacggtttct aacctgtacg gtatggtcac cgggatggcg	180
	gaagatatgc agagtctggt cggcggaacg gtggtccggc gtaaggttta cgcccgtttt	240
35	ctggatgcgg tgaacttcgt caacggaaac agttacgccg atccggagca ggaggtgatc	300
	agccgctggc gcattgagca gtgcagggtt cctttgacgg tgcgatga	348
	<210> 11	
40	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
45	<220>	
	<223> cebador CI INVAVITWO directo	
50	<400> 11	
	aaaggaaggg acgtcgtag ggtgcggta tagcggtc	38
	<210> 12	
55	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> cebador CI INVAVITWO inverso	
65	<400> 12	
	tcagtgtac ggtctctgta gaaactcgg aacttacaac c	41

ES 2 327 703 B1

<210> 13
<211> 150
<212> ADN
5 <213> Artificial

<220>
<223> fragmento de 150 pb del fago lambda amplificado con los cebadores SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12.
10

<400> 13
aaaggaaggg acgtcgtag ggtgcggtta tagcgggccg gctgtcgcg atgaatatga 60
15 ccagccaacg tccgatatca cgaaggataa atgcagcaaa tgcctgagcg gttgtaagtt 120
ccgaagtttc tacagagacc gtaccactga 150

20 <210> 14
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial
25

<220>
<223> sonda empleada para detectar el producto de amplificación de los cebadores SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO:
12.
30

<400> 14
tgcggtata gcggtccggc tg 22
35
40
45
50
55
60
65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 327 703

② Nº de solicitud: 200801267

③ Fecha de presentación de la solicitud: 30.04.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C12Q 1/62 (2006.01)
C12R 1/42 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2004046375 A2 (PHARMACIA ITALIA S.P.A.) 03.06.2004, páginas 7-10; ejemplos 26-29.	11-16, 26-30
A	EP 1233073 A2 (TOSOH CORPORATION SHINNANYO-SHI, YAMAGUCHI-KEN) 21.08.2002, página 2, líneas 45-50; página 3, líneas 1-14,26-32; tabla 1; reivindicaciones 3,5.	1-30
A	GALÁN, J. E. et al. Molecular and Functional Characterization of the <i>Salmonella</i> Invasion Gene <i>InvA</i> : Homology of <i>InvA</i> to members of a New Protein Family. <i>Journal of bacteriology</i> , Julio 1992, Vol. 174, No. 13, páginas 4338-4339. En particular, figura 5.	1-10,17-25
A	FIDELMA BOYD, E. et al. Comparative Genetics in the <i>Inv</i> -Spa Invasion Gene Complex of <i>Salmonella enterica</i> . <i>Journal of Bacteriology</i> . Marzo 2007. Vol. 179, No. 6, páginas 1985-1991. En particular, página 1987 y figura 2.	1-10,17-25
A	ALVAREZ, J. et al. Development of a Multiplex PCR Technique for Detection and Epidemiological Typing of <i>Salmonella</i> in Human Clinical Samples. <i>Journal of Clinical Microbiology</i> , Abril 2004. Vol. 42, No. 4 páginas 1734-1738. En particular, página 1734, columna 2.	1-30

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
29.07.2009

Examinador
N. Urquía Fernández

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, XPOAC, XPAIP, XPESP, BIOSIS, COMPDX, EMBASE, INSPEC, MEDLINE, GOOGLE SCHOLAR, EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.07.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-30	SÍ
	Reivindicaciones		NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-10, 17-25	SÍ
	Reivindicaciones	11-26, 26-30	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2004/043675 A2	03.06.2004
D02	EP1233073 A2 (TOSOH CORPORATION SHINNANYO-SHI, YAMAGUCHI-KEN) Página 2 líneas 45-50, página 3 líneas 1-14, 26-32, tabla 1, reivindicaciones 3 y 5.	21.08.2002
D03	Galán, J. E. et al. Molecular and Functional Characterization of the <i>Salmonella</i> Invasion Gene <i>InvA</i> : Homology of <i>InvA</i> to members of a New Protein Family. Journal of bacteriology, Julio 1992, Vol. 174, No.13, páginas 4338-4339. En particular Figura 5.	07-1992
D04	Fidelda Boyd, E. et al. Comparative Genetics in the <i>Inv</i> -Spa Invasion Gene Complex of <i>Salmonella enterica</i> . Journal of Bacteriology. Marzo 2007. Vol. 179, No. 6, páginas 1985-1991. En particular páginas 1987 y figura 2.	03-2007
D05	Alvarez, J. et al. Development of a Multiplex PCR Technique for Detection and Epidemiological Typing of <i>Salmonella</i> in Human Clinical Samples. Journal of Clinical Microbiology, Abril 2004. Vol. 42, No. 4 páginas 1734-1738. En particular, página 1734, columna 2.	04-2004

Observaciones sobre documentos:

D1 y D2 describen un método de detección de *Salmonella* sp. a través del uso de tecnología PCR en tiempo real, un kit de diagnóstico y los cebadores y sondas utilizados procedentes del gen *InvA* de *Salmonella*.

D3 describe las características funcionales y moleculares del gen *InvA* de *Salmonella*.

D4 describe un análisis del polimorfismo del gen *InvA* de *Salmonella*.

