



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 344**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
C07K 14/255 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04078201 .3**
96 Fecha de presentación : **15.01.1996**
97 Número de publicación de la solicitud: **1538222**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.06.2005**

54 Título: **Oligonucleótidos para la detección de *Salmonella*.**

30 Prioridad: **16.01.1995 FR 95 00410**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.06.2011

73 Titular/es: **Institut Pasteur
25-28, rue du Docteur Roux
75724 Paris Cedex 15, FR
Institut National de la Santé et de la Recherche
Médicale (INSERM)**

72 Inventor/es: **Popoff, Michel Yvan y
Le Guern Fellous, Muriel**

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 360 344 T3

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

DESCRIPCIÓN

Oligonucleótidos para la detección de *Salmonella*.

5 El género *Salmonella* contiene dos especies, *Salmonella enterica*, especie dividida en seis subespecies basándose en características bioquímicas y de homología a nivel del ADN, y *Salmonella bongori*. El género se subdivide en más de 2.000 serovariedades definidas con ayuda de antígenos somáticos y flagelares. Las bacterias del género *Salmonella* son generalmente patógenas para el animal o para el ser humano. Así se sabe que las *Salmonella* se encuentran entre los agentes responsables de las intoxicaciones alimentarias más frecuentes en los países desarrollados: por esta razón, son importantes métodos de detección rápidos y fiables de las subespecies de *Salmonella*.

15 Las salmonelas responsables de las toxiinfecciones alimentarias pertenecen principalmente a la subespecie I (también denominada grupo I) de *S. enterica*.

No obstante, las toxiinfecciones no son las únicas patologías provocadas por infecciones de *Salmonella*.

20 Por ejemplo, *Salmonella enterica* subespecie enterica serovariedad typhi (a continuación denominada Typhi) es el agente que causa la fiebre tifoidea humana.

Teniendo en cuenta la naturaleza de las infecciones provocadas por las salmonelas y la necesidad especialmente de estudiar su presencia en las muestras biológicas obtenidas de los pacientes o en los alimentos, parece indispensable disponer de medios rápidos y sensibles para detectar su presencia.

25 Los métodos habituales de cultivo ampliamente utilizados hasta la fecha para la detección de las salmonelas requieren un tiempo importante y no están adaptados por ejemplo para hacer un seguimiento de la contaminación de productos alimentarios. Para vencer las desventajas de estos métodos, ya se han propuesto varios métodos basados en técnicas de biología molecular tales como pruebas de hibridación y las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa. Se han utilizado diferentes sondas de ADN en varios protocolos de hibridación y de PCR para detectar las subespecies de *Salmonella* en la alimentación. Sin embargo, ninguna de estas técnicas es completamente satisfactoria, ya que las secuencias utilizadas no se conocen completamente o no están exclusivamente presentes en el género *Salmonella* y de esta forma, pueden conducir a reacciones cruzadas entre la sonda y secuencias de ADN de otras enterobacterias o pueden conducir a un gran número de falsos negativos o de falsos positivos.

35 Los inventores han buscado medios que permiten la detección específica y sensible del conjunto de las salmonelas de las especies *S. enterica* y/o *S. Bongori*. Desde este punto de vista, se han interesado por la cepa de *Salmonella enterica* subespecie enterica serovariedad typhi (*S. typhi*) y por el gen que participa en la invasión de células por *S. typhi*.

40 Además, han definido determinadas condiciones que permiten la detección específica de grupos determinados de salmonelas, por ejemplo, bacterias del grupo I.

45 En el estado anterior de la técnica, ya se ha demostrado que la cepa Typhi puede adherirse a monocapas de células HeLa y de entrar en estas células (Yabuuchi *et al*, 1986). Sin embargo, hasta la fecha, no se han identificado claramente los determinantes genéticos implicados en este proceso de adhesión y de entrada en las células. Elsinghorst *et al*. (1989) han clonado un fragmento cromosómico de Typhi, que confiere a bacterias de tipo *Escherichia coli* la capacidad de penetrar en las células Henle 407. Recientemente, se han identificado y clonado otra región cromosómica implicada en la invasión de las células HeLa por la cepa Typhi Ty2 (Popoff y Dion, 1990).

50 Los inventores de la presente solicitud han identificado en un fragmento de ADN de 2,4 kb de *S. typhi* contenido en la secuencia HindIII de 7,9 kb descrita por Popoff y Dion (1990), regiones susceptibles de participar en la actividad de invasión de *Salmonella enterica* subespecie enterica serovariedad Typhi en células, y en participar en cultivos celulares de tipo HeLa, siendo estas regiones susceptibles además de ser utilizadas en reacciones para la realización de un diagnóstico generalizado de todos los representantes de las especies *S. enterica* y/o *S. bongori* o probablemente en condiciones de detección particulares, para el diagnóstico específico del grupo I de *S. enterica*.

60 Los inventores han identificado una secuencia denominada lagA y una secuencia denominada lagB y las han caracterizado por su participación en la invasión celular manifestándose durante una infección por *Salmonella enterica* subespecie enterica serovariedad Typhi.

65 La especificidad de estas secuencias en el seno de *S. typhi* ha hecho que los inventores propongan su utilización para definir unos medios para el diagnóstico de una infección por *S. typhi*, incluso para el diagnóstico de una infección por *Salmonella* de las especies *S. enterica* y/o *S. bongori* o en determinados casos para poner en evidencia *S. enterica* de grupos específicos.

Estos medios que se pueden utilizar para el diagnóstico de una infección por *Salmonella enterica* y/o *Salmonella bongori* comprenden unos oligonucleótidos susceptibles de ser utilizados en reacciones de amplificación de secuencias de nucleótidos, por ejemplo, reacciones en cadena de la polimerasa. La solicitud describe asimismo unas sondas para la detección de ácidos nucleicos de *S. enterica* y/o *S. bongori*, siendo estos ácidos nucleicos, si
5 procede, unos fragmentos amplificados.

La invención tiene asimismo por objeto un kit y un método de detección de la presencia de *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori* en muestras biológicas y por ejemplo, en productos alimentarios o en cualquier muestra que sea el objeto de un diagnóstico clínico. Otros métodos y kits de detección son específicos de las cepas del grupo I de *S. enterica*.
10

Estos otros métodos permiten, por el contrario, investigar la presencia de bacterias *S. enterica* o *S. bongori* del género *Salmonella*. El género *Salmonella* incluye así seis subespecies o grupos I, II, III, IV, V o VI. Las subespecies I, II, III, IV y VI pertenecen a la especie *S. enterica* y la subespecie V pertenece a la especie *S. bongori*.
15

La solicitud describe asimismo las secuencias de nucleótidos que participan en la invasión de células por *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovariedad Typhi, caracterizadas porque se trata de una de las secuencias iagA o iagB comprendidas respectivamente entre los nucleótidos 97 y 1755 de la secuencia representada en la figura 1 (iagA) y entre los nucleótidos 1776 y 2255 de la secuencia representada en la figura 1 (iagB).
20

La solicitud describe asimismo unas secuencias de nucleótidos modificadas con respecto a iagA o iagB pero que presentan sin embargo las mismas propiedades al tratarse de la invasión de las células, o que se hibridan en condiciones astringentes con una de dichas secuencias.

La presente solicitud describe asimismo unas proteínas iagA e iagB que responden a las secuencias presentadas en la figura 1 o unas variantes de estas secuencias obtenidas por mutación, delección o adición de aminoácidos por cuanto que la secuencia así obtenida es reconocida por unos anticuerpos dirigidos contra una de dichas secuencias iagA o iagB.
25

De manera general, la solicitud describe cualquier secuencia de aminoácidos codificada por los genes iagA e iagB representados en la figura 1.
30

La solicitud describe por otra parte cualquier fragmento de una de estas secuencias, en particular cualquier fragmento en forma purificada, suficiente para conservar en *S. typhi* sus propiedades de adhesión y de infección de las células, y en particular de las células HeLa en cultivo.
35

El procedimiento de infección de las células HeLa en cultivo es el procedimiento habitual que se ha descrito en particular en la solicitud de patente internacional publicada con el número WO 92/01056.

La invención se refiere a unos medios para la detección de la presencia de *S. enterica* y *S. bongori* y en su caso, para la cuantificación de *S. enterica* y *S. bongori* en muestras biológicas.
40

Por muestra biológica, se entiende cualquier muestra extraída para la realización de análisis *in vitro* en el animal o en el ser humano o extraída a partir de productos alimenticios con independencia de la naturaleza o a partir de cualquier medio líquido, sólido o gaseoso susceptible de contener los agentes patogénicos buscados.
45

La invención tiene por objeto en este contexto, un par de cebadores tal como se define en la reivindicación 1.

Las condiciones de hibridación a las que se ha hecho referencia anteriormente se definen en función de la especificidad deseada de la hibridación y se facilitan unas condiciones apropiadas a modo indicativo en los ejemplos de la presente solicitud.
50

La invención utiliza unos oligonucleótidos procedentes de la parte C-terminal de la secuencia iagA representada en la figura 1.
55

Las secuencias de tipo oligonucleótidos se pueden seleccionar para ser utilizadas como cebadores o bien para la detección tras amplificación, del ADN genómico o del ADNc de *Salmonella* de la especie *S. enterica* y/o de la especie *S. bongori* perteneciente a los otros grupos I a VI. En particular, se puede tratar de secuencias de nucleótidos obtenidas por síntesis química según los métodos conocidos por el experto en la materia.
60

Unos oligonucleótidos preferidos, que se pueden utilizar para la amplificación de ácido nucleico característico de bacterias que pertenecen a uno de los grupos I, II, IIIa, IIIb, IV, V o VI del género *Salmonella* y en particular del ADN genómico o del ADNc de *S. enterica* y/o de *S. bongori* son, por ejemplo, los siguientes (indicándose su posición en el seno de la secuencia iagA representada en la figura 1):
65

	Posición
lag1: 5'-TA TTA AGT ATG CAG GTT ATG - 3'	1424-1443
lag2: 5'-AGA GAA TTT CTG GAA AGT GAA- 3'	1585-1605
lag3: 5'-ATA TCC ACG CAG GAA ATA ACA GGA CTT -3'	1495-1521
lag4: 5'-GAG CGT GCC TTA CCG ACG ATA-3'	1564-1584
lag5: 5'-GCA GGG ATC ACT AAG CTG TG-3'	1318-1337
lag6: 5'-CGT GGG CAA CCA GCA CTA ACG-3'	1637-1657.

Además, se dan a conocer los oligonucleótidos

Slm1: 5'-CG GGT TAA AGG TTA TCA CGT-3'	709-728
Slm2: 5'-AG CAT GGC GCA AAT GGG-3'	1014-1031
Slm3: 5'-GCA CCA GGA AAG CAT TAA GTT GAT AGA ACA C-3'	732-762
Slm4: 5'-CTT CGC TGG GAC ACA AAG CA-3'	823-842 y
SS28: 5'-TAA TGC TTT CCT GGT GC-3'	

Se han definido otros oligonucleótidos susceptibles de ser utilizados como cebadores para la amplificación del ADN o del ADNc del gen *iagB* del conjunto de las cepas *Salmonella* de las especies *S. enterica* y/o *S. bongori* a partir de la secuencia *iagB* representada en la figura 1.

La presente solicitud describe por lo tanto los oligonucleótidos que responden a los encadenamientos siguientes:

lag7: 5'-T ACG GCA TGG GCT GAT TGC T-3'
lag8: 5'-T TAC GCT ATC GCC CAG CAG CAG GA-3'
lag9: 5'-T GGT CAT AAC CGA GAT GGT TCA ACC GAT C-3'
lag10: 5'-A CAG TTG TTA CAG GAT CCC T-3'

Estos oligonucleótidos se pueden utilizar asimismo como sondas, por ejemplo, para la detección de los productos de amplificación del ADN y/o del ADNc de *S. enterica* y/o de *S. bongori*.

Un par de cebadores preferido para realizar la amplificación del ácido nucleico de *S. enterica* y/o de *S. bongori*, con independencia del grupo al que pertenece la bacteria, está formado por ejemplo por los cebadores lag5 (sentido) e lag6 (antisentido).

Este par de cebadores dirige la amplificación de un fragmento de ácido nucleico de 340 pb.

Otro par de cebadores está formado por los cebadores Slm1 (sentido) y Slm2 (antisentido). Estos cebadores son susceptibles de hibridarse con el ADN o el ADNc de bacterias *S. enterica* y/o de *S. bongori* de uno de los grupos I, II, III, IV, V o VI.

Unos oligonucleótidos que se pueden utilizar como cebadores para la detección específica de *Salmonella enterica* grupo I cuando las condiciones de detección tras la amplificación del ADN o del ADNc son las descritas en el ejemplo I.

Dichos cebadores se caracterizan por su capacidad para amplificar secuencias de ácido nucleico de las cepas de *S. enterica* o de *S. bongori* representativas de los grupos I, II, III, IV, V y VI, pero para las cuales las condiciones de detección son las expuestas en el ejemplo I, permitiendo sólo la detección de las bacterias del grupo I.

Un par de oligonucleótidos que se pueden utilizar para estos fines, como cebadores específicos para la detección de secuencias de ADN o ADNc de *S. enterica* del grupo I está constituido por ejemplo por las siguientes secuencias:

SS2 5'-CCGGGCAGATGATACCC-3' y
SS28 5'-TAATGCTTTCCTGGTGC-3'.

Los oligonucleótidos definidos por los inventores permiten abordar el diagnóstico de *S. enterica* y de *S. bongori* en condiciones satisfactorias de sensibilidad, de rapidez, de facilidad y de especificidad.

Asimismo, la invención tiene por objeto un kit para la detección de *S. enterica* y de *S. bongori* mediante la amplificación del ADN genómico o complementario de *S. enterica* y/o de *S. bongori*, caracterizado porque comprende:

- unos oligonucleótidos tales como los definidos anteriormente, capaces de hibridar en condiciones rigurosas con el ADN genómico o el ADNc de *S. enterica* y de *S. bongori*,
- una sonda para la detección de los fragmentos amplificados que responden a una de las definiciones facilitadas en las páginas anteriores,

- los reactivos necesarios para la realización de la reacción de amplificación.

5 La presente solicitud describe la utilización de los oligonucleótidos citados anteriormente, para la amplificación de una secuencia de ADN o de ADNc de *Salmonella enterica* y/o de *Salmonella bongori*, comprendida en una de las secuencias iagA o iagB tales como las descritas en las páginas anteriores o complementarias de una secuencia de este tipo, o también la utilización de estos oligonucleótidos como sonda para la detección de una secuencia de nucleótidos amplificada.

10 La invención tiene por tanto por objeto en particular la utilización de un par de cebadores oligonucleotídicos tal como se define en la reivindicación 1 para la amplificación de una secuencia de ADN o de ADNc de *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori* o también la utilización de este par de cebadores oligonucleotídicos como sonda para la detección de una secuencia de nucleótidos amplificada.

15 Por ejemplo, los oligonucleótidos iag5 e iag6 se pueden utilizar respectivamente como cebadores sentido y antisentido para la detección de *S. enterica* y de *S. bongori* del grupo I, II, III, IV, V o VI.

Fuera del alcance de las reivindicaciones, el par de cebadores S1m1 y S1m2 se puede utilizar para la detección de bacterias de la especie *S. enterica* y/o de *S. bongori* de uno de estos grupos en una muestra biológica.

20 Se da a conocer la utilización de los oligonucleótidos SS2 y SS28 para la detección específica *in vitro* en una muestra biológica de *S. enterica* del grupo I.

25 La detección es específica cuando los cebadores utilizados para la amplificación de las secuencias de nucleótidos buscadas permiten la amplificación de bacterias *S. enterica* y de *S. bongori* que pertenecen a uno de los otros grupos II, III, IV, V o VI, pero las condiciones utilizadas no permiten la detección de las bacterias de estos mismos grupos o de organismos diferentes susceptibles de estar presentes en la muestra biológica probada.

30 La solicitud describe así un conjunto de oligonucleótidos que se pueden utilizar para la detección de bacterias *S. enterica* y/o de *S. bongori*, tras la amplificación del ADN genómico o complementario de *S. enterica* y/o de *S. bongori*, caracterizado porque comprende:

- un par de oligonucleótidos que responden a las definiciones descritas anteriormente, capaces de hibridar en unas condiciones astringentes con el ADN genómico o el ADNc de *S. enterica* y/o de *S. bongori*,
- una sonda que responde a las características indicadas anteriormente.

40 Un primer conjunto de oligonucleótidos que se pueden utilizar para la detección *in vitro* en una muestra biológica, de cepas de *Salmonella enterica* y de *S. bongori* que pertenecen a uno de los grupos I, II, III, IV, V o VI, se caracteriza porque contiene los siguientes oligonucleótidos:

- la secuencia iag5 (5'-GCA GGG ATC ACT AAG CTG TG-3' y la secuencia iag6 (5'-CGT GGG CAA CCA GCA CTA ACG-3') que se pueden utilizar como cebadores para la amplificación, y
- la secuencia iag3 (5'-ATA TCC ACG CAG GAA ATA ACA GGA CTT-3') que se puede utilizar como sonda de revelado y la secuencia iag4 (5'-GAG CGT GCC TTA CCG ACG ATA-3') que se puede utilizar como sonda de captura.

50 Otro conjunto de oligonucleótidos que se pueden utilizar para la detección específica *in vitro* en una muestra biológica de *S. enterica* del grupo I, se caracteriza porque comprende los siguientes oligonucleótidos:

SS2 (5'-CCGGGCAGATGATACCC-3' y
SS28 (5'-TAATGCTTTCCTGGTGC-3').

55 Por otra parte, la presente solicitud describe una proteína iagA codificada por la secuencia de nucleótidos iagA representada en la figura 1, así como una proteína iagB codificada por la secuencia de nucleótidos iagB representada en la figura 1.

60 Las proteínas iagA e iagB tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos representadas en la figura 1.

La solicitud describe asimismo un procedimiento para la detección *in vitro* en una muestra biológica de secuencias de nucleótidos *Salmonella enterica* y/o de *S. bongori*, previamente amplificadas, por ejemplo, mediante PCR, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:

- desnaturalizar la secuencia de *S. enterica* y/o de *S. bongori* amplificada,

- 5 - poner en contacto las secuencias de nucleótidos amplificadas desnaturalizadas de *S. enterica* y/o de *S. bongori*, con una sonda de captura y una sonda de revelado obtenidas a partir de los oligonucleótidos definidos anteriormente en condiciones que permiten la hibridación de dichas sondas de captura y de revelado con dicha secuencia de nucleótidos amplificada de *S. enterica* y/o de *S. bongori*, estando la sonda de captura fijada en la superficie de un pocillo de una placa de microtitulación y estando la sonda de revelado marcada y libre en un tampón de hibridación apropiado;
- incubar la mezcla de reacción, durante un tiempo suficiente para permitir la reacción de hibridación;
- 10 - lavar para eliminar los oligonucleótidos que no han reaccionado;
- revelar las sondas de revelado que han hibridado a las secuencias de nucleótidos amplificadas.

15 El procedimiento de detección descrito anteriormente puede caracterizarse de manera ventajosa porque la detección se realiza según las siguientes etapas:

- desnaturalizar un volumen de 10 µl de la secuencia amplificada mediante la adición volumen a volumen de una disolución de NaOH 200 mM, EDTA 40 mM,
- 20 - hibridar previamente las microplacas, de las que la superficie de los pocillos está revestida por la sonda de captura, en un tampón de hibridación apropiado,
- liberar la microplaca y rellenar cada uno de los pocillos con 200 µl de tampón de hibridación que encierra el fragmento amplificado desnaturalizado y la sonda de revelado marcada con la peroxidasa a la concentración de
25 10 ng/µl,
- incubar la mezcla durante una hora a 37°C con agitación,
- lavar la mezcla que ha reaccionado con una disolución de lavado 10X (Tris 100mM, NaCl 3M, Tween 20 al 1%,
30 pH 7,4),
- detectar la actividad de la peroxidasa unida a la sonda mediante colorimetría en presencia de un sustrato coloreado.

35 El revelado de la actividad de la peroxidasa presente en la sonda de revelado se puede obtener poniendo en práctica las siguientes etapas:

- depositar 200 µl de una disolución de citrato trisódico 40 mM, 0,03% de H₂O al 30%, 7,5 mg/ml de ortofenilendiamina (OPD) en cada uno de los pocillos que contienen la mezcla de reacción,
- 40 - incubar la microplaca durante 30 min. en la oscuridad y a 37°C,
- bloquear la reacción mediante la adición de 50 µl/pocillo de una disolución de H₂SO₄ 4N,
- 45 - determinar la densidad óptica a una longitud de onda de 492 nm (referencia a 620 nm).

De manera interesante, la sonda de captura utilizada es el oligonucleótido lag4 y la sonda de revelado es el oligonucleótido lag3.

50 De esta forma, los medios permiten la detección cualitativa o cuantitativa de la presencia de bacterias de tipo *S. enterica* y/o de *S. bongori*, ya sea una detección no específica en el seno de uno de los grupos I, II, III, IV, V o VI de *S. enterica* y de *S. bongori*.

55 En condiciones específicas de realización de la etapa de detección, tal como se exponen en el ejemplo I, los cebadores SS2, SS28 y la sonda SS40 permiten por el contrario la detección específica de bacterias del grupo I de *S. enterica*.

Otras características y ventajas de la invención se pondrán más claramente de manifiesto a partir de los ejemplos siguientes y en las figuras:

60 Figura 1: Secuencia de nucleótido de un fragmento de ADN de 2,4 kb de la región de invasión de *Salmonella ser. typhi*.

Están subrayados los sitios potenciales de unión al ribosoma.

65 Figura 2: Porcentaje de la actividad obtenida con diferentes cepas de *Salmonella* que pertenecen a diferentes

serovariedades mediante hibridación intercalada ("sándwich").

Serovariedades de los diferentes aislados de *Salmonella* ensayados:

- 5 a: *S. enterica* subespecie *enterica* (I), ref.: C53
 b: *S. enterica* subespecie *salamae* (II), ref.: 975-71
 c: *S. enterica* subespecie *salamae* (II), ref.: 3975-83
 d: *S. enterica* subespecie *arizonae* (IIIa), ref.: 1600 K
 10 e: *S. enterica* subespecie *arizonae* (IIIa), ref.: So 20-20
 f: *S. enterica* subespecie *diarizonae* (II), ref.: 5250-85
 g: *S. enterica* subespecie *diarizonae* (IIIb), ref.: 8013-93
 h: *S. enterica* subespecie *houtenae* (IV), ref.: 1357-73
 i: *S. bongori*, ref.: 2790-79
 15 k: *S. enterica* subespecie *indica* (VI), ref.: 4355-84 - 7, 6, 5, 4, y 3: log (cantidad de las moléculas de ADN).

Figura 3: Alineación de las secuencias de los fragmentos amplificados (nucleótidos 1345 a 1644) de los 6 grupos de salmonelas.

Figura 4: Amplificación gracias a los cebadores lag5 e lag6 en dos representantes de cada uno de los grupos de salmonelas.

Figura 5: Autorradiografía de la transferencia Southern de los productos amplificados de las salmonelas.

Figura 6: Determinación del número mínimo de moléculas de ADN cromosómico que se puede detectar. Autorradiografía de la transferencia Southern e hibridación sobre microplaca.

Figura 7: Localización de los oligonucleótidos seleccionados en el seno del gen lagA.

Ejemplo I

Clonación y secuenciación del fragmento de ADN de 2,4 kb

Este fragmento de ADN se ha subclonado utilizando un fragmento de restricción obtenido mediante corte con las enzimas HindIII, a partir de la secuencia HindIII de 7,9 kb descrita en la publicación de Popoff y Dion, 1990, en derivados del vector m13 (Messing y Vieira, 1982).

Después de la realización de esta clonación, se pone en práctica el método de la terminación de cadena didesoxi utilizando la ADN polimerasa de T7 modificada (Sequenase, USB Corp.) y oligonucleótidos sintéticos universales como cebadores. Todos los extremos de los fragmentos de restricción utilizados se superponían entre sí. La secuenciación del ADN se ha realizado por lo menos 2 veces en cada una de las hebras. La secuencia de nucleótidos se ha analizado utilizando el programa de Lipan y Pearson, 1985.

Como muestra la secuencia presentada en la figura 1, están contenidos dos marcos de lectura abiertos en el fragmento secuenciado; se designan mediante los términos iagA (abreviatura de "invasion associate gene") e iagB. Los dos marcos de lectura abiertos se transcriben en la misma orientación. Se supone que el primer codón ATG (pb 97) de la fase abierta de lectura de iagA, que está precedido por la secuencia 5'-AGAGA-3', se corresponde con el sitio de iniciación de la traducción del gen iagA. El gen iagA codifica para un polipéptido que incluye 553 residuos de aminoácidos con un peso molecular calculado de 63.026 Da. Se ha detectado una homología significativa entre el dominio N-terminal de la proteína lagA y el dominio correspondiente a la proteína de regulación de la transcripción PhoB (24% de identidad y 52% de similitud para una superposición de 108 aminoácidos) y la proteína PhoP (25% de identidad y 69% de similitud para 100 aminoácidos alineados) de *E. coli*. El codón de iniciación ATG del gen iagB (pb 1776) está precedido asimismo por un sitio potencial de unión al ribosoma (5'-AGGAAG-3'). El gen iagB codifica para un polipéptido que incluye 160 aminoácidos y que tiene un peso molecular calculado de 18.369 Da. La comparación de la secuencia de la proteína lagB con las secuencias traducidas contenidas en el banco de datos Genbank ha demostrado una homología significativa con la proteína IpgF (43% de identidad y 66% de similitud para 151 aminoácidos alineados).

La proteína IpgF está codificada por el gen ipgF que está situado sobre el plásmido asociado a la virulencia de *Shigella flexneri*, en el extremo 5' del locus mxi-spa (Allaoui *et al*, 1993).

Las proteínas puestas en evidencia de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovariedad *Typhi* tendrían, por tanto, un papel en la infección por estas bacterias, y en particular en la adhesión y la penetración en las células.

Ejemplo 2

Detección específica de *S. Enterica* del grupo I

5 Se ha desarrollado un protocolo de detección de las subespecies de *Salmonella* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se ha definido un par de oligonucleótidos utilizados como cebador para amplificar un fragmento de 93 pb de un gen requerido para la invasión de las células HeLa por *S. typhi*, cepa Ty2. Se ha analizado el producto de amplificación mediante una hibridación no radiactiva intercalada sobre placas de microtitulación utilizando dos oligonucleótidos diferentes según el procedimiento descrito por Chevrier *et al*, 1993, Mol. Cell. Probes 7, 187-197. El oligonucleótido de captura se ha fosforilado en su extremo 5' y se ha unido de manera covalente a pocillos que llevan grupos aminados de una placa de microtitulación. El oligonucleótido de detección se ha aminado en su extremo 5' y después se ha marcado con un éster de biotinil-N-hidroxisuccinimida. Tras la hibridación, las moléculas híbridas han sido detectadas mediante avidina conjugada con fosfatasa alcalina y con un sustrato cromógeno. Este método requiere solamente la utilización de un ciclador térmico y de un lector de microtitulación convencional y puede ponerse en práctica a gran escala.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas

20 En este estudio se han utilizado doscientos veintiocho aislados clínicos (tabla 1) incluyendo *S. bongori* (Sambrook *et al*, 1989, Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), *S. enterica* subespecie I (116), II (56), IIIa (11), IIIb (30), IV(5) y VI(5) y 16 cepas de enterobacterias no salmonelas (tabla 2) que representan 9 géneros diferentes. La cepa C53 de *S. ser. typhimurium* se ha utilizado como control positivo y la cepa HB101 de *E. coli* se ha utilizado como control negativo en las pruebas de PCR.

Extracción del ADN

30 Se han cultivado las cepas en un medio LB a 37°C. Con el fin de proceder a la extracción rápida del ADN, se han centrifugado 2 ml del cultivo mantenido durante toda la noche y se han resuspendido en 1 ml de TE (tampón Tris-HCl 10 mM a pH 8 que contiene EDTA 1 mM). Se han centrifugado las células, se ha resuspendido el residuo de centrifugación en 500 µl de agua destilada estéril y se ha calentado a 100°C durante 10 minutos. Por último, se ha centrifugado la disolución y se ha conservado el sobrenadante para experimentos con PCR.

35 Cebadores oligonucleotídicos y sondas

Los oligonucleótidos se han sintetizado en un sintetizador de ADN de tipo ciclón (Millipore-Waters) utilizando la tecnología de fosforamidita.

40 Las secuencias de los cebadores de oligonucleótidos fueron las siguientes:

SS2: 5'-CCGGGCAGATGATACCC-3' y
SS28: 5'-TAATGCTTTCCTGGTGC-3'.

45 La sonda oligonucleotídica de captura SS40: 5'-CCCGAAGTATCTCGATCTGTACAATATTATCATT-3' se ha fosforilado en su extremo 5' con la polinucleótido cinasa de T4 (Boehringer) según la descripción hecha por Sambrook *et al*, 1989, (Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). La sonda de detección octadecanucleotídica SS41 (5'-GCAGGTGATAACCTTTAA-3') se ha sintetizado con una función amino en su extremo 5' utilizando el método de la fosforamidita en fase sólida en un sintetizador de ADN Applied Biosystem 380B y después se ha marcado con el éster de N-hidroxisuccinimida-ácido D-biotinil- Σ -aminocaproico (Boehringer) según la descripción hecha por Tham *et al*, 1990, (FEMS Microbiol. Lett. 69, 109-116). Se han purificado tanto los oligonucleótidos de captura como de detección sobre una columna de desalación rápida HR 10/10 con el sistema FPLC (Farmacia).

55 Experimentos de PCR

60 Las reacciones de amplificación se han realizado en un volumen total de 100 µl en un tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,5, que contiene MgCl₂ 4 mM, 100 µg/ml de albúmina sérica bovina, 1 µM de cada cebador, 200 µM de cada dNTP y 1 U de Taq ADN polimerasa (Amersham). La mezcla de amplificación se ha recubierto con 100 µl de aceite mineral y se ha sometido a 10 ciclos de amplificación según la siguiente descripción: las muestras se han incubado a 94°C durante 10 segundos para desnaturalizar el ADN, a 60°C durante 10 segundos para aparear los cebadores al ADN y a 72°C durante 30 segundos para realizar la reacción de extensión de los cebadores apareados, a lo que le siguen 30 ciclos según el protocolo siguiente: desnaturalización a 87°C durante 10 segundos, apareamiento a 60°C durante 10 segundos y extensión a 72°C durante 30 segundos. Los ciclos térmicos se han realizado en un conjunto calentador programable (Thermal reactor Hybaid, RU).

Los experimentos de PCR se han realizado con 5 µl de disolución de ADN. Cada experimento incluía controles negativos (5 µl de tampón TE) para cada grupo de 10 muestras y al final de cada serie.

Pruebas de hibridación intercalada sobre bandas CovaLink NH®

Chevrier *et al* (1993, Mol. Cell. Probes 7, 187-197) ya han descrito dos protocolos de hibridación no radiactiva sobre bandas CovaLink NH®. En el presente caso, se ha utilizado una técnica de hibridación intercalada en la medida en que permitía una mejor sensibilidad de la detección. La reacción se ha realizado sobre micropocillos recubiertos por el oligonucleótido SS40 utilizando un procedimiento de enlace covalente tal como describen detalladamente Chevrier *et al* o Rasmussen, S.R. *et al* (1991, Anal. Biochem. 198, 138-142).

El fragmento de ADN sometido a la reacción de PCR se ha desnaturalizado directamente en los pocillos añadiendo de manera secuencial 95 µl de agua destilada, 5 µl de muestra de PCR, 40 µl de sonda de detección y 14 µl de NaOH 1 N por pocillo. Después de 10 minutos, se ha efectuado la neutralización añadiendo 21 µl de NaH₂PO₄ 1 M que contenían el 1% de sarcosilo. Todas las muestras se han realizado por duplicado. Después de la neutralización, la banda se ha depositado sobre una superficie metálica y se ha mantenido en una estufa durante la noche a 40°C. La concentración final de la sonda de detección biotinilada SS41 era de 0,5 nM. Durante la incubación en la estufa, se prefiere no dejar los pocillos no utilizados vacíos, sino rellenarlos con agua de manera que se obtengan intercambios térmicos homogéneos. Los micropocillos se han lavado 5 veces a temperatura ambiente con TBS-Tw (NaCl 0,15 M, tampón Tris HCl 10 mM a pH 8, 1% de Tween 20). Se han añadido por pocillo 100 µl de conjugado fosfatasa alcalina-extravidina (Sigma) diluidos a 1 µg/ml en TBS-Tw que contiene 1% de albúmina sérica bovina. Después, se ha incubado la banda a temperatura ambiente durante 1 hora, se ha lavado 5 veces con TBS-Tw y por último se han añadido 200 µl de dietanolamina 1M a pH 9,8 que contiene 1 mM de MgCl₂ y 1 mM de paranitrofenilfosfato. La reacción de la enzima se ha llevado a cabo durante 30 minutos a 2 horas. Se ha medido la absorbancia a 405 nm utilizando un lector de microplaca (Dynatech). Se ha considerado que la señal obtenida con la disolución habitual del fragmento de ADN amplificado (800 fm/pocillo) de *S. ser. typhimurium* cepa C53 representa el 100% y se ha utilizado como referencia para cada prueba de hibridación. Los valores de los blancos corresponden a la absorbancia media medida en pocillos recubiertos por el oligonucleótido SS40 incubado solamente con 0,5 nM de sonda oligonucleotídica SS41 biotinilada.

Resultados

Optimización del método

Los cebadores y las sondas se han elegido en la secuencia *iagA*. Se han ensayado diferentes pares de cebadores para optimizar la técnica de hibridación intercalada sobre microplacas CovaLink. El par de cebadores elegido (SS2 y SS28) permite la amplificación específica de la región de 93 pb del ADN genómico de *Salmonella*. Utilizando este par de cebadores, se ha puesto en evidencia que una concentración estándar de MgCl₂ (1,5-2 mM) conduce a un resultado de amplificación relativamente no interesante y que una concentración de 4 mM en MgCl₂ era necesaria para obtener una amplificación eficaz. Se han utilizado oligonucleótidos internos, SS40 y SS41, en una prueba de hibridación no radiactiva a modo de sonda de captura y de sonda de detección respectivamente.

Especificidad de la técnica

La especificidad del método para la detección de las salmonelas se ha evaluado con 228 cepas de *Salmonella* (tabla 1) y 16 cepas de bacterias heterólogas (tabla 2). Los resultados se resumen en la tabla 3. *Edwardsiella tarda*, *Klebsiella pneumoniae*, especies de *Enterobacter* y *Acinetobacter*, *Pasteurella*, *Vibrio harveyi*, *Serratia marcescens* y de manera más importante especies de *Citrobacter* y todas las *E. coli* han dado una señal de hibridación inferior al 20%. Basándose en este valor, se ha concluido que todas las cepas de *Salmonella* que pertenecen a la subespecie I se podían detectar mediante el presente método. Además, solamente una cepa (cepa 3975-83) de las 56 cepas de la subespecie II y 3 cepas de las 11 cepas de la subespecie IIIa, dieron una señal positiva. *Salmonella bongori* y las cepas que pertenecen a las subespecies IIIb, IV y VI no eran detectables.

Nivel de detección de la técnica con las bacterias enteras

Se han realizado diluciones 1/10^a de una suspensión de la cepa C53 de *S. ser. typhimurium* (de 10⁹ a 10⁻² células/ml) para estimar el número mínimo de bacterias que podía detectarse mediante PCR seguida de la técnica de hibridación no radiactiva. El ADN se ha extraído de cada suspensión calibrada, utilizando la técnica de extracción rápida por ebullición. Los resultados obtenidos muestran claramente que la técnica de extracción rápida del ADN mediante la sencilla ebullición de la suspensión antes de la reacción de PCR, es una técnica eficaz. En efecto, permite la detección de solamente una unidad úfc.

Tabla 1

Subespecies de *Salmonella* utilizadas para evaluar la especificidad de los ensayos de hibridación del ADN

Microorganismo probado	Nº de aislados	Nº de serovar
<i>Salmonella enterica subsp enterica I</i>	116	43
serovar Adelaïde		1
Agona		2
Altona		1
Angoda		1
Bardo		2
Blockley		1
Bovismorbificans		3
Braenderup		4
Brandenburg		1
Bredeney		1
Broughton		2
Cerro		1
Chester		1
Coeln		1
Concord		1
Dakar		1
Derby		2
Enteridis		28
Georgia		1
Hadar		1
Heidelberg		4
Ibadan		2
Indiana		1
Infantis		5
Lexington		1
London		1
Mbandaka		1
Montevideo		6
Moscow		1
Ohio		1
Orion		1
Panama		3
Paratyphi B		2
Saintpaul		1
Typhimurium		13
Typhisuis		1
Vaertan		1
Veneziana		1
Vinhogrady		1
Virchow		10
Wien		1
Woodinville		1
Yolo		1
<i>Salmonella enterica subsp salamae II</i>	56	56
<i>Salmonella enterica subsp arizonae IIIa</i>	11	29
<i>Salmonella enterica subsp diarizonae IIIb</i>	30	5
<i>Salmonella enterica subsp houtenae IV</i>	5	5
<i>Salmonella enterica subsp indica VI</i>	5	5
<i>Salmonella bongori</i>	5	5
(inicialmente <i>S. enterica subsp. bongori V</i>)		

Tabla 2

Bacterias heterólogas utilizadas en la prueba de hibridación del ADN

Género	Especies	Número de aislados
<i>Escherichia</i>	<i>Coli</i>	4
<i>Edwardsiella</i>	<i>tarda</i>	1
<i>Citrobacter</i>	<i>amalonaticus</i>	1
	<i>freundii</i>	1
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	1
<i>Enterobacter</i>	<i>agglomerans</i>	1
	<i>asburiae</i>	1
	<i>hormoechei</i>	1
<i>Pasteurella</i>	<i>multocida</i>	1
<i>Acinetobacter</i>	<i>iwoffii</i>	1
	<i>haemolyticus</i>	1
<i>Vibrio</i>	<i>harveyi</i>	1
<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i>	1

Tabla 3
Cepas clínicas de bacterias y controles probados en un ensayo de hibridación intercalada ("sándwich")

	<i>S. enterica</i> <i>subesp.</i> <i>Enterica</i>	<i>S. enterica</i> <i>subesp.</i> <i>Salamae</i>	<i>S. enterica</i> <i>subesp.</i> <i>Arizonae</i>	<i>S. enterica</i> <i>subesp.</i> <i>Diarizonae</i>	<i>S. enterica</i> <i>subesp.</i> <i>houtenae</i>	<i>S. enterica</i> <i>subesp.</i> <i>Indica</i>	<i>S. bongori</i>	No <i>Salmonella</i>	Control sin ADN
Actividad (%)	116	1	3	0	0	0	0	0	0
100%-20%	0	51	8	12	4	4	5	8	0
> blanco	0	4	0	18	1	1	0	7	23
< blanco	116	56	11	30	5	5	5	15	23

Hibridación cuantitativa con el ADN genómico purificado

El procedimiento de hibridación no radiactiva utilizado en las pruebas indicadas en la presente memoria se puede utilizar fácilmente en los estudios cuantitativos. Para comparar las señales de hibridación obtenidas con diferentes cepas de *Salmonella*, el ADN se extrae de 10 cepas que representan las 6 subespecies de *Salmonella enterica* y la especie *Salmonella bongori*, y después cantidades calibradas de ADN se han sometido a reacciones de PCR seguidas de una hibridación intercalada. Los resultados se describen en la figura 2. Se ha demostrado que la señal de hibridación obtenida con 10^7 moléculas de ADN de *Salmonella bongori* o de las subespecies II, IIIa, IIIb, IV y VI de *Salmonella enterica* es más débil que la señal de hibridación observada con 10^3 moléculas de ADN de las cepas de la subespecie I. Sin embargo, es importante destacar que el aislado 3975-83 (subespecie II) ha dado la misma señal de hibridación que las cepas que pertenecen a las subespecies I.

Discusión

La amplificación mediante PCR permite una detección muy sensible de secuencias de ADN específicas. La sensibilidad de la amplificación depende esencialmente del número de copias del ADN diana, de la pureza de la muestra que se debe analizar, del método de extracción del ADN, y de la sensibilidad del método utilizado para detectar los productos de PCR. La visualización de los productos de PCR mediante una coloración con bromuro de etidio en un gel de electroforesis no es compatible con la utilización de forma rutinaria de la técnica y no es lo suficientemente sensible. La sensibilidad se puede mejorar mediante la utilización de la PCR doble o de sondas de ADN con una hibridación en transferencia Dot o Southern. Sin embargo, la PCR doble es muy sensible a la contaminación por ADN y las técnicas de hibridación con transferencia Dot o Southern no son apropiadas para la automatización. Por tanto, la hibridación sobre microplaca ofrece una técnica apropiada para la detección y la cuantificación de fragmentos amplificados mediante PCR. El enlace covalente simple de los ácidos nucleicos a micropocillos representa una variante interesante para la adsorción pasiva y una mejora importante para la detección de fragmentos amplificados por PCR sobre micropocillos.

Es conocido que las cepas de *Salmonella* que provocan infecciones en el ser humano pertenecen esencialmente a la subespecie I. En efecto, más del 95% de los aislados clínicos en el ser humano pertenecen a esta subespecie (Rowe, B., 1987, *Salmonella* surveillance. Reports received from centers participating in the WHO programme. World Health Organization London). Además, en 1991, el "Centre national d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires" de París (Francia) informaba [Corbion, B. *et al*, 1991, Inventory of *Salmonella*] que en los años anteriores, la mayoría de las cepas aisladas en animales en la alimentación o en el medio ambiente en 1988 y 1989 (es decir, 18832 cepas) pertenecen a la subespecie I (99,2%).

Los resultados indicados en la presente memoria han permitido definir un método basado en la amplificación mediante PCR para la detección de cepas patogénicas de *Salmonella*. Un par de cebadores, SS2 y SS28, y un par de sondas, SS40 y SS41, se han seleccionado a partir de un gen necesario para la invasión de las células HeLa por *Salmonella ser. typhi* cepa Ty2. Utilizando la combinación entre la técnica de PCR y la hibridación intercalada no radiactiva sobre microplaca, se han detectado todas las *Salmonella* de la subespecie I.

El límite de detección era inferior a un umbral representado por 10 células por tubo de PCR, lo cual está de acuerdo con los resultados obtenidos por otras técnicas de PCR similares. Dado el parentesco de los ácidos nucleicos entre los miembros de las enterobacterias, era importante controlar la especificidad de estos nuevos cebadores y sondas con los géneros de enterobacterias más susceptibles de conducir a reacciones de tipo "falso positivo". A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que no puede tener lugar ninguna reacción de falso positivo cuando se siguen las condiciones de PCR y de hibridación descritas anteriormente.

Es interesante observar que la cepa *Salmonella* 3975-83 (subespecie II) presentaba una señal de hibridación idéntica a la obtenida con los aislados que pertenecen a la subespecie I. Esta cepa se aisló en 1983 a partir de las heces de un paciente humano en Gran Bretaña. Basándose en las características bioquímicas, esta nueva serovariedad se ha clasificado en la subespecie II pero se ha considerado como una cepa atípica ya que no se ha detectado su presencia en la gelatinasa (Le Minor, L. *et al*, 1984, Supplement No. XXVII, 1983, to Kauffmann-White Scheme, Ann. Microbiol. (Institut Pasteur) 135 B, 45-51). A la luz de los resultados indicados en la presente memoria, la posición taxonómica de la cepa 3975-83 debería estudiarse de nuevo utilizando la técnica de hibridación ADN-ADN.

Los datos presentados en la presente memoria indican que el método de hibridación basado en la utilización de un gen necesario para la invasión de las células HeLa por *Salmonella ser. typhi* cepa Ty2 puede distinguir las cepas de la subespecie I de las *Salmonella* de las otras bacterias entéricas, incluida *E. coli*. La hibridación no radiactiva sobre una microplaca Covalink NH es sensible y apropiada para el análisis de un gran número de muestras.

Ejemplo 3

Detección del ADN de salmonella amplificado mediante hibridación intercalada

5 Secuencia de los oligonucleótidos

Los fragmentos de ADN elegidos son los siguientes (véase la posición en la secuencia de la figura 1):

	Parte C-terminal	posición
10	lag1: 5'-TA TTA AGT ATG CAG GTT ATG - 3'	1424-1443
	lag2: 5'-AGA GAA TTT CTG GAA AGT GAA- 3'	1585-1605
	lag3: 5'-ATATCCACGCAGGAAATAACAGGACTT -3'	1495-1521
	lag4: 5'-GAG CGT GCC TTA CCG ACG ATA-3'	1564-1584
15	lag5: 5'-GCA GGG ATC ACT AAG CTG TG-3'	1318-1337
	lag6: 5'-CGT GGG CAA CCA GCA CTA ACG-3'	1637-1657
	Slm1: 5'-CG GGT TAA AGG TTA TCA CCT-3'	709-728
	Slm2: 5'-AG CAT GGC GCA AAT GGG-3'	1014-1031
	Slm3: 5'-GCA CCA GGA AAG CAT TAA GTT GAT AGAACA C-3'	732-762
20	Slm4: 5'-CTT CGC TGG GAC ACA AAG CA-3'	823-842

Preferentemente, el par de cebadores lag5 (sentido) e lag6 (antisentido) dirige la amplificación de un fragmento de 340 pb, el par Slm1 (sentido) y Slm2 (antisentido) dirige la amplificación de un fragmento de 323 pb (figura 3).

25 La figura 4 muestra la eficacia de la amplificación del par de cebadores lag5 e lag6 sobre 2 representantes de cada uno de los grupos de salmonelas.

Procedimiento de detección

30 Se ha utilizado un formato de detección mediante hibridación intercalada.

Se hibridan dos oligonucleótidos simultáneamente al fragmento amplificado desnaturalizado. Uno de ellos denominado sonda de captura se fija de manera pasiva (pero también puede fijarse de manera covalente) a la superficie de un pocillo de placa de microtitulación de 96 pocillos. El otro, denominado sonda de revelado, está marcado por un elemento fácil de poner en evidencia. La sonda de revelado está libre en el tampón de hibridación.

Las sondas de captura y de revelado son complementarias de 2 regiones diferentes situadas en el interior del fragmento amplificado.

40 La sonda de detección en este caso se une a un marcador enzimático, en particular una peroxidasa y va a servir de sonda de revelado. Es el caso preferentemente de los oligonucleótidos lag3 y Slm3. Pueden fijarse otros oligonucleótidos a un soporte sólido de tipo microplaca, un soporte particulado o membranario y servir como sonda de captura, particularmente para los oligonucleótidos lag4 y Slm4.

45 Condiciones experimentales

1) Preparación del ADN de las salmonelas

50 Mediante el método de ebullición en presencia de Chelex (Chelex 6%, SDS 0,1%, NP40 1%, Tween 20 1%), se obtienen las secuencias de ADN. Este reactivo está comercializado por Biorad y se utiliza según el protocolo del fabricante (ref. Walsh *et al.* 1991. *BioTechniques* 10: 506-513).

2) Amplificación

55 Según el método inicialmente descrito por Saiki y tal como se expone por ejemplo en la patente europea EP 0 201 184.

La PCR se realiza utilizando la siguiente mezcla de reacción:

60 KCl 50 mM
Tris-HCl 10mM pH 8,3
MgCl₂ 1,5 mM
desoxirribonucleótidos (dCTP, dATP, dGTP) 125 μM
250 μM de UTP
65 25 pmoles de cada uno de los cebadores
10 ng de ADN

1 unidad de Uracilo N Glucosilasa
1 unidad de Taq polimerasa.

5 La mezcla de reacción se ha realizado utilizando 10 µl de la disolución que contiene el ADN que se va a simplificar con un volumen de 100 µl. El dUTP y la UNG se han utilizado en sistema de descontaminación (Brevet Life Technologies European Patent Application 0 401 037). El termociclador utilizado es el 9600 de Perkin Elmer.

10 Después de una incubación a 50°C durante 2 minutos para permitir la acción de la UNG y una desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, los ciclos de temperaturas utilizados son los siguientes:

- 5 ciclos (95°C durante 15 segundos, 50°C durante 15 segundos, 72°C durante 15 segundos)
- 35 ciclos (95°C durante 15 segundos, 57°C durante 15 segundos, 72°C durante 15 segundos)

15 3) Visualización de la reacción de amplificación

3-1) Marcado de la sonda de revelado

20 Las sondas se marcan con peroxidasa de rábano picante (ref. PCR protocols: a guide to methods and application; Academic press (1990), 15, p4513-4534) y se revela la actividad de la enzima mediante colorimetría.

3-2) Gel de agarosa coloreado con BET e hibridación sobre membrana

25 Después de la amplificación, se depositan 10 µl del producto de amplificación sobre gel de agarosa y se transfiere el ADN sobre membrana según las técnicas clásicas (Maniatis). La membrana se hibrida previamente durante 30 minutos a 68°C en tampón de hibridación (10X Denhart, 6X SSC, 0,1% de SDS) y después se hibrida a 42°C durante 3 horas con 60 ng de sonda por ml de tampón de hibridación.

Después se realiza un lavado según las siguientes etapas:

- 30
- 2 veces durante 10 minutos en 2 X SSC -0,1% de SDS a temperatura ambiente,
 - 1 vez durante 30 minutos en 0,1 X SSC - 0,1% de SDS a 42°C,
 - 2 veces durante 10 minutos en 2 X SSC a temperatura ambiente.

35 Revelado: la membrana se escurre entre dos hojas de papel absorbente (papel Whatman 3MM) y se pone en un recipiente limpio y seco.

40 El reactivo de detección Amersham (reactivo de detección ECL RPN 2105) se prepara extemporáneamente volumen a volumen; 30 ml de volumen total para una membrana de 5 x 8 cm. Se obtiene un casete para autorradiografía fijando una hoja de papel absorbente (papel Whatman 3MM) en el fondo. Todas estas etapas pueden realizarse con luz. Después en cuarto oscuro.

45 Se baña la membrana en el reactivo de detección durante 1 minuto, el lado del ADN hacia arriba, se escurre rápidamente la membrana, se coloca en el casete, el lado del ADN hacia arriba, se pone encima una hoja de plástico transparente (si no la membrana se pega sobre la película) y se coloca una película radiográfica por encima (película X-OMAT KODAK).

La exposición se realiza durante 30 minutos a temperatura ambiente y después se revela la película mediante las técnicas de revelado clásico (revelador, agua, fijador).

50 3-3) Microplaca

3-3-1) Recubrimiento del oligonucleótido de captura

55 Se puede realizar mediante adsorción (Cook *et al*, NAR, 16: 4077-4095 (1988) o acoplamiento covalente (Rasmussen, S.R. *et al*, 1991. Analytical Biochemistry 198, 138-142).

3-3-2) Hibridación en microplaca y lectura

60 Se han desnaturalizado 10 µl del producto de amplificación mediante la adición volumen a volumen de una disolución de NaOH 200 mM, EDTA 40 mM.

Se han hibridado anteriormente las microplacas de las que la superficie de los pocillos está revestida con la sonda de captura, en un tampón de hibridación que contiene 10X Denhart, 6X SSC, SDS al 0,1%.

65 Después se ha vaciado la microplaca y cada uno de los pocillos ha recibido 200 µl de tampón de hibridación que contiene el fragmento amplificado desnaturalizado y la sonda de revelado a la concentración de 10 ng/µl. La

incubación ha tenido lugar durante una hora a 37°C y con agitación.

Después del lavado (disolución de lavado 10X: Tris 100 mM, NaCl 3M, 1% de Tween 20, pH 7,4), se ha detectado la actividad de la peroxidasa unida a la sonda mediante colorimetría en presencia de un sustrato coloreado.

Para ello, se han distribuido 200 µl de una disolución de citrato trisódico 40 mM, 0,03% de H₂O al 30%, 7,5 mg/ml de ortofenilendiamina (OPD) en cada uno de los pocillos. Se ha incubado la microplaca durante 30 minutos en oscuridad y a 37°C. Se han añadido 50 µl/pocillo de una disolución de H₂SO₄ 4N para bloquear la reacción.

Se ha determinado la densidad óptica a una longitud de onda de 492 nm (referencia en 620 nm).

4) Secuenciación de los productos de PCR y alineación manual de las secuencias.

Según las técnicas clásicas, utilizando por ejemplo un autómatas "373 DNA sequencer" de Applied Biosystem y el kit "dye terminator" de Applied.

Resultados

El modelo ejemplificado es preferentemente el siguiente sistema de oligonucleótidos:

lag5 cebador sentido-lag6 cebador antisentido
lag3 sonda de revelado e lag4 sonda de captura.

(se debe observar que lag4 también puede marcarse y utilizarse como sonda de revelado).

Estudio de especificidad

Se ha realizado sobre el conjunto de las cepas bacterianas enumeradas en las tablas 4 y 5.

La amplificación del ADN extraído de las 45 cepas de salmonelas probadas ha generado un fragmento del tamaño esperado (véase la figura 5). Se han hibridado las transferencias Southern del conjunto de los productos amplificados con la sonda oligonucleotídica interna lag 3 marcada con peroxidasa. Ninguna de las cepas no salmonelas ha dado lugar a una hibridación con una sonda peroxidasa realizada sobre membrana según el protocolo descrito anteriormente.

Se han ensayado los mismos productos de amplificación en formato de microplaca.

El corte se fija arbitrariamente en 0,050. Todos los representantes de cada uno de los grupos de salmonelas dan un valor de densidad óptica superior a 0,050 (tabla 6).

Sensibilidad

Para determinar el número mínimo de moléculas de ADN cromosómico de salmonelas que se pueden detectar, se ha amplificado una gama de dilución de ADN cromosómico purificado. Son visibles 5 moléculas en la autorradiografía de transferencia Southern y se detectan mediante hibridación en microplaca: el valor obtenido en colorimetría es superior al corte (figura 6).

Los oligonucleótidos seleccionados para la realización de este ejemplo se han localizado en la secuencia del gen lagA (figura 7).

Tabla 4

CEPAS DE SALMONELAS ESTUDIADAS			
N°	Cepas	Serotipo	Grupo
1	<i>Salmonella Marseille</i>		I
2	<i>Salmonella Nyanza</i>		I
3	<i>Salmonella Poona</i>		I
4	<i>Salmonella Kampala</i>		I
5	<i>Salmonella Taksomy</i>		I
6	<i>Salmonella Teshie</i>		I
7	<i>Salmonella Indiana</i>		I
8	<i>Salmonella enteritidis</i>		I
9	<i>Salmonella Kentucky</i>		I
10	<i>Salmonella Napoli</i>		I

Tabla 4 (continuación)

CEPAS DE SALMONELAS ESTUDIADAS			
N°	Cepas	Serotipo	Grupo
11		841 11:a:d:en 215	II
12		1703 K 41: 2: 15	II
13		950-7143:d:z39	II
14		10-65 44 : 24, 223 : -	II
15		3209-81 45: z 23	II
16		5331 / 86 62: z 29 : -	IIIa
17		3064-4 / 252 41: k : -	IIIa
18		594-54 38: z 54: -	IIIa
19		1694 cdai 426 63: z 4, z32: -	IIIa
20		So 50 / 16 62: f, z 51: -	IIIa
21		5251-85 58: r : z 53	IIIb
22		1758-76 6,14 : z 10 : enx 215	IIIb
23		453-68 16 : liv : z53	IIIb
24		4305-57 16 : li(v) : z 35	IIIb
25		1698-75 11 : liv : z	IIIb
26		8275-94 47 : r : enx 215	IIIb
27		8283-94 53 : z 10 : z	IIIb
28		cdc 456-5 / 93 40 : i : 1, 5, 7	IIIb
29		8284-94 60: i : z	IIIb
30		1693 K 38 : k : z 55	IIIb
31		1707 48 : f: z 51 :-	IV
32		7231 / 89 45 : z 36. z 38	IV
33		6887 / 60 48 : f, z 51 :-	IV
34		1357 /73 43 : z4, z 24 : -	IV
35		1550 K 16 : z 4, z 23 : -	IV
36	<i>Salmonella Bongor</i>	261 -66 48 : z35 : -	V
37	<i>Salmonella Camdeni</i>	2022 - 77 44 : r : -	V
38		4985 - 85 48 : z 39 : -	V
39		7688 - 9166 : z 39 : -	V
40		1387 - 7340 : a :	V
41		1941 - 77 6.7 : z 41: 1,7	VI
42		· 1449 K45 : a enx	VI
43		4355 · 84 1,6. 14,25 : a :e,n,x	VI
44		1711 K 11 : b: enx	VI
45		1688 K 1,6. 14,25 : Z 10 : 1,12,7	VI

Tabla 5

5

CEPAS NO SALMONELAS		
N°	Nombre	Identificación
1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	0059 SDP
2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0054 SDP
3	<i>Acinetobacter baumannii</i>	0033 SDP
4	<i>Proteus mirabilis</i>	RP402
5	<i>Serratia marcescens</i>	0042 SDP
6	<i>Enterobacter agglomerans</i>	0067 SDP
7	<i>Citrobacter diversus</i>	0068 SDP
8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0011 SDP
9	<i>Enterobacter aerogenes</i>	0066 SDP
10	<i>Escherichia coli</i>	0131 SDP
11	<i>Enterocoque faecalis</i>	76117
12	<i>Proteus mirabilis</i>	AP03
13	<i>Enterocoque faecalis</i>	76117
14	<i>Enterobacter cloacae</i>	0060 SDP
15	<i>Mycobacterium avium</i>	6
16	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	H 37 RV
17	<i>Listeria monocytogenes</i>	1/2 LG3

Tabla 6

DETECCIÓN EN MICROPLACA	
MUESTRAS	DO a 420 nm
2 Nyanza gpe I	3,029
3 Poona gpe I	3,103
11 gpe II	3,155
12 gpe II	0,751
18 gpe III a	3,139
20 gpe III a	3,068
21 gpe III b	3,161
30 gpe III b	3,201
31 gpe IV	0,272
35 gpe IV	0,527
36 gpe V	1,868
40 gpe V	3,347
45 gpe VI	0,900
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0,022
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,017
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0,024
<i>Proteus mirabilis</i>	0,019
<i>Serratia marcescens</i>	0,019
<i>Enterobacter agglomerans</i>	0,023
<i>Mycobacterium avium</i> n° 6	0,025
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H 37 RV	0,020
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2 LG3	0,015
Control de agua	0,018
Control de agua	0,022

Listado de secuencias

5

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE: INSTITUT PASTEUR

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE

10

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: OLIGONUCLEÓTIDOS PARA LA DETECCIÓN DE SALMONELA

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 29

(iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:

15

(A) DIRECCIÓN: ERNEST GUTMANN - YVES PLASSERAUD S.A.

(B) CALLE: 3 rue Chauveau-Lagarde

(C) CIUDAD: PARIS

(D) ESTADO:

(E) PAÍS: FRANCE

(F) CP: 75008

20

(v) MEDIO LEGIBLE POR ORDENADOR:

(A) TIPO DE MEDIO: Disquete

(B) ORDENADOR: PC compatible IBM

25

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versión #1.30

(vi) DATOS DE SOLICITUD ACTUAL:

30

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: xxxxxxxxxxxxxx

(B) FECHA PRESENTACIÓN: 15-ENE-1996

(C) CLASIFICACIÓN:

35

(vii) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: FR 9500410

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 16-ENE-1995

(vii) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:

- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: 96 400 098.8
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 15-ENE-1996

5

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

- (A) LONGITUD: 2406 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO FILAMENTO: doble
- (D) TIPOLOGÍA: lineal

15

- (ii) TIPO MOLECULAR: ADN (genómico)
- (vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: SALMONELLA SER. TYPHI

20

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 97..1755
- (D) INFORMACIÓN ADICIONAL: /product= "iagA"

25

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 1776..2255
- (D) INFORMACIÓN ADICIONAL: /product= "iagB"

30

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID nº 1:

GTACTAGCAG CAGAATTACT GAAACAGTAG ATTCTATCCT AACGACTTGT ATTAGCTATT	60
ATAACTTTTC ACCCTGTAAG AGAATACACT ATTATC ATG CCA CAT TTT AAT CCT	114
Met Pro His Phe Asn Pro	
1 5	
GTT CCT GTA TCG AAT AAA AAA TTC GTC TTT GAT GAT TTC ATA CTC AAC	162
Val Pro Val Ser Asn Lys Lys Phe Val Phe Asp Asp Phe Ile Leu Asn	
10 15 20	
ATG GAC GGC TCC CTC GTA CGC TCA GAA AAG AAA GTC AAT ATT CCG CCA	210
Met Asp Gly Ser Leu Val Arg Ser Glu Lys Lys Val Asn Ile Pro Pro	
25 30 35	
AAA GAA TAT GCC GTT CTG GTC ATC CTG CTC GAA GCC GCC GGC AAG ATT	258
Lys Glu Tyr Ala Val Leu Val Ile Leu Leu Glu Ala Ala Gly Lys Ile	
40 45 50	
GTG AGT AAA AAC ACC TTA TTG GAC CAA GTA TGG GGC GAC GCG GAA GTT	306
Val Ser Lys Asn Thr Leu Leu Asp Gln Val Trp Gly Asp Ala Glu Val	
55 60 65 70	
AAC GAA GAA TCT CTT ACC CGC TGT ATC TAT GCC TTA CGA CGT ATT CTG	354
Asn Glu Glu Ser Leu Thr Arg Cys Ile Tyr Ala Leu Arg Arg Ile Leu	
75 80 85	
TCG GAA GAT AAA GAG CAT CGT TAC ATT GAA ACA CTG TAC GGA CAG GGT	402
Ser Glu Asp Lys Glu His Arg Tyr Ile Glu Thr Leu Tyr Gly Gln Gly	
90 95 100	
TAT CGG TTT AAT CGT CCG GTC GTA GTG GTG TCT CCG CCA GCG CCG CAA	450
Tyr Arg Phe Asn Arg Pro Val Val Val Val Ser Pro Pro Ala Pro Gln	
105 110 115	
CCT ACG ACT CAT ACA TTG GCG ATA CTT CCT TTT CAG ATG CAG GAT CAG	498
Pro Thr Thr His Thr Leu Ala Ile Leu Pro Phe Gln Met Gln Asp Gln	
120 125 130	
GTT CAA TCC GAG AGT CTG CAT TAC TCT ATC GTG AAG GGA TTA TCG CAG	546
Val Gln Ser Glu Ser Leu His Tyr Ser Ile Val Lys Gly Leu Ser Gln	
135 140 145 150	
TAT GCG CCC TTT GGC CTG AGC GTG CTG CCG GTG ACC ATT ACG AAG AAC	594
Tyr Ala Pro Phe Gly Leu Ser Val Leu Pro Val Thr Ile Thr Lys Asn	
155 160 165	
TGC CGC AGT GTT AAG GAT ATT CTT GAG CTC ATG GAT CAA TTA CGC CCC	642
Cys Arg Ser Val Lys Asp Ile Leu Glu Leu Met Asp Gln Leu Arg Pro	
170 175 180	
GAT TAT TAT ATC TCC GGG CAG ATG ATA CCC GAT GGT AAT GAT AAT ATT	690
Asp Tyr Tyr Ile Ser Gly Gln Met Ile Pro Asp Gly Asn Asp Asn Ile	
185 190 195	

ES 2 360 344 T3

GTA CAG ATC GAG ATA GTT CGG GTT AAA GGT TAT CAC CTG CTG CAC CAG	738
Val Gln Ile Glu Ile Val Arg Val Lys Gly Tyr His Leu Leu His Gln	
200 205 210	
GAA AGC ATT AAG TTG ATA GAA CAC CAA CCC GCT TCT CTC TTG CAA AAC	786
Glu Ser Ile Lys Leu Ile Glu His Gln Pro Ala Ser Leu Leu Gln Asn	
215 220 225 230	
AAA ATT GCG AAT CTT TTG CTC AGA TGT ATT CCC GGA CTT CGC TGG GAC	834
Lys Ile Ala Asn Leu Leu Arg Cys Ile Pro Gly Leu Arg Trp Asp	
235 240 245	
ACA AAG CAA ATT AGC GAG CTA AAT TCG ATT GAC AGT ACC ATG GTC TAC	882
Thr Lys Gln Ile Ser Glu Leu Asn Ser Ile Asp Ser Thr Met Val Tyr	
250 255 260	
TTA CGC GGT AAG CAT GAG TTA AAT CAA TAC ACC CCC TAT AGC TTA CAG	930
Leu Arg Gly Lys His Glu Leu Asn Gln Tyr Thr Pro Tyr Ser Leu Gln	
265 270 275	
CAA GCG CTT AAA TTG CTG ACT CAA TGC GTT AAT ATG TCG CCA AAC AGC	978
Gln Ala Leu Lys Leu Leu Thr Gln Cys Val Asn Met Ser Pro Asn Ser	
280 285 290	
ATT GCG CCT TAC TGT GCG CTG GCA GAA TGC TAC CTC AGC ATG GCG CAA	1026
Ile Ala Pro Tyr Cys Ala Leu Ala Glu Cys Tyr Leu Ser Met Ala Gln	
295 300 305 310	
ATG GGG ATT TTT GAT AAA CAA AAC GCA ATG ATC AAA GCT AAA GAA CAT	1074
Met Gly Ile Phe Asp Lys Gln Asn Ala Met Ile Lys Ala Lys Glu His	
315 320 325	
GCT ATT AAG GCG ACA GAG CTG GAC CAC AAT AAT CCA CAA GCT TTA GGA	1122
Ala Ile Lys Ala Thr Glu Leu Asp His Asn Asn Pro Gln Ala Leu Gly	
330 335 340	
TTA CTG GGG CTA ATT AAT ACG ATT CAC TCA GAA TAC ATC GTC GGG AGT	1170
Leu Leu Gly Leu Ile Asn Thr Ile His Ser Glu Tyr Ile Val Gly Ser	
345 350 355	
TTA CTA TTC AAA CAA GCT AAC TTA CTT TCG CCC ATT TCT GCA GAT ATT	1218
Leu Leu Phe Lys Gln Ala Asn Leu Leu Ser Pro Ile Ser Ala Asp Ile	
360 365 370	
AAA TAT TAT TAT GGC TGG AAT CTT TTC ATG GCT GGT CAG TTG GAG GAG	1266
Lys Tyr Tyr Tyr Gly Trp Asn Leu Phe Met Ala Gly Gln Leu Glu Glu	
375 380 385 390	
GCC TTA CAA ACG ATT AAC GAG TGT TTA AAA TTG GAC CCA ACG CGC GCA	1314
Ala Leu Gln Thr Ile Asn Glu Cys Leu Lys Leu Asp Pro Thr Arg Ala	
395 400 405	
GCC GCA GGG ATC ACT AAG CTG TGG ATT ACC TAT TAT CAT ACC GGT ATT	1362
Ala Ala Gly Ile Thr Lys Leu Trp Ile Thr Tyr Tyr His Thr Gly Ile	
410 415 420	
GAT GAT GCT ATA CGT TTA GGC GAT GAA TTA CGC TCA CAA CAC CTG CAG	1410
Asp Asp Ala Ile Arg Leu Gly Asp Glu Leu Arg Ser Gln His Leu Gln	
425 430 435	

GAT AAT CCA ATA TTA TTA AGT ATG CAG GTT ATG TTT CTT TCG CTT AAA Asp Asn Pro Ile Leu Leu Ser Met Gln Val Met Phe Leu Ser Leu Lys 440 445 450	1458
GGT AAA CAT GAA CTG GCA CGA AAA TTA ACT AAA GAA ATA TCC ACG CAG Gly Lys His Glu Leu Ala Arg Lys Leu Thr Lys Glu Ile Ser Thr Gln 455 460 465 470	1506
GAA ATA ACA GGA CTT ATT GCT GTT AAT CTT CTT TAC GCT GAA TAT TGT Glu Ile Thr Gly Leu Ile Ala Val Asn Leu Leu Tyr Ala Glu Tyr Cys 475 480 485	1554
CAG AAT AGT GAG CGT GCC TTA CCG ACG ATA AGA GAA TTT CTG GAA AGT Gln Asn Ser Glu Arg Ala Leu Pro Thr Ile Arg Glu Phe Leu Glu Ser 490 495 500	1602
GAA CAG CGT ATA GAT AAT AAT CCG GGA TTA TTA CCG TTA GTG CTG GTT Glu Gln Arg Ile Asp Asn Asn Pro Gly Leu Leu Pro Leu Val Leu Val 505 510 515	1650
GCC CAC GGC GAA GCT ATT GCC GAG AAA ATG TGG AAT AAA TTT AAA AAC Ala His Gly Glu Ala Ile Ala Glu Lys Met Trp Asn Lys Phe Lys Asn 520 525 530	1698
GAA GAC AAT ATT TGG TTC AAA AGA TGG AAA CAG GAT CCC CGC TTG ATT Glu Asp Asn Ile Trp Phe Lys Arg Trp Lys Gln Asp Pro Arg Leu Ile 535 540 545 550	1746
AAA TTA CGG TAAAATCTGA GAGAGGAGAT ATG CAT TAT TTT TTT ATC ATC Lys Leu Arg Met His Tyr Phe Phe Ile Ile 1 5	1796
GTA ATC TGG TTG CTT AGC ATA AAT ACG GCA TGG GCT GAT TGC TGG CTT Val Ile Trp Leu Leu Ser Ile Asn Thr Ala Trp Ala Asp Cys Trp Leu 10 15 20	1844
CAG GCT GAA AAA ATG TTC AAT ATT GAA TCC GAA CTA CTT TAC GCT ATC Gln Ala Glu Lys Met Phe Asn Ile Glu Ser Glu Leu Leu Tyr Ala Ile 25 30 35	1892
GCC CAG CAG GAA TCG GCG ATG AAA CCT GGC GCC ATT GGT CAT AAC CGA Ala Gln Gln Glu Ser Ala Met Lys Pro Gly Ala Ile Gly His Asn Arg 40 45 50 55	1940
GAT GGT TCA ACC GAT CTT GGC CTG ATG CAA ATT AAC AGC TTC CAT ATG Asp Gly Ser Thr Asp Leu Gly Leu Met Gln Ile Asn Ser Phe His Met 60 65 70	1988
AAA AGG CTG AAA AAA ATG GGG ATT AGT GAA AAA CAG TTG TTA CAG GAT Lys Arg Leu Lys Lys Met Gly Ile Ser Glu Lys Gln Leu Leu Gln Asp 75 80 85	2036
CCC TCG ATT TCT GTC ATT GTG GGC GCA TCC ATT TTA TCA GAT ATG ATG Pro Ser Ile Ser Val Ile Val Gly Ala Ser Ile Leu Ser Asp Met Met 90 95 100	2084
AAA ATC TAC GGT TTT AGC TGG GAG GCC GTT GGC GCT TAT AAT GCC GGG Lys Ile Tyr Gly Phe Ser Trp Glu Ala Val Gly Ala Tyr Asn Ala Gly 105 110 115	2132

```

ACG TCG CCG AAA CGA TCG GAT ATA AGG AAA CGT TAT GCT AAA AAA ATT      2180
Thr Ser Pro Lys Arg Ser Asp Ile Arg Lys Arg Tyr Ala Lys Lys Ile
120                      125                      130                      135

TGG GAG AAT TAC AGA AAA TTA AAA GAG ATG TCA GCA GAA GAG AAA AAC      2228
Trp Glu Asn Tyr Arg Lys Leu Lys Glu Met Ser Ala Glu Glu Lys Asn
                      140                      145                      150

AAA AGA CTT TCT ATC GCG GTA AAC AAA TAATTATACA GGAATAGCTT      2275
Lys Arg Leu Ser Ile Ala Val Asn Lys
                      155                      160

ACTTTCAGAT AATTCTAAAA GTAAGCTATG TTTTATCAG CTTGCCGTCG TCATAAGCAA      2335

CTGGCGCTTG CATTGCTTTT AGTTGTACAA ACTGTGAGGC GTCTTCCAGC ATTCTATTGT      2395

TCCGTGAATT C                                                                2406
    
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 2:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 553 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TIPOLOGÍA: lineal

10

(ii) TIPO MOLECULAR: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID nº 2:

```

Met Pro His Phe Asn Pro Val Pro Val Ser Asn Lys Lys Phe Val Phe
  1          5          10          15

Asp Asp Phe Ile Leu Asn Met Asp Gly Ser Leu Val Arg Ser Glu Lys
  20          25          30

Lys Val Asn Ile Pro Pro Lys Glu Tyr Ala Val Leu Val Ile Leu Leu
  35          40          45

Glu Ala Ala Gly Lys Ile Val Ser Lys Asn Thr Leu Leu Asp Gln Val
  50          55          60

Trp Gly Asp Ala Glu Val Asn Glu Glu Ser Leu Thr Arg Cys Ile Tyr
  65          70          75          80

Ala Leu Arg Arg Ile Leu Ser Glu Asp Lys Glu His Arg Tyr Ile Glu
  85          90          95

Thr Leu Tyr Gly Gln Gly Tyr Arg Phe Asn Arg Pro Val Val Val
 100          105          110

Ser Pro Pro Ala Pro Gln Pro Thr Thr His Thr Leu Ala Ile Leu Pro
 115          120          125

Phe Gln Met Gln Asp Gln Val Gln Ser Glu Ser Leu His Tyr Ser Ile
 130          135          140

Val Lys Gly Leu Ser Gln Tyr Ala Pro Phe Gly Leu Ser Val Leu Pro
 145          150          155          160
    
```

ES 2 360 344 T3

Val Thr Ile Thr Lys Asn Cys Arg Ser Val Lys Asp Ile Leu Glu Leu
165 170 175

Met Asp Gln Leu Arg Pro Asp Tyr Tyr Ile Ser Gly Gln Met Ile Pro
180 185 190

Asp Gly Asn Asp Asn Ile Val Gln Ile Glu Ile Val Arg Val Lys Gly
195 200 205

Tyr His Leu Leu His Gln Glu Ser Ile Lys Leu Ile Glu His Gln Pro
210 215 220

Ala Ser Leu Leu Gln Asn Lys Ile Ala Asn Leu Leu Leu Arg Cys Ile
225 230 235 240

Pro Gly Leu Arg Trp Asp Thr Lys Gln Ile Ser Glu Leu Asn Ser Ile
245 250 255

Asp Ser Thr Met Val Tyr Leu Arg Gly Lys His Glu Leu Asn Gln Tyr
260 265 270

Thr Pro Tyr Ser Leu Gln Gln Ala Leu Lys Leu Leu Thr Gln Cys Val
275 280 285

Asn Met Ser Pro Asn Ser Ile Ala Pro Tyr Cys Ala Leu Ala Glu Cys
290 295 300

Tyr Leu Ser Met Ala Gln Met Gly Ile Phe Asp Lys Gln Asn Ala Met
305 310 315 320

Ile Lys Ala Lys Glu His Ala Ile Lys Ala Thr Glu Leu Asp His Asn
325 330 335

Asn Pro Gln Ala Leu Gly Leu Leu Gly Leu Ile Asn Thr Ile His Ser
340 345 350

Glu Tyr Ile Val Gly Ser Leu Leu Phe Lys Gln Ala Asn Leu Leu Ser
355 360 365

Pro Ile Ser Ala Asp Ile Lys Tyr Tyr Tyr Gly Trp Asn Leu Phe Met
370 375 380

Ala Gly Gln Leu Glu Glu Ala Leu Gln Thr Ile Asn Glu Cys Leu Lys
385 390 395 400

Leu Asp Pro Thr Arg Ala Ala Ala Gly Ile Thr Lys Leu Trp Ile Thr
405 410 415

Tyr Tyr His Thr Gly Ile Asp Asp Ala Ile Arg Leu Gly Asp Glu Leu
420 425 430

Arg Ser Gln His Leu Gln Asp Asn Pro Ile Leu Leu Ser Met Gln Val
435 440 445

Met Phe Leu Ser Leu Lys Gly Lys His Glu Leu Ala Arg Lys Leu Thr
450 455 460

Lys Glu Ile Ser Thr Gln Glu Ile Thr Gly Leu Ile Ala Val Asn Leu
465 470 475 480

Leu Tyr Ala Glu Tyr Cys Gln Asn Ser Glu Arg Ala Leu Pro Thr Ile
 485 490 495
 Arg Glu Phe Leu Glu Ser Glu Gln Arg Ile Asp Asn Asn Pro Gly Leu
 500 505 510
 Leu Pro Leu Val Leu Val Ala His Gly Glu Ala Ile Ala Glu Lys Met
 515 520 525
 Trp Asn Lys Phe Lys Asn Glu Asp Asn Ile Trp Phe Lys Arg Trp Lys
 530 535 540
 Gln Asp Pro Arg Leu Ile Lys Leu Arg
 545 550

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 3

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 160 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TIPOLOGÍA: lineal

10

- (ii) TIPO MOLECULAR: proteína
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID nº 3:

Met His Tyr Phe Phe Ile Ile Val Ile Trp Leu Leu Ser Ile Asn Thr
 1 5 10 15
 Ala Trp Ala Asp Cys Trp Leu Gln Ala Glu Lys Met Phe Asn Ile Glu
 20 25 30
 Ser Glu Leu Leu Tyr Ala Ile Ala Gln Gln Glu Ser Ala Met Lys Pro
 35 40 45
 Gly Ala Ile Gly His Asn Arg Asp Gly Ser Thr Asp Leu Gly Leu Met
 50 55 60
 Gln Ile Asn Ser Phe His Met Lys Arg Leu Lys Lys Met Gly Ile Ser
 65 70 75 80
 Glu Lys Gln Leu Leu Gln Asp Pro Ser Ile Ser Val Ile Val Gly Ala
 85 90 95
 Ser Ile Leu Ser Asp Met Met Lys Ile Tyr Gly Phe Ser Trp Glu Ala
 100 105 110
 Val Gly Ala Tyr Asn Ala Gly Thr Ser Pro Lys Arg Ser Asp Ile Arg
 115 120 125
 Lys Arg Tyr Ala Lys Lys Ile Trp Glu Asn Tyr Arg Lys Leu Lys Glu
 130 135 140
 Met Ser Ala Glu Glu Lys Asn Lys Arg Leu Ser Ile Ala Val Asn Lys
 145 150 155 160

15

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

20

- (A) LONGITUD: 20 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO FILAMENTO: sencillo
- (D) TIPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: otro ácido nucleico
 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID nº 4:

5 TATTAAGTAT GCAGGTTATG 20

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 10 (A) LONGITUD: 21 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO FILAMENTO: sencillo
 (D) TIPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO MOLECULAR: otro ácido nucleico
 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID nº 5:

AGAGAATTTTC TGCAAAGTGA A 21

20 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 27 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO FILAMENTO: sencillo
 (D) TIPOLOGÍA: lineal

30 (ii) TIPO MOLECULAR: otro ácido nucleico
 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID nº 6:

ATATCCACGC AGGAAATAAC AGGACTT 27

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 40 (A) LONGITUD: 21 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO FILAMENTO: sencillo
 (D) TIPOLOGÍA: lineal

45 (ii) TIPO MOLECULAR: otro ácido nucleico
 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID nº 7:

GAGCGTGCCT TACCGACGAT A 21

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 55 (A) LONGITUD: 20 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO FILAMENTO: sencillo
 (D) TIPOLOGÍA: lineal

60 (ii) TIPO MOLECULAR: otro ácido nucleico
 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID nº 8:

GCAGGGATCA CTAAGCTGTG 20

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 65 (A) LONGITUD: 21 pares de bases

- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO FILAMENTO: sencillo
- (D) TIPOLOGÍA: lineal

5 (ii) TIPO MOLECULAR: otro ácido nucleico
 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID nº 9:
 CGTGGGCAAC CAGCACTAAC G 21

10 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO FILAMENTO: sencillo
- (D) TIPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO MOLECULAR: otro ácido nucleico
 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID nº 10:
 CGGGTTAAAG GTTATCACCT 20

25 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 17 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO FILAMENTO: sencillo
- (D) TIPOLOGÍA: lineal

35 (ii) TIPO MOLECULAR: otro ácido nucleico
 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID nº 11:
 AGCATGGCGC AAATGGG 17

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 12:

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 31 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO FILAMENTO: sencillo
- (D) TIPOLOGÍA: lineal

50 (ii) TIPO MOLECULAR: otro ácido nucleico
 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID nº 12:
 GCACCAGGAA AGCATTAAAGT TGATAGAACA C 31

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO FILAMENTO: sencillo
- (D) TIPOLOGÍA: lineal

60 (ii) TIPO MOLECULAR: otro ácido nucleico
 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID nº 13:
 CTTCGCTGGG ACACAAAGCA 20

65 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 17 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO FILAMENTO: sencillo
 (D) TIPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO MOLECULAR: otro ácido nucleico
 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID nº 14:
 TAATGCTTTC CTGGTGC 17

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 15:

- 15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 20 (A) LONGITUD: 20 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO FILAMENTO: sencillo
 (D) TIPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO MOLECULAR: otro ácido nucleico
 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID nº 15:
 25 TACGGCATGG GCTGATTGCT 20

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 16:

- 30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 35 (A) LONGITUD: 24 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO FILAMENTO: sencillo
 (D) TIPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO MOLECULAR: otro ácido nucleico
 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID nº 16:
 40 TTACGCTATC GCCCAGCAGC AGGA 24

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 17:

- 45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 50 (A) LONGITUD: 29 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO FILAMENTO: sencillo
 (D) TIPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO MOLECULAR: otro ácido nucleico
 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID nº 17:
 55 TGGTCATAAC CGAGATGGTT CAAACGATC 29

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 18:

- 60 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 65 (A) LONGITUD: 20 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO FILAMENTO: sencillo
 (D) TIPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO MOLECULAR: otro ácido nucleico
 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID nº 18:

ACAGTTGTTA CAGGATCCCT 20

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 17 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO FILAMENTO: sencillo
- (D) TIPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: otro ácido nucleico
 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID nº 19:

CCGGGCAGAT GATACCC 17

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 300 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO FILAMENTO: doble
- (D) TIPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN (genómico)
 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID nº 20:

TATTATCATA CCGGTATTGA TGATGCTATA CGTTTAGGCG ATGAATTACG CTCACAACAC 60
 CTGCAGGATA ATCCAATATT ATTAAGTATG CAGGTTATGT TTCTTTCGCT TAAAGGTAAA 120
 CATGAACTGG CACGAAAATT AACTAAAGAA ATATCCACGC AGGAAATAAC AGGACTTATT 180
 GCTGTTAATC TTCTTTACGC TGAATATTGT CAGAATAGTG AGCGTGCCTT ACCGACGATA 240
 AGAGAATTTT TGGAAAGTGA ACAGCGTATA GATAATAATC CGGGATTATT ACCGTTAGTG 300

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 300 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO FILAMENTO: doble
- (D) TIPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN (genómico)
 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID nº 21:

TATTATCATA CTGGTATTGA TGATGCTATA CGTTTAGGCG ATGAATTACG CTCACAACAC 60
 CTGCAGGATA ATCCAATATT ATTAAGTATG CAGGTTATGT TTCTTTCTCT TAAAGGTAAA 120
 CATGAACTGG CACGAAAATT ATCTAAAGAA ATATCCACGC AGGAAATAAC AGGGCTTATT 180
 GCTGTTAATC TTCTTTATGC TGAATACTGT CAGAATAGTG AGCGTGCCTT ACCGACGATA 240
 AGAGAATTTT TGGAAAGTGA ACAGCGTATA GATAATAATC CGGGATTATT ACCGTTAGTG 300

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 22:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 300 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO FILAMENTO: doble
 (D) TIPOLOGÍA: lineal

- 10 (ii) TIPO MOLECULAR: ADN (genómico)
 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID nº 22:

TATTATCATA CCGGCATTGA TGATGCCATA CGTTTAGGAG ATGAACTACG CTCACAGCAC 60
 CTGCAGGATA ATCCCATTTT ATTAAGTATG CAGGTTATGT TTCTTTCGCT TAAAGGTAAA 120
 CATGAGCTGG CACGAAAATT AACTAAAGAG ACATCCCCGC ATGAGATAAC AGGGCTTATT 180
 GCTATTAATC TTCTTTATGC TGAATACTGT CAGAATAGTG AGCGAGCCTT ACCGAGGATA 240
 AGAGAATATC TGGCAAGTGA ACGGAGTATT GATAATAATC CTGGACTATT ACCGTTAGTG 300

15 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 23:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 300 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO FILAMENTO: doble
 (D) TIPOLOGÍA: lineal

- 25 (ii) TIPO MOLECULAR: ADN (genómico)
 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID nº 23:

TATTATCATG CCGGCATTGA TGATGCTATA CGTTTAGGAG ATGAATTACG TTCACAACAT 60
 CTGCAGGATA ATCCAATACT ATTAAGTATG CAGGTTATGT TTCTTTCGCT TAAAGGTAAA 120
 CATGAACTGG CACGAAAATT AGCTAAAGAA ATATCCAAGC ATGAAATAAC AGGGCTTATT 180
 GCTGTTAATC TTCTGTATGC TGAATACTGT CAGAATAGCG AGCGTGCATT ACCGAGGATA 240
 AGAGAGTTTC TGGAAAGTGA ACAGAATACT GATAATAATC CCGGGCTATT ACCGTTAGTG 300

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 24:

30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 300 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO FILAMENTO: doble
 (D) TIPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO MOLECULAR: ADN (genómico)
 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID nº 24:

TACTATCATA CTGGCCTTGA TGATGCTATA CGTTTAGGAG ATGAATTACG TTCGCAACAT 60
 TTGCAGGATA ATCCAATATT ATTAAGTATG CAGGTTATGT TTCTTTCGCT TAAAGGTAAA 120
 CATGAACTGG CACGAAAATT AACTAAAGAA ATATCCACAC ATGAAATAAC AGGGCTTATT 180
 GCTGTTAATC TTCTTTATGC TGAATACTGT CAGAATAGTG AGCGTGCCTT AGCGACGATA 240
 AGAGAATTTT TGGAAAGTGA ACAGAGTGTT GATAATAACC CAGGGTTATT ACCGTTAGTG 300

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 25:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 300 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO FILAMENTO: doble
 (D) TIPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO MOLECULAR: ADN (genómico)
 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID nº 25:

TATTATCAGA CTGGCATTGA TGATGCTATA CGTTTAGGCG ATGAATTACG CTCACAATAT 60
 CTGCAAGATA ATCCAATATT ATTAAGTATG CAGCTTATGT TTCTTTCGCT TAAAGGTAAA 120
 CATGAGTTGG CACGAAAATT AGCTAAAGAA ATATCCACAC ACGAAGTAAC AGGGCTTATT 180
 GCTGTTAATC TTCTTTATGC TGAATACTGT CAGAATAGCG AGCGTGCTTT ACCGGCGATA 240
 AGAGAATTTT TGGAAAGTGA ACAGAATATA GATAATAATC CGGGGCTATT ACCGTTAGTG 300

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 26:

20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 300 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO FILAMENTO: doble
 (D) TIPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO MOLECULAR: ADN (genómico)
 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID nº 26:

TACTATCATA CAGGCCTTGA TGATGCTATA CGTTTAGGCG ATGAATTACG TACACAACAT 60
 TTGCAAGATA ATCCTATATT ATTAAGTATG CAAGTTATGT TTCTTTCGCT TAAAGGTAAA 120
 CATGAACTGG CACGGCTATT AGCTAAAGAA ATATCCTCAC ATGAAATAAC AGGGCTTATT 180
 GCTATTAATC TTCTTTATGC TGAATATTGT CAGAATAGTG AGCGCGCCTT ACCGGCGATA 240
 AAAGAATTTT TGGAAAGTGA ACAAATATT GACAATAACC CTGGGCTATT ACCGTTAGTG 300

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 27:

35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 300 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO FILAMENTO: doble
 (D) TIPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN (genómico)
 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID nº 27:

TATTATCATA CCGGCATTGA TGATGCTATA CGGTTAGGAG ATGAATTACG TTCACAACAC 60
 TTGCAGGATA ATCCAATATT ATTAAGTATG CAGGTTATGT TTCTTTCGCT TAAAGGTAAG 120
 CATGAACTGG CACGAAAATT AACTAAAGAA ATATCCAGAC ATGAAATAAC AGGGCTTATT 180
 GCTGTTAATC TTCTTTATGC TGAATACTGT CAGAATAGTG AGCGTGCCTT ATCGAGGATA 240
 AGAGAATTTT TGGAAAGTGA ACAGAGTATT GATAATAATC CAGGACTATT ACCGTTAGTG 300

5

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 28:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

- (A) LONGITUD: 34 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO FILAMENTO: doble
- (D) TIPOLOGÍA: lineal

15

(ii) TIPO MOLECULAR: otro ácido nucleico
 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID nº 28:

CCCGAACTAT CTCGATCTGT ACAATATTAT CATT 34

20

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 29:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

25

- (A) LONGITUD: 18 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO FILAMENTO: doble
- (D) TIPOLOGÍA: lineal

30

(ii) TIPO MOLECULAR: otro ácido nucleico
 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID nº 29:

GCAGGTGATT ACCTTTAA 18

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Par de cebadores oligonucleotídicos caracterizado porque consiste en dos oligonucleótidos de por lo menos 9 nucleótidos que hibridan en condiciones astringentes con la secuencia nucleotídica que corresponde a la parte C-terminal del gen *iagA* definida entre las posiciones 1318 y 1755 de la secuencia *iagA* representada en la figura 1, siendo dicho par capaz de amplificar una secuencia de ADN o de ADNc de *Salmonella enterica* y de *Salmonella bongori* comprendida en la secuencia *iagA*.
- 10 2. Par de cebadores según la reivindicación 1, caracterizado porque las condiciones de hibridación astringentes son 50°C en la mezcla de reacción siguiente: KCl 50 mM, Tris-HCl 10mM pH 8,3, MgCl₂ 1,5 mM, dCTP, dATP y dGTP 125 μM, 250 μM de dUTP, 25 pmoles de cada uno de los cebadores, 1 unidad de Uracilo N Glucosilasa y 1U de Taq.
- 15 3. Kit para la detección de la presencia de *Salmonella enterica* y/o de *Salmonella bongori* en muestras biológicas, que comprende:
- un par de cebadores oligonucleotídicos según la reivindicación 1 ó 2,
 - una sonda para la detección de los fragmentos amplificados, y
 - los reactivos necesarios para la realización de la reacción de amplificación.
- 20 4. Utilización de un par de cebadores según la reivindicación 1 para la amplificación de secuencias de nucleótidos de bacterias del género *Salmonella* especies *enterica* y *bongori*.
- 25 5. Utilización de un par de cebadores oligonucleotídicos según la reivindicación 1, para la detección tras la amplificación del ADN genómico o del ADNc, de bacterias del género *Salmonella* especies *enterica* y *bongori*.
6. Utilización según la reivindicación 4 ó 5, en la que las condiciones de hibridación astringentes son 50°C en la mezcla de reacción siguiente: KCl 50 mM, Tris-HCl 10mM pH 8,3, MgCl₂ 1,5 mM, dCTP, dATP y dGTP 125 μM, 250 μM de dUTP, 25 pmoles de cada uno de los cebadores, 1 unidad de Uracilo N Glucosilasa y 1U de Taq.

```

1                               31
GTA CTA GCA GCA GAA TTA CTG AAA CAG TAC ATT CTA TCC TAA CGA CTT GTA TTA GCT ATT

61                               91      1 agA
ATA ACT TTT CAC CCT GTA AAG GAA TAC ACT ATT ATC ATG CCA CAT TTT AAT CCT GTT CCT
                                met pro his phe asn pro val pro

121                               151
GTA TCG AAT AAA AAA TTC GTC TTT GAT GAT TTC ATA CTC AAC ATG GAC GGC TCC CTC GTA
val ser asn lys lys phe val phe asp asp phe ile leu asn met asp gly ser leu val
181                               211
COC TCA GAA AAG AAA GTC AAT ATT CCG CCA AAA GAA TAT GCG GTT CTG GTC ATC CTC CTC
arg ser glu lys lys val asn ile pro pro lys glu tyr ala val leu val ile leu leu
241                               271
GAR GCG GCG GCG AAG ATT GTG AGT AAA AAC ACC TTA TTC GAC CAA GTA TCG GGC GAC GCG
glu ala ala gly lys ile val ser lys asn thr leu leu asp gla val trp gly asp ala
301                               331
CAA GTT AAC GAA CAA TCT CTT ACC CCG TGT ATC TAT GCG TTA CGA GGT ATT CTC TCG GAA
glu val asn glu glu ser leu thr arg cys ile tyr ala leu arg arg ile leu ser glu
361                               391
GAT AAA GAG CAT CGT TAC ATT GAA ACA CTC TAC GGA CAG GGT TAT CCG TTT AAT GGT CCG
asp lys glu his arg tyr ile glu thr leu tyr gly glu gly tyr arg phe asn arg pro
421                               451
GTC GTA GTG GTG TCT CCG CCA GCG CCG CAA CTT ACG ACT CAT ACA TTC GCG ATA CTT CCT
val val val val ser pro pro ala pro glu pro thr thr his thr leu ala ile leu pro
481                               511
TTT CAG ATG CAG CAT CAG GTT CAA TCC GAG ACT CTC CAT TAC TCT ATC GTC AAG CGA TTA
phe glu met glu asp glu val glu ser glu ser leu his tyr ser ile val lys gly leu
541                               571
TCC CAG TAT GCG CCG TTT GCG CTC AGC GTC CTC CCG GTG ACC ATT ACC AAG AAC TCC CCG
ser glu tyr ala pro phe gly leu ser val leu pro val thr ile thr lys asn cys arg
601                               631
AGT GTT AAG GAT AAT CTT GAG CTC ATG GAT CAA TTA CCG CCG GAT TAT TAT ATC TCC GCG
ser val lys asp ile leu glu leu met asp gla leu arg pro asp tyr tyr ile ser gly
661                               691
CAG AFG ATA CCG GAT GGT AAT GAT AAT ATT GYA CAG ATC GAG ATA CTT CCG GTT AAA GGT
glu met ile pro asp gly asn asp asn ile val gla ile glu ile val arg val lys gly
721                               751
TAT CAC CTC CTG CAC CAG GAA AOC ATT AAG TTC ATA GAA CAC CAA CCG GCT TCT CTC TTC
tyr his leu leu his glu glu ser ile lys leu ile glu his glu pro ala ser leu leu
781                               811
CAA AAC AAA ATT GCG AAT CTT TTC CTC AGA TGT ATT CCG GCA CTT CCG TCC GAC ACA AAG
gla asn lys ile ala asn leu leu leu arg cys ile pro gly leu arg trp asp thr lys
841                               871
CAA ATT AGC GAG CTA AAT TCC ATT EAC AGT ACC ATG CTC TAC TTA CCG GGT AAG CAT GAG
glu ile ser glu leu asn ser ile asp ser thr met val tyr leu arg gly lys his glu
901                               931
TTA AAT CAA TAC ACC CCG TAT AGC TTA CAG CAA CCG CTT AAA TTC CTC ACT CAA TCC GTT
leu asn glu tyr thr pro tyr ser leu glu glu ala leu lys leu leu thr glu cys val
961                               991
AAT ATC TCG CCA AAC AGC ATT GCG CCT TAC TGT CCG CTC GCA GAA TCC TAC CTC ACC ATG
asn met ser pro asn ser ile ala pro tyr cys ala leu ala glu cys tyr leu ser met
1021                               1051
GCG CAA ATG GCG ATT TTT GAT AAA CAA AAC GCA ATG ATC AAA GGT AAA CAA CAT GCG ATT
ala glu met gly ile phe asp lys glu asn ala met ile lys ala lys glu his ala ile
1081                               1111
AAG GCG ACA GAG CTC GAC CAC AAT AAT CCA CAA GCT TTA GCA TTA CTC GCG CTA ATT AAT
lys ala thr glu leu asp his asn asn pro glu ala leu gly leu leu gly leu ile asn

```

figura 1 (1)

1101
 ACC ATT CAC TCA GAA TAC ATC CTC GCG AGT TTG CTA TTC AAA CAA GCT AAC TTA CTT TCG
 thr ile his ser glu tyr ile val gly ser leu leu phe lys gla ala asn leu leu ser

1171
 1201
 CCC ATT TCT GCA CAT ATT AAA TAT TAT TAT GGC TCG AAT CTT TTC ATG GCT GGT CAG TTG
 pro ile ser ala asp ile lys cys tyr tyr gly trp asn leu phe met ala gly gla leu
 1261/421
 CAG CAG GCC TTA CAA ACG ATT AAC CAG TGT TTA AAA TTG GAC CCA ACG CGC GCA GCC GCA
 glu glu ala leu gla thr ile asa glu cys leu lys leu asp pro thr arg ala ala ala
 1321/441
 GCG ATC ACT AAG CTC TGG ATT ACC TAT TAT CAT ACC GGT ATT GAT GAT GCT ATA CGT TTA
 gly ile thr lys leu trp ile thr cys tyr his thr gly ile asp asp ala ile arg leu
 1381/461
 GCC CAT GAA TTA CCG TCA CAA CAC CTG CAG CAT AAT CCA ATA TTA TTA AGT ATC CAG GTT
 gly asp glu leu asp ser gla his leu gln asp asn pro ile leu leu ser met gla val
 1441/481
 ATC TTT CTT TCG CTT AAA GGT AAA CAT GAA CTC GCA CCA AAA TTA ACT AAA CAA ATA TCC
 met phe leu ser leu lys gly lys his glu leu ala arg lys leu thr lys glu ile ser
 1501
 ACC CAG CAA ATA ACA GCA CTT ATT GCT GTT AAT CTT CTT TAC GCT GAA TAT TGT CAG AAT
 thr gla glu ile thr gly leu ile ala val asn leu leu tyr ala gla tyr cys gla asn
 1561
 AGT CAG CGT GCC TTA CCG ACG ATA ACA GAA TTT CTG GAA AGT GAA CAG CGT ATA GAT AAT
 ser glu arg ala leu pro thr ile arg glu phe leu glu ser glu gla arg ile asp asn
 1621
 AAT CCG GCA TTA TTA CCG TTA CTC CTG GTT GCG CAC GGC GAA GCT ATT GCC CAG AAA ATG
 asn pro gly leu leu pro leu val leu val ala his gly gla ala ile ala glu lys met
 1681
 TGC AAT AAA TTT AAA AAC GAA CAC AAT ATT TGC TTC AAA ACA TGC AAA CAG CAT CCC CGC
 trp asn lys phe lys asa glu asp asn ile trp phe lys arg trp lys gla asp pro arg
 1741
 TTG ATT AAA TTA CCG TAA AAT CTC ACA GAG CAG AT ATC CAT TAT TTT TTT ATC ATC GTA
 leu ile lys leu arg met his tyr phe phe ile ile val
 1800 553 1830 554
 ATC TCG TTG CTT AGC ATA AAT ACG GCA TCG GGT GAT TCG TCG CTT CAG GCT GAA AAA ATG
 ile trp leu leu ser ile asn thr ala trp ala asp cys trp leu gla ala glu lys met
 1860
 TTC AAT ATT GAA TCC GAA GTA CTT TAC GCT ATC TCC CAG CAG GAA TCG GCG ATG AAA CCT
 phe asn ile glu ser glu leu leu tyr ala ile ala gla gla gla ser ala met lys pro
 1920
 GGC GGC ATT GGT CAT AAC CCA GAT GGT TCA ACC GAT CTT GGC CTC ATC CAA ATT AAC ACG
 gly ala ile gly his asn arg asp gly ser thr asp leu gly leu met gla ile asn ser
 1980
 TTC CAT ATG AAA ACG CTC AAA AAA ATC CCC ATT ACT CAA AAA CAG TTC TTA CAG CAT CCC
 phe his met lys arg leu lys lys met gly ile ser glu lys gla leu leu gla asp pro
 2040
 TGC ATT TCT CTC ATT CTG GGC GCA TCC ATT TTA TCA CAT ATC ATG AAA ATC TAC GGT TTT
 cys ile ser val ile val gly ala ser ile leu ser asp met met lys ile tyr gly phe
 2100
 AGC TCG CAG GCG GTT GCG GCT TAT AAT CCC GCG ACC TCG CCG AAA CCA TCG GAT ATA AGG
 ser trp glu ala val gly ala tyr asa ala gly thr ser pro lys arg ser asp ile arg
 2160
 AAA CGT TAT GCT AAA AAA ATT TCG CAG AAT TAC AGA AAA TTA AAA CAG ATC TCA CCA GAA
 lys arg tyr ala lys lys ile trp glu asn tyr arg lys leu lys glu met ser ala gla
 2220
 CAG AAA AAC AAA ACA CTT TCT ATC CCG GTA AAC AAA TAA TTA TAC AGC AAT AGC TTA CTT
 gla lyc asa lys arg leu ser ile ala val asn lys
 713

figura 1 (2)

2280
TCA GAT AAT TCT AAA AGT AAG CTA TGT TTT TAT CAG CTT GGC GTC GTC ATA AGC AAC TGC

2310

2340
GCT TGC ATT GCT TTT AGT TGT ACA AAC TGT GAG GCG TCT TCC AGC ATT CTA TTG TTC CCT

2370

2400
GAA TTC

figura 1 (3)

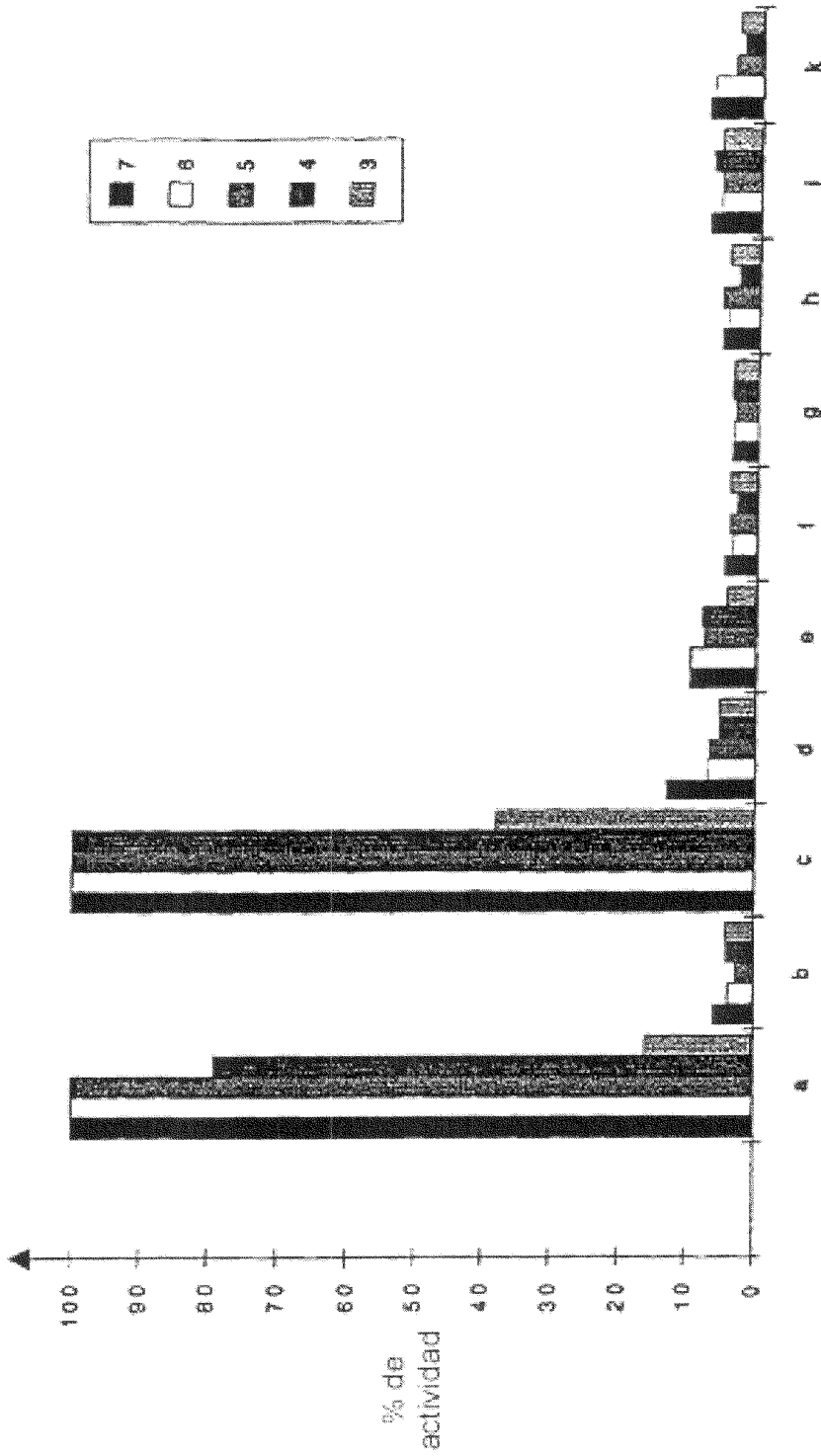


figura 2

ALINEACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE LOS FRAGMENTOS
AMPLIFICADOS (nucleósidos 1345 a 1644)
de los 6 GRUPOS DE SALMONELAS

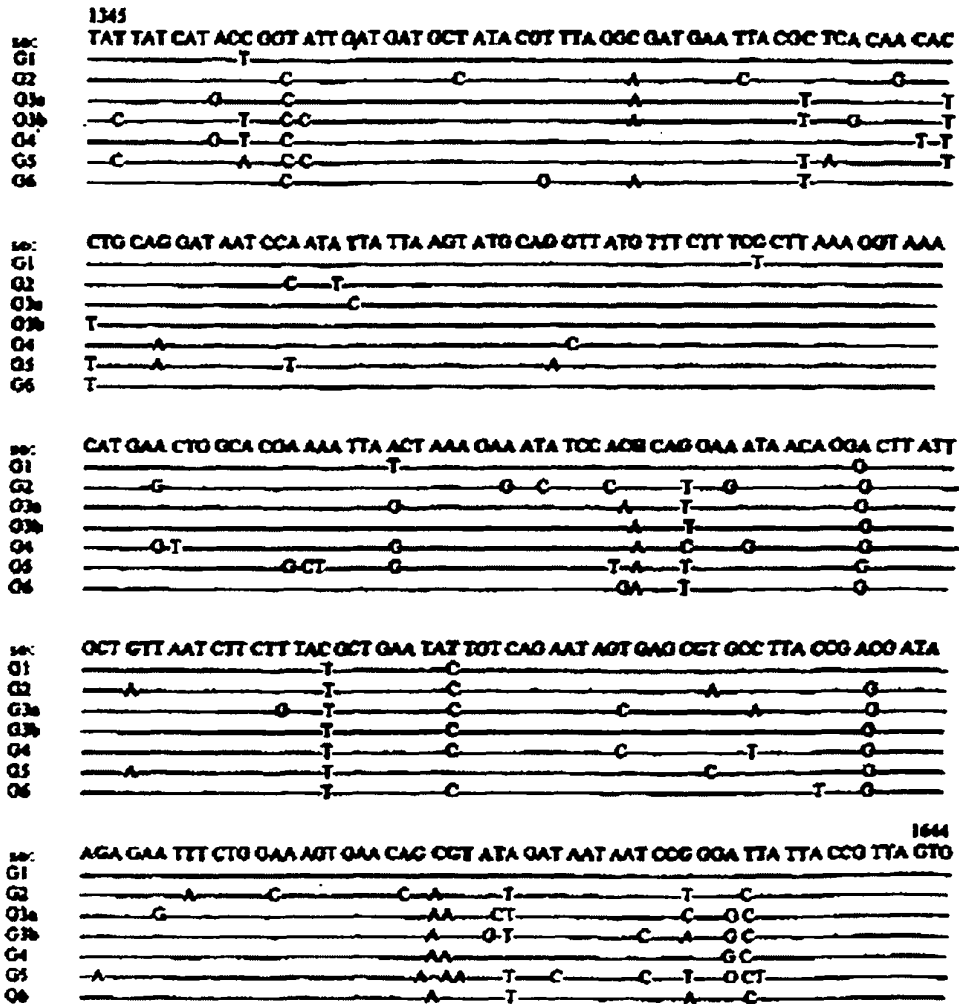


figura 3

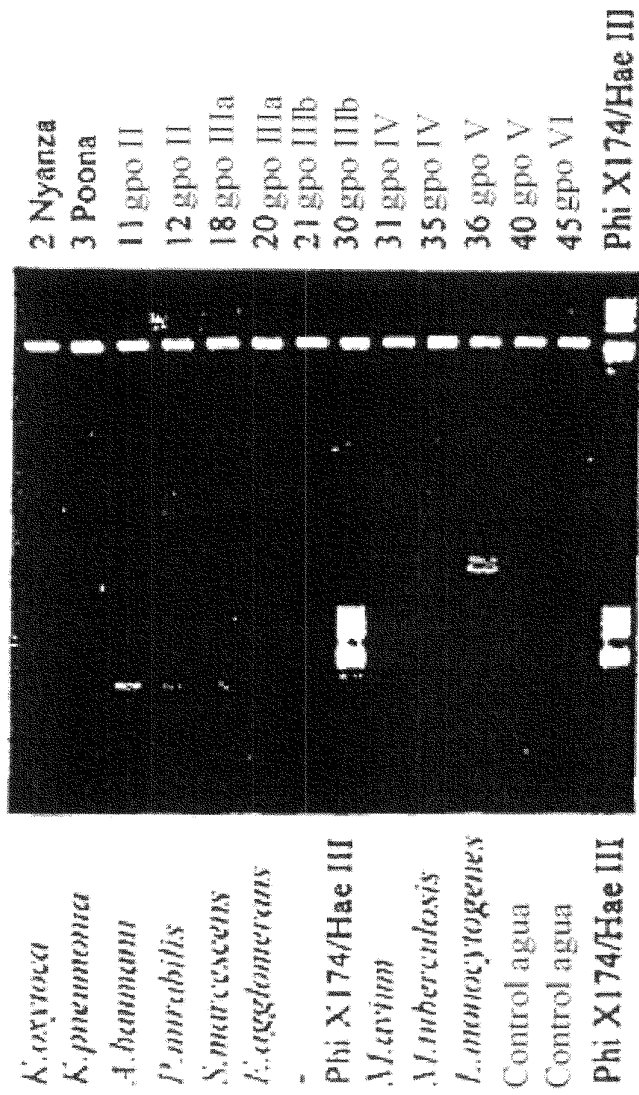


figura 4

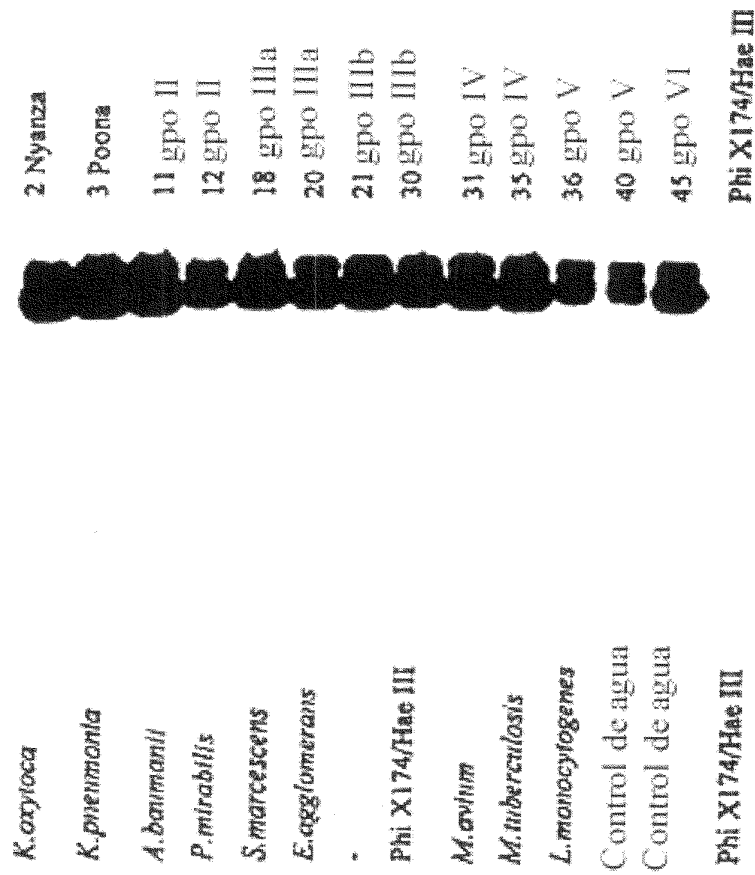


figura 5

SENSIBILIDAD





número de copias	hibridación sobre membrana	densidad óptica en microplaca
1		0,020
5		0,351
10		1,912
50		3,123
100		3,200
Control de agua		0,021

figura 6

Localización de los cebadores y de las sondas en la
secuencia del gen IagA

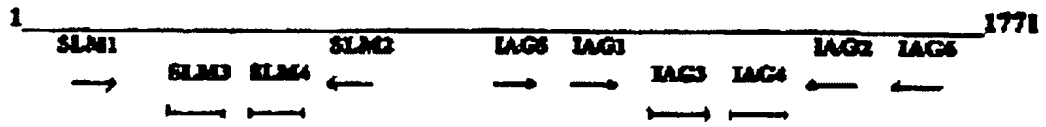


figura 7