D5 describe la utilización de secuencias del fago lambda como control

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

1. NOVEDAD (Art. 6 Ley de Patentes) y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8 Ley de Patentes).

1.1 Reivindicación independiente 11 en combinación con las reivindicaciones dependientes 12, 13, 14 y 15

Se considera que el documento D01 constituye el estado de la técnica más próximo. En D01 se describe un método de detección de *Salmonella* caracterizado por las siguientes etapas:

1-realizar una amplificación a partir de una preparación de ácidos nucleicos derivado de la muestra empleando cebadores del gen *InvA* idénticos a las Secuencias SEQ ID NO: 5 y 6 ; y

2-detectar el producto de amplificación mediante el empleo de una sonda marcada con un marcador de fluorescencia en el extremo 5' (ejemplos 26 a 29). La diferencia con el método descrito en las reivindicación 11, reside en que la sonda marcada es diferente de la sonda correspondiente a la secuencia SEQ ID NO: 7 descrita en la reivindicación 11. Sin embargo la utilización de una sonda no descrita para detectar por hibridación fragmentos de DNA producidos por cebadores conocidos sobre un gen de secuencia conocida se considera exento de actividad inventiva.

El documento D01 utiliza además tecnología PCR en tiempo real como método de amplificación y detecta tanto DNA genómico como cDNA a partir de mRNA de la muestra. La utilización de DNA exógeno adicional, incluido el del fago lambda, como control para detectar falsos negativos es una metodología estándar conocida para el experto en la materia, tal y como se describe en el documento D05.

Hoja adicional

Por tanto el objeto de las reivindicaciones 11 a 15 es nuevo pero no es inventivo.

1.2 Reivindicación independiente 16.

En D01 se describen cebadores idénticos a los cebadores de secuencias SEQ ID NO: 5 y 6. Una sonda no descrita que detecta por hibridación fragmentos de DNA producidos por cebadores conocidos sobre un gen de secuencia conocida se considera exenta de actividad inventiva.

Por tanto la reivindicación 16 posee novedad pero no posee actividad inventiva.

1.3 Reivindicación independiente 26 en combinación con las reivindicaciones dependientes 27 a 30.

El documento D01 describe igualmente kits de diagnóstico que comprenden la pareja de cebadores idénticos a los cebadores de las secuencias SEQ ID NO: 5 y 6 de la reivindicación 26 (D01 ejemplo 26) y una sonda alternativa. La sonda caracterizada por la secuencia SEQ ID NO: 7 carece de actividad inventiva, tal y como ya se indicó, por lo que la reivindicación 26 posee novedad pero carece de actividad inventiva.

La utilización de secuencias exógenas, incluidas las del fago lambda, modificadas artificialmente en sus extremos para hibridar con las secuencias de los cebadores utilizados para la detección de falsos negativos es una mera alternativa de metodología de control estándar, tal y como se indicó anteriormente y no añade características técnicas a la invención.

El Kit descrito en las reivindicaciones 26, 27 y 28 no posee actividad inventiva y por tanto su uso para la detección de muestras de *Salmonella*, descrito en las reivindicaciones 29 y 30 tampoco.

La presente solicitud, por consiguiente no satisface el criterio del Artículo 8 de la ley de patentes pues el objeto de las reivindicaciones 11 a 16 y 26 a 30 no implica actividad inventiva.

1.4 Reivindicación independiente 1 combinada con las reivindicaciones dependientes 2 a 10.

El documento D03 describe la secuencia del gen y la secuencia esperada de la proteína del gen *InvA* de *Salmonella*, y el documento D04 analiza los polimorfismos de la secuencia de proteína y gen *InvA*. En D04 se indica que la zona menos polimórfica de la proteína se encuentra en su dominio I, que va del aminoácido 1 al 300. Se puede comprobar que los cebadores de secuencia SEQ ID NO 5 y 6 codifican aminoácidos del dominio II, más polimórfico que el dominio I. En la descripción de la invención se indica que los cebadores 5 y 6 detectan las cepas de *Salmonella* local y discriminan éstas de bacterias de otras especies, pero no sirven para detectar cepas de *Salmonella* foránea. En D02, se describen además otros cebadores que barren la secuencia del gen *InvA* sin detectar diferencias significativas entre cebadores en relación a la eficiencia del método.

El problema técnico a resolver consiste en localizar fragmentos de la secuencia del gen *InvA* que sean eficientes no solo para detectar todas las cepas locales, sino además todas las foráneas posibles, manteniendo su poder discriminador para *Salmonella*. Un experto en la materia hubiera dirigido la búsqueda de dichos fragmentos entre las secuencias más conservadas dentro de todas las cepas analizadas, es decir en zonas de la proteína y el gen con el mínimo polimorfismo detectado, el dominio I. Sin embargo los cebadores de SEQ 2 y 3 se localizan igualmente en el dominio 2 y muy próximos a las posiciones de los cebadores de secuencia SEQ ID NO: 5 y 6. Un experto en la materia esperaría que utilizando los cebadores de SEQ ID NO 2 y 3 los resultados serían muy similares a los obtenidos con los cebadores de SEQ ID NO: 5 y 6. Sin embargo, y de forma sorprendente, los ensayos de detección son más eficientes, detectando la totalidad de las cepas ensayadas, incluidas las foráneas, sin perder su poder de discriminación entre *Salmonella* y bacterias de otras especies distintas.

Por tanto la solución propuesta en las reivindicaciones 1 a 10 posee novedad y actividad inventiva

1.4 Reivindicación independiente 17 combinada con las reivindicaciones dependientes 18 a 25.

El kit descrito en las reivindicaciones 18 a 25 consiste en la utilización de dos cebadores y una sonda que poseen novedad y actividad inventiva, por tanto el kit reivindicado posee igualmente novedad y actividad inventiva.

En consecuencia, las reivindicaciones 1 a 10 y 17 a 25 poseen novedad y actividad inventiva conforme a los Artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes.