



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 370 850**

② Número de solicitud: 201030856

⑤ Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**C12N 1/20** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **02.06.2010**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **23.12.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**23.12.2011**

⑰ Solicitante/s:  
**Universidade de Santiago de Compostela  
CITT-Centro de Innovación e Transferencia de  
Tecnoloxía  
Edificio EMPRENDIA-Campus Sur  
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES**

⑱ Inventor/es: **Guarddon García, Mónica;  
Miranda López, José Manuel;  
Franco Abuín, Carlos Manuel;  
Martínez Ruiz, Beatriz;  
Vázquez Belda, Beatriz y  
Cepeda Sáez, Alberto**

⑳ Agente: **Arias Sanz, Juan**

⑳ Título: **Métodos y reactivos para la detección y cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclinas.**

㉑ Resumen:

Métodos y reactivos para la detección y cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclinas.

Se describe un método *in vitro* para la detección y cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclinas mediante una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa empleando cebadores específicos para el gen de resistencia a tetraciclina A (*tetA*). De aplicación en la detección y cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclina en muestras ambientales, alimentarias, biológicas y clínicas.

ES 2 370 850 A1

## DESCRIPCIÓN

Métodos y reactivos para la detección y cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclinas.

### 5 Campo de la invención

La invención se relaciona con métodos *in vitro* para la detección y cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclinas mediante una reacción de amplificación empleando cebadores específicos para una región del gen de resistencia a tetraciclina A (*tetA*). Dichos métodos son útiles en la detección y cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclina en muestras ambientales, alimentarias, biológicas, clínicas, etc. La invención también se relaciona con un kit para la puesta en práctica de dichos métodos.

### 15 Antecedentes de la invención

Tras diversas décadas de uso de agentes antimicrobianos, se está empezando a observar la aparición de diversos patógenos multiresistentes (Martínez, J. L., *et al.* 2009. FEMS Microbiol. Rev. 33:44-65). Este aspecto es muy importante en producción animal ya que depende del uso de altas cantidades de agentes antimicrobianos para el control de enfermedades, lo que proporciona condiciones favorables para la aparición y diseminación de bacterias resistentes a estos agentes (Aarestrup, F. M. 2005. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 96:271-281). Se han realizado diferentes estudios (Aarestrup, F. M. 2005. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 96:271-281; White, D. G. 2006. Antimicrobial resistance in pathogenic *Escherichia coli* from animals. In F. M. Aarestrup (ed.), Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin, 1st ed. ASM Press, Washington, DC. 145-166) en donde se detalla el riesgo que estas bacterias resistentes suponen para la salud humana, puesto que algunas de estas cepas bacterianas acaban siendo intratables con este tipo de fármacos.

Las tetraciclinas son agentes de amplio espectro que presentan una actividad fundamentalmente bacteriostática y bactericida, en dosis elevadas, frente a un gran número de bacterias gram negativas y positivas. Debido a dicho efecto antimicrobiano, su uso se ha extendido mucho en la terapia de infecciones de animales. Sin embargo, parece que este uso generalizado es la causa de la selección de organismos resistentes (Chopra, I. & M. Roberts. 2001. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 65:232-260).

Los genes que codifican la resistencia a tetraciclinas son transmisibles entre diferentes bacterias pero también desde bacterias de animales de producción a bacterias de los humanos (Aarestrup, F. M. 2005. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 96:271-281). Así, los determinantes de resistencia a tetraciclina se han extendido entre especies de bacterias identificándose más de 39 especies de bacterias gram negativas y 23 especies de gram positivas (Chopra, I. & M. Roberts. 2001. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 65:232-260).

En el estado de la técnica existen diversos métodos para la cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclinas basados en la detección de diferentes genes. A modo ilustrativo, se ha descrito un método para la detección de bacterias gram negativas resistentes a tetraciclina de diferentes muestras obtenidas de comida de animales y aguas residuales usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y pruebas para los determinantes *tetA*, *tetB* y *tetC*, *tetG* y *tetM*, *O*, *P*, *Q*, *S*, *T* y *W* (Yú Z. *et al.* 2005 Appl. Environ. Microbiology. p. 6926-6933). Sin embargo, con este método es necesario realizar múltiples pruebas para cuantificar diferentes especies de bacterias.

Por tanto, existe la necesidad de desarrollar un método de detección de bacterias resistentes a tetraciclina que permita detectar un gran número de especies, subespecies y serovariantes de este tipo de bacterias que sea, a la vez, eficaz, sensible, rápido y económico.

### 50 Compendio de la invención

Los inventores han diseñado diversas parejas de cebadores y sondas que amplifican una región del gen *tetA* muy conservada entre diferentes especies de géneros, e incluso a nivel de variante, de bacterias resistentes a tetraciclinas, lo que permite la detección específica de microorganismos resistentes a tetraciclinas, y, en particular, la detección de múltiples especies y serovariantes de bacterias resistentes a tetraciclinas con un único ensayo. La secuencia identificada por los inventores aparece en múltiples especies de bacterias resistentes a tetraciclinas (Figuras 3 y 4). El empleo de cebadores que amplifican dicha región, en particular, unos cebadores que hibridan con los extremos de dicha región, permite cuantificar en muestras de alimentos las unidades formadoras de colonia con una sensibilidad de hasta 50 ufc/g (unidades formadoras de colonia/gramo) en cultivo puro y de  $5 \times 10^2$  ufc/g en carne y pescado (Figuras 6 y 7).

En un aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para la detección de bacterias resistentes a tetraciclina en una muestra que presenta las características del método identificado en esta descripción como “método 1 de detección de la invención” [véase más adelante].

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para la detección de bacterias resistentes a tetraciclina en una muestra que presenta las características del método identificado en esta descripción como “método 2 de detección de la invención” [véase más adelante].

## ES 2 370 850 A1

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para la cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclina en una muestra que presenta las características del método identificado en esta descripción como “método 1 de cuantificación de la invención” [véase más adelante].

5 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para la cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclina en una muestra que presenta las características del método identificado en esta descripción como “método 2 de cuantificación de la invención” [véase más adelante].

10 En otro aspecto, la invención se relaciona con un oligonucleótido seleccionado del grupo de oligonucleótidos formado por los oligonucleótidos cuyas secuencias de nucleótidos se muestran en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y sus combinaciones.

15 En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit adecuado para la puesta en práctica de los métodos previamente mencionados. El empleo de dicho kit para la detección y/o cuantificación de bacterias resistentes a las tetraciclinas constituye un aspecto adicional de la presente invención.

### Breve descripción de las figuras

20 Figura 1. Parte de la secuencia del gen *tetA*. Subrayada aparece la secuencia entre los nucleótidos 592 y 884 (dichos nucleótidos aparecen señalados en negrita). Los cebadores aparecen marcados. La sonda utilizada para el PCR tiempo real aparece marcada y en negrita.

25 Figura 2. Secuencia del gen *tetB*. Subrayada aparece la secuencia entre los nucleótidos 75 y 400 (dichos nucleótidos aparecen señalados en negrita). Los cebadores aparecen marcados. La sonda utilizada para el PCR tiempo real aparece marcada y en negrita.

30 Figura 3. Alineamiento de diferentes secuencias de genes de resistencia a tetraciclina A de diferentes especies (número de secuencia indicado a la izquierda de cada secuencia) donde se puede observar la similitud entre las secuencias. La flecha indica el nucleótido 884 de la Figura 1.

35 Figura 4. Alineamiento de diferentes secuencias de genes de resistencia a tetraciclina B de diferentes especies (número de secuencia indicado a la izquierda de cada secuencia) donde se puede observar la similitud entre las secuencias. La flecha indica el nucleótido 400 de la Figura 2.

Figura 5. Análisis en PCR tiempo real del ADN extraído a partir de diluciones seriadas de un cultivo puro de *Escherichia coli* BM13 (C600 Rif<sup>R</sup>/RP4 (*tetA*) (◆) y de *Escherichia coli* NCTC 50365 (*tetB*) (■). Los valores del ciclo umbral se representan frente a la concentración de unidades formadoras de colonias.

40 Figura 6. Análisis en PCR tiempo real del ADN extraído a partir de diluciones seriadas de una muestra de carne inoculada con *Escherichia coli* BM13 (C600 Rif<sup>R</sup>/RP4 (*tetA*) (◆) y de *Escherichia coli* NCTC 50365 (*tetB*) (■). Los valores del ciclo umbral se representan frente a la concentración de unidades formadoras de colonias.

45 Figura 7. Análisis en PCR tiempo real del ADN extraído a partir de diluciones seriadas de una muestra de pescado inoculado con *Escherichia coli* BM13 (C600 Rif<sup>R</sup>/RP4 (*tetA*) (◆) y de *Escherichia coli* NCTC 50365 (*tetB*) (■). Los valores del ciclo umbral se representan frente a la concentración de unidades formadoras de colonias.

50 Figura 8. Comparación entre el recuento en placa, en muestras de carne, de *Enterobacteriaceae* en Violet Red Bile agar con Glucosa (VRBG) con tetraciclina y el recuento por PCR cuantitativa de la microbiota total con los genes de resistencia *tetA* y *tetB*.

55 Figura 9. Comparación entre el recuento en placa, en muestras de pescado, de la microbiota aerobia mesófila en Plate Count Agar (PCA) con tetraciclina y el recuento por PCR cuantitativa de la microbiota total con los genes de resistencia *tetA* y *tetB*.

### Descripción detallada de la invención

60 En un aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para la detección de bacterias resistentes a tetraciclina en una muestra, en adelante “método 1 de detección 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 la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, y

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

Las “*tetraciclinas*” constituyen un grupo de antibióticos, unos naturales y otros obtenidos por semisíntesis, que abarcan un amplio espectro en su actividad antimicrobiana. Químicamente son derivados de la naftacenocarboxamida policíclica, que posee un núcleo tetracíclico, de donde deriva el nombre del grupo. Las tetraciclinas naturales se extraen de bacterias del género *Actinomyces*. Del *Streptomyces aureofaciens* se extraen la clortetraciclina y la demetil-clortetraciclina. La oxitetraciclina se extrae a partir del *Streptomyces rimosus*. La tetraciclina, representante genérico del grupo, se puede extraer del *Streptomyces viridifaciens*, aunque también se puede obtener de forma semisintética a partir de clortetraciclina. La democlociclina se obtiene a partir de una mutación de una cepa de *Streptomyces aureofaciens*. Otros derivados sintéticos incluyen la metaciclina, doxiciclina, minociclina, limeciclina, etc.

En la presente invención, la expresión “*bacterias resistentes a tetraciclina*” incluye cualquier bacteria en la que al menos una tetraciclina no ejerce sobre dicha bacteria ni un efecto bacteriostático (es decir, no detiene el crecimiento de la bacteria en cuestión) ni un efecto bactericida (es decir, no la mata). Una bacteria puede ser resistente a un tipo específico de tetraciclina o a varias de ellas al mismo tiempo.

Los mecanismos por los que las tetraciclinas ejercen su función bacteriostática o bactericida implican desacoplar la fosforilación oxidativa de las bacterias, provocar una inhibición de la síntesis proteica en el ribosoma de la bacteria inhibiendo la síntesis proteica al unirse a la subunidad 30S del ribosoma y no permitir la unión del ácido ribonucleico de transferencia (tRNA) a este, ni el transporte de aminoácidos hasta la subunidad 50S, o alterar la membrana citoplasmática, permitiendo la salida de componentes intracelulares.

La resistencia a la tetraciclina está mediada por diferentes genes que pueden estar codificados en diversos elementos genéticos tales como, plásmidos, transposones e integrones. La resistencia a tetraciclina puede ser debida a la disminución de la acumulación intracelular de tetraciclinas por bombeo activo asociado a la membrana (eflujo). Otro tipo de resistencia es debido a la presencia de proteínas de protección ribosomal que permiten actuar al aminoacil-ARN-transfer en presencia de tetraciclinas.

En una realización particular, la resistencia es debida a la disminución de la acumulación intracelular de tetraciclinas por bombeo activo asociado a la membrana. Se conocen diversos genes que codifican proteínas implicadas en el bombeo de tetraciclinas. Entre ellos se encuentran los genes *tet* que codifican bombas de flujo.

En una realización particular, las bacterias resistentes a tetraciclina son bacterias gram negativas. En otra realización particular, las bacterias resistentes a tetraciclina son bacterias patógenas, especialmente bacterias patógenas que causan una enfermedad derivada de la ingestión de alimentos infectados con dichas bacterias en animales, en particular, en humanos.

En otra realización particular, las bacterias resistentes a tetraciclina pertenecen a los géneros *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Edwardsiella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Laribacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Yersinia*, etc.; en otra realización más particular, dichas bacterias resistentes a tetraciclina son bacterias patógenas pertenecientes a dichos géneros, en particular, bacterias patógenas que causan una enfermedad derivada de la ingestión de alimentos infectados con dichas bacterias en animales, en particular, en humanos.

Por bacterias “*patógenas*” se entiende bacterias que pueden causar enfermedades infecciosas en el huésped. En materia de alimentación, las bacterias patógenas son las que, si se encuentran presentes en los alimentos, pueden originar las intoxicaciones y toxi-infecciones alimentarias. Así, en la presente invención, la expresión “*enfermedades derivadas de la ingestión de alimentos infectados*”, incluye aquellas enfermedades originadas por el consumo de alimentos infectados por agentes contaminantes (entre los que se encuentran las bacterias resistentes a tetraciclina) en cantidades tales que pueden afectar a la salud. Las enfermedades derivadas de la ingestión de alimentos infectados con tales agentes contaminantes se pueden dividir en:

- Enfermedades causadas por infecciones: son enfermedades provocadas por el consumo de alimentos que contienen microorganismos vivos perjudiciales, tales como la salmonelosis (*Salmonella* sp.), la campilobacteriosis (*Campylobacter* sp.), la infección causada por *Shigella* sp., la infección causada por *Listeria monocytogenes*, etc.;
- Enfermedades causadas por intoxicaciones: son enfermedades causadas por la ingestión de toxinas formadas en tejidos de plantas o animales, o de productos metabólicos de microorganismos en los alimentos, o por sustancias químicas que se incorporan a ellos de modo accidental o intencional desde su producción hasta su consumo. Este tipo de enfermedades sucede cuando las toxinas bacterianas están presentes en los alimentos ingeridos. Estas toxinas no producen olores ni sabores pero son capaces de causar daño aun después de ser eliminado el microorganismo. Ejemplos ilustrativos incluyen la intoxicación causada por la toxina estafilocócica (*Staphylococcus aureus*), la intoxicación causada por *Bacillus cereus*, etc.; y
- Toxi-infecciones: son enfermedades que resultan de la ingestión de alimentos con una cierta cantidad de microorganismos causantes de enfermedades, los cuales son capaces de producir o liberar toxinas una vez que son ingeridos. Ejemplos ilustrativos incluyen el cólera (*Vibrio cholerae*), la toxi-infección causada por *Clostridium perfringens* (según el tipo de toxina que produzca puede causar enfermedades en humanos o en animales), las infecciones producidas por toxinas de *Escherichia coli*.

## ES 2 370 850 A1

En una realización particular y preferida, las bacterias resistentes a tetraciclina se seleccionan del grupo de bacterias formado por *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas punctata*, *Aeromonas salmonicida*, *Edwardsiella tarda*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Laribacter hongkongensis*, *Pseudomonas* sp., *Salmonella enterica*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Vibrio* sp. y *Yersinia ruckeri*. En otra realización particular, dichas bacterias resistentes a tetraciclina son bacterias de la especie *Salmonella enterica* pertenecientes a distintas subespecies (*subsp.*), por ejemplo, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Brandenburg*, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Cholerasuis*, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Dublin*, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Kentucky*, etc.

Las bacterias resistentes a tetraciclina son microorganismos ampliamente distribuidos que pueden sobrevivir en multitud de ambientes distintos, por lo que para la puesta en práctica de los métodos de detección y cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclina proporcionados por la presente invención puede emplearse cualquier tipo de muestra susceptible de contener dichas bacterias o sospechosa de contaminación por dichas bacterias resistentes a tetraciclina.

El término “muestra”, tal como aquí se utiliza, incluye cualquier tipo de material que pueda contener bacterias resistentes a tetraciclina, incluyendo muestras ambientales, alimentarias, biológicas, clínicas, etc., por ejemplo, muestras procedentes de procesos industriales, e.g., industrias papeleras, alimentarias (tal como, por ejemplo, industrias aceiteras, cerveceras, heladeras, etc.), petroleras, etc.; muestras procedentes del tratamiento de aguas residuales; muestras procedentes de la manipulación de fluidos biológicos en el entorno sanitario, e.g., sistemas de perfusión entéricos, sistemas de diálisis, catéteres, etc.; muestras biológicas (e.g., tejidos, células, extractos celulares, homogeneizados celulares, fluidos biológicos tales como sangre, suero, plasma, orina, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, heces, sudor, etc.), etc. En una realización particular, dicha muestra es una muestra alimentaria, por ejemplo, una muestra de un producto alimentario perecedero, una muestra de un producto cárnico o derivado del mismo, o una muestra de pescado o un derivado del mismo, una muestra de productos alimenticios que contienen huevo y sus derivados, productos lácteos y sus derivados, huevos, cremas, etc. Alternativamente, la muestra puede consistir en un órgano entero, e.g., músculo, ojo, piel, gónadas, nódulos linfáticos, corazón, cerebro, pulmón, hígado, riñón, bazo, tumores, etc. En una realización particular, la muestra utilizada para llevar a cabo los métodos de detección y cuantificación proporcionados por esta invención, es una muestra ambiental (e.g., una muestra de agua, tierra, etc.), una muestra biológica (e.g., fluidos biológicos, heces, etc.), una muestra alimentaria (e.g., productos alimentarios perecederos, carnes, pescados, huevos, cremas, etc.).

Tal como aquí se utiliza, la expresión “ácido nucleico”, se refiere a un polímero formado por la repetición de unos monómeros llamados nucleótidos, unidos mediante enlaces fosfodiéster. Existen 2 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, tal como aquí se utiliza, la expresión “preparación de ácidos nucleicos” incluye el conjunto de ácidos nucleicos presentes en la preparación que va a ser sometida a una reacción de amplificación, incluyendo ADN, ARN y/o ADNc procedente de la retrotranscripción del ARN.

En la presente invención se entiende por “ADN” o “ADN genómico” (ADNg) al material genético de los organismos vivos que controla la herencia. En el caso de las bacterias este material puede estar formando plásmidos. El término “ARN” tal como aquí se utiliza se refiere a la molécula resultado de la transcripción de una secuencia de ADN. Un “ADNc” es un ADN obtenido a partir del ARN mensajero (ARNm) por acción de la retrotranscriptasa inversa.

El experto en la materia entenderá que la detección de bacterias resistentes a las tetraciclinas a partir de ARN implica la existencia de bacterias viables en la muestra analizada. Por tanto, la puesta en práctica de cualquiera de los métodos de detección de bacterias resistentes a tetraciclina proporcionados por esta invención permite detectar no sólo bacterias resistentes a tetraciclinas viables presentes en la muestra analizada (e.g, si la muestra comprende una preparación de ácidos nucleicos que comprende ARN o ADNc obtenido a partir de ARN) sino también bacterias resistentes a tetraciclinas que estén (o hayan estado) en la muestra analizada aunque ya no sean viables (e.g, si la muestra comprende una preparación de ácidos nucleicos que comprende ADNg).

Cualquiera de los métodos de detección de bacterias resistentes a tetraciclina proporcionados por esta invención (método 1 de detección de la invención y método 2 de detección de la invención) incluye una etapa previa de extracción de los ácidos nucleicos de la muestra a analizar. Se conocen distintas técnicas de extracción de ácidos nucleicos, 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. Estas resinas pueden ser naturales (aluminosilicatos) como zeolitas, arcillas minerales y feldspatos, o de naturaleza sintética como óxidos metálicos hidratados (óxido de titanio hidratado), sales insolubles de metales polivalentes (fosfato de titanio), sales insolubles de heteropolisacáridos (molibdofosfato amónico), sales complejas basadas en hexacianoferratos insolubles y zeolitas sintéticas. Estas resinas poseen una elevada afinidad por los iones metálicos polivalentes y se emplean para separar los compuestos potencialmente inhibidores de la PCR presentes en la preparación de ácidos nucleicos obtenida a partir de la muestra a analizar.

## ES 2 370 850 A1

En el caso de que el ácido nucleico a 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 sílice que favorecen la adsorción del ARN, DNasas que eliminan el ADN para alcanzar un aislado de ARN de gran pureza, etc.

5 A modo ilustrativo, no limitativo, un kit comercial que reúne las características antes citadas es Nucleospin® RNA.

El método 1 de detección de la invención comprende la realización de 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 ilustrativos, no limitativos, de reacciones de amplificación incluyen 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 (RT-PCR). Una RT-PCR 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”.

En general, una reacción de amplificación requiere el empleo de una pareja de oligonucleótidos, denominados cebadores, que van a hibridar con unas regiones que permiten la amplificación de la región/secuencia diana que se quiere amplificar. En el caso concreto del método 1 de detección de la invención, la región diana a amplificar es una región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En la Figura 3 que acompaña a la presente descripción, se muestran la región del gen *tetA* de distintos géneros y especies de bacterias resistentes a tetraciclina, concretamente de (identificados mediante su código en Genbank y bacteria): AJ313332.1 *Escherichia coli* plásmido pTOJO2; CP000971.1 *Escherichia coli* SMS-3-5 plásmido pSMS35\_130; CU459141.1 *Acinetobacter baumannii*; EF679779.1 *Laribacter hongkongensis* plásmido pHLHK22; AB366441.1 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Dublin* plásmido pMAK2; AM746674.1 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Brandenburg*; pUO-SbR3 plásmido, EF633507.1 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Dublin* plásmido IncW pIE321; DQ464880.1 *Escherichia coli* aislado H14t plásmido pWSH1 Tnp; AY214164.3 *Escherichia coli* plásmido pAPEC-O2-R; AY333434.1 *Salmonella typhimurium* plásmido pU302L; AY458016.1 *Escherichia coli* plásmido pC15-1a; AF542061.1 *Salmonella enteritidis* vector de expresión pSY7K transposasa putativa; AJ517790.2 *Aeromonas salmonicida* plásmido de resistencia parcial a fármacos pRAS1; CR376602.1 *Aeromonas punctata* (*Aeromonas caviae*) HGB5 plásmido pFBAOT6; AJ634602.1 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* plásmido; AJ628353.1 *Salmonella enterica* plásmido; X61367.1 Transposon Tn1721 bacteria gram-negativa; AY509004.1 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Choleraesuis* aislado SC-B67 plásmido pSC138; EU664602.1 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Kentucky strain* 01-2100 *Salmonella* genomic island 1 variante SGI1-K1; AJ419171.1 *Escherichia coli*, AM261760.1 IncP-1alpha plásmido pBS228; DQ645594.1 vector *Shuttle* pME6032; Y608912.1 *Escherichia coli* plásmido pFL129; L29404.1 *Escherichia coli*; AF534183.1 *Shigella sonnei* plásmido pSS4; AF502943.1 *Shigella sonnei* plásmido pSSTAV; AF497970.1 *Shigella sonnei* plásmido pKKTET7; AJ307714.1 *Escherichia coli*, que corresponden a la región comprendida entre los nucleótidos 592 y 884 en la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. Como entiende el experto en la materia, todas las secuencias mostradas en la Figura 3 son secuencias homólogas (que comparten una secuencia consenso) que serán detectadas al poner en práctica el método 1 de detección de la invención, permitiendo así la detección de distintos géneros/especies/serovariantes de bacterias resistentes a tetraciclina. Asimismo, el experto en la materia apreciará que el método 1 de detección de la invención es adecuado para la detección de otros géneros y cepas no recogidas en la Figura 3 siempre que la región del gen *tetA* 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 la etapa (i) del método 1 de detección de la invención, se amplifica la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.

Por tanto, en una realización particular, se amplifica la totalidad de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. Para ello, en una realización particular, en el paso (i) del método 1 de detección de la invención, se utiliza una pareja de cebadores que hibrida con los extremos de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. A modo ilustrativo, en una realización particular, uno de los cebadores de dicha pareja de cebadores hibrida con una región que comprende el nucleótido 592 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1; en otra realización particular, uno de los cebadores de dicha pareja

## ES 2 370 850 A1

de cebadores hibrida con una región que comprende el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1; y, en otra realización particular, uno de los cebadores de dicha pareja de cebadores hibrida con una región que comprende el nucleótido 592 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y el otro de los cebadores de dicha pareja de cebadores hibrida con una región que comprende el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. Por tanto, en una realización particular, el producto de amplificación comprende, o está formado por, la región comprendida entre los nucleótidos 592 y 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.

En otra realización particular, se amplifica una parte (fragmento) de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, tal como un fragmento de dicha región que comprende 250 nucleótidos o menos, preferentemente 200 nucleótidos o menos, más preferentemente 150 nucleótidos o menos, aún más preferentemente 100 nucleótidos o menos, y, todavía aún más preferentemente, 75 nucleótidos o menos. Así, en otra realización particular, el producto de amplificación comprende, o está formado por, la región comprendida entre los nucleótidos 688 y 739 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.

En una realización particular, la amplificación de dicha región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 688 y el nucleótido 739 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 se lleva a cabo mediante el empleo de una pareja de cebadores formada por un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3.

Adicionalmente, la reacción de amplificación se puede llevar a cabo empleando un sistema de amplificación que permite eliminar la contaminación con amplificadores provenientes de anteriores ciclos de amplificación. Este es el caso, por ejemplo, del máster de amplificación AmpErase<sup>®</sup> uracil-N-glicosidasa. 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.

Una vez llevada a cabo la reacción de amplificación es necesario detectar los productos de amplificación o amplicones [etapa (ii) del método 1 de detección de la invención]. Las técnicas para detectar los productos de amplificación están ampliamente descritas en el estado de la técnica, como por ejemplo, en Sambrook *et al.*, 2001 (citado *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 (e.g., con un fluoróforo), tinción (e.g., tinción de plata, con agentes intercalantes, tales como bromuro de etidio, SYBR Green<sup>®</sup>, etc.), etc.

Como es conocido del estado de la técnica, si el método de amplificación elegido es una RT-PCR, 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 21, SYTO 59, SYTOX, SYTO BC, DAPI, Hoechst 33342, Hoechst 33258, y PicoGreen. Preferiblemente, se utiliza SYBR Green<sup>®</sup> que se excita a 497 nm y emite a 520 nm.

Por tanto, en una realización particular, la detección del producto de amplificación se lleva a cabo mediante un agente intercalante fluorescente tal como se ha mencionado previamente; en una realización todavía más particular, dicho agente intercalante es SYBR Green<sup>®</sup>.

Tal como aquí se utiliza, el término “fluoróforo” se refiere 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 a 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.

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 *quencher*s (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.

Ejemplos ilustrativos pero no limitativos de marcadores fluorescentes que pueden ser usados en el contexto de los mecanismos de detección específicos se incluyen en la Tabla 1.

# ES 2 370 850 A1

TABLA 1

*Colorantes fluorescentes comúnmente empleados*

Molécula	Longitud de onda de excitación (nm)	Longitud de onda de 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

Tal como aquí se utiliza, un “quencher” es una molécula que acepta energía de un fluoróforo y la disipa en forma de calor o fluorescencia. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de quenchers incluyen Methyl Red, ElleQuencher, Dabcyl, Dabsyl, TAMRA, etc.

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 desapareamiento). 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, muestra el uso de dichas moléculas MGB.

En una realización particular, el producto de amplificación es detectado mediante el uso de una sonda que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 que detecta de forma específica la región diana de *tetA* empleada en el método 1 de detección de la invención, es decir, la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.

Tal como aquí se utiliza, “la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1”, se refiere a la región o secuencia del gen *tetA* de cualquier especie o variante de bacteria resistente a tetraciclina que es homóloga a la región comprendida entre los nucleótidos 592 y 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.

Asimismo, la expresión “*secuencias homólogas*”, tal como aquí se utiliza, se refiere 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



## ES 2 370 850 A1

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 2 secuencias de polinucleótidos son idénticas en base a una comparación 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 o U) 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 3 que acompaña a la presente descripción se muestra un alineamiento múltiple de secuencias en la que pueden verse alineadas las secuencias del gen *tetA* de distintas especies de bacterias resistentes a tetraciclina cuyas secuencias del *tetA* son homólogos entre sí.

Adicionalmente, en una realización particular, se incluye un control interno de amplificación en el método 1 de detección de la invención. 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 bacterias resistentes a las tetraciclinas) no se debe a la inhibición de la *Taq* polimerasa por la presencia de sustancias inhibitoras sino 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 permite 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 la totalidad o parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.

Como se ha comentado anteriormente, existen diversos genes de resistencia a tetraciclina, por lo que la invención contempla la posibilidad de, además de detectar la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, detectar otro gen de resistencia a tetraciclina, por ejemplo, uno o más de los genes *tetB*, *tetM*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetQ*, *tetW*, especialmente el gen *tetB*.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para la detección de bacterias resistentes a tetraciclina en una muestra, en adelante “método 2 de detección 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 primera pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, y una segunda pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5, y
- (ii) detectar el producto de amplificación generado en la etapa (i).

El significado de los términos “bacterias resistentes a tetraciclina”, “tetraciclina”, “muestra” y “preparación de ácidos nucleicos” ya ha sido indicado previamente en relación con el método 1 de detección de la invención.

En la presente invención se entiende por “la región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5”, a la región o secuencia del gen *tetB* de cualquier especie o variante de bacteria resistente a tetraciclina que es homóloga a la región comprendida entre los nucleótidos 75 y 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5. El significado de “secuencias homólogas” ya ha sido indicado previamente en relación con el método 1 de detección de la invención. La homología entre 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 4 que acompaña a la presente descripción se muestra un alineamiento múltiple de secuencias en la que pueden verse alineadas las secuencias del gen *tetB* de distintas especies de bacterias resistentes a tetraciclina cuyas secuencias del gen *tetB* son homólogas entre sí.

Las diferentes técnicas de extracción de ácido nucleicos, amplificación de la región diana, detección de productos de amplificación, etc., anteriormente descritas en relación con el método 1 de detección de la invención, son aplicables al presente método 2 de detección de la invención.

## ES 2 370 850 A1

Al igual que en el método 1 de la invención, la reacción de amplificación puede llevarse a cabo en presencia de un ADN exógeno que sirva como control interno de la amplificación. Por tanto, en una realización particular, la reacción de amplificación se lleva a cabo en presencia de un ADN exógeno cuyos extremos contienen secuencias que pueden ser amplificadas usando una pareja de cebadores constituida por un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3, o, alternativamente, en presencia de un ADN exógeno cuyos extremos contienen secuencias que pueden ser amplificadas usando una pareja de cebadores constituida por un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7.

La etapa (i) del método 2 de detección de la invención comprende la obtención de (1) un primer producto de amplificación, correspondiente a la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, y de (2) un segundo producto de amplificación, correspondiente a la totalidad o una parte de la región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 70 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5.

Efectivamente, en la etapa (i) del método 2 de detección de la invención, se amplifica:

- la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y
- la totalidad o una parte de la región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 70 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5.

Por tanto, en una realización particular, se amplifica la totalidad de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 para dar lugar al primer producto de amplificación. Para ello, en una realización particular, en el paso (i) del método 2 de detección de la invención, se utiliza una primera pareja de cebadores que hibrida con los extremos de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. A modo ilustrativo, en una realización particular, uno de los cebadores de dicha primera pareja de cebadores hibrida con una región que comprende el nucleótido 592 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1; en otra realización particular, uno de los cebadores de dicha primera pareja de cebadores hibrida con una región que comprende el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1; y, en otra realización particular, uno de los cebadores de dicha primera pareja de cebadores hibrida con una región que comprende el nucleótido 592 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y el otro de los cebadores de dicha primera pareja de cebadores hibrida con una región que comprende el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. Por tanto, en una realización particular, el primer producto de amplificación comprende, o está formado por, la región comprendida entre los nucleótidos 592 y 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.

En otra realización particular, el primer producto de amplificación comprende, o está formado por, una parte (o fragmento) de la región comprendida entre los nucleótidos 592 y 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1; en este caso, se amplifica una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, tal como un fragmento de dicha región que comprende 250 nucleótidos o menos, preferentemente 200 nucleótidos o menos, más preferentemente 150 nucleótidos o menos, aún más preferentemente 100 nucleótidos o menos, y, todavía aún más preferentemente, 75 nucleótidos o menos. Así, en otra realización particular, el primer producto de amplificación comprende, o está formada por, la región comprendida entre los nucleótidos 688 y 739 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En una realización particular, la amplificación de dicha región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 688 y el nucleótido 739 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 se lleva a cabo mediante el empleo de una primera pareja de cebadores formada por un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3.

En otra realización particular, se amplifica la totalidad de la región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5 para dar lugar al segundo producto de amplificación. Para ello, en una realización particular, en el paso (i) del método 2 de detección de la invención, se utiliza una segunda pareja de cebadores que hibrida con los extremos de la región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5. A modo ilustrativo, en una realización particular, uno de los cebadores de dicha segunda pareja de cebadores hibrida con una región que comprende el nucleótido 75 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5; en otra realización particular, uno de los cebadores de dicha segunda pareja de cebadores hibrida con una región que comprende el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5; y, en otra realización particular, uno de los cebadores de dicha segunda pareja de cebadores hibrida con una región que comprende el nucleótido 75 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5 y el otro de los cebadores de dicha segunda pareja de cebadores hibrida con una región que comprende el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5. Por tanto, en una realización particular, el segundo producto de amplificación comprende, o está formado por, la región comprendida entre los nucleótidos 75 y 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5.

## ES 2 370 850 A1

En otra realización particular, el segundo producto de amplificación comprende, o está formado por, una parte (o fragmento) de la región comprendida entre los nucleótidos 75 y 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5; en este caso, se amplifica una parte de la región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5, tal como un fragmento de dicha región que comprende 250 nucleótidos o menos, preferentemente 200 nucleótidos o menos, más preferentemente 150 nucleótidos o menos, aún más preferentemente 100 nucleótidos o menos, y, todavía aún más preferentemente, 75 nucleótidos o menos. Así, en otra realización particular, el primer producto de amplificación comprende, o está formada por, la región comprendida entre los nucleótidos 118 y 172 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5. En una realización particular, la amplificación de dicha región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 118 y el nucleótido 172 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5 se lleva a cabo mediante el empleo de una segunda pareja de cebadores formada por un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7.

En una realización particular, el primer producto de amplificación comprende o está formado por la región comprendida entre los nucleótidos 592 y 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o por un fragmento de la misma, tal como el producto constituido por la región comprendida entre los nucleótidos 688 y 739 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, y el segundo producto de amplificación comprende o está formado por la región comprendida entre los nucleótidos 75 y 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5, o por un fragmento de la misma, tal como el producto constituido por la región comprendida entre los nucleótidos 118 y 172 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5.

En una realización concreta, el primer producto de amplificación comprende o está formado por la región comprendida entre los nucleótidos 688 y 739 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, y el segundo producto de amplificación comprende o está formado por la región comprendida entre los nucleótidos 118 y 172 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5.

El método 2 de detección de la invención, al igual que el método 1 de detección de la invención, permite detectar bacterias resistentes a tetraciclina. Así, en una realización particular, dichas bacterias resistentes a tetraciclina que pueden ser detectadas mediante cualquiera de dichos métodos (método 1 ó 2 de detección de la invención) son bacterias gram negativas. En otra realización particular, dichas bacterias resistentes a tetraciclina son bacterias patógenas, especialmente bacterias patógenas que causan una enfermedad derivada de la ingestión de alimentos infectados con dichas bacterias en animales, en particular, en humanos. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de bacterias resistentes a tetraciclina que pueden ser detectadas usando el método 2 de detección de la invención incluyen bacterias pertenecientes a los géneros *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Edwardsiella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Laribacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Yersinia*, etc.; preferentemente, bacterias patógenas pertenecientes a dichos géneros, en particular, bacterias patógenas que causan una enfermedad derivada de la ingestión de alimentos infectados con dichas bacterias en animales, en particular, en humanos. En una realización particular y preferida, las bacterias resistentes a tetraciclina se seleccionan del grupo de bacterias formado por *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas punctata*, *Aeromonas salmonicida*, *Edwardsiella tarda*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Laribacter hongkongensis*, *Pseudomonas sp.*, *Salmonella enterica*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Vibrio sp.* y *Yersinia ruckeri*. En otra realización particular, dichas bacterias resistentes a tetraciclina son bacterias de la especie *Salmonella enterica* pertenecientes a distintas subespecies (*subsp.*), por ejemplo, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Brandenburg*, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Cholerasuis*, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Dublin*, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Kentucky*, etc.

La reacción de amplificación del método 2 de detección de la invención se puede realizar por cualquier método convencional, conocido por el experto en la materia, tal como cualquiera de los métodos previamente mencionados en relación con el método 1 de detección de la invención; no obstante, en una realización particular, dicha reacción de amplificación se lleva a cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR). En una realización particular, la primera pareja de cebadores está constituida por un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 y la segunda pareja de cebadores está constituida por un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7.

Asimismo, la detección de los productos de amplificación generados en el método 2 de detección de la invención (primero y segundo producto de amplificación) se puede realizar por cualquier método convencional, conocido por el experto en la materia, tal como cualquiera de los métodos previamente mencionados en relación con el método 2 de detección de la invención; no obstante, en una realización particular, la detección de dichos primero y segundo productos de amplificación se lleva a cabo mediante el empleo de unas sondas marcadas apropiadas, por ejemplo, sondas que comprenden en su extremo 5' un pigmento reportero y en su extremo 3' un pigmento quencher, preferentemente, sondas que comprenden un MGB en su extremo 3'. En una realización particular y preferida, la sonda para identificar el primer producto de amplificación comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 y la sonda para identificar el segundo producto de amplificación comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 8.

## ES 2 370 850 A1

Al igual que en el método 1 de detección de la invención, en una realización particular, el método 2 de detección de la invención comprende la inclusión de un control interno de amplificación. De este modo, es posible llevar a cabo la amplificación en presencia de un ADN exógeno cuyos extremos contienen secuencias que pueden ser amplificadas usando los mismos cebadores que los usados para amplificar la totalidad o una parte de una región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y/o un ADN exógeno cuyos extremos contienen secuencias que pueden ser amplificadas usando los mismos cebadores que los usados para amplificar la totalidad o una parte de una región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para la cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclina en una muestra, en adelante “*método 1 de cuantificación de la invención*”, basado en el método 1 de detección 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 la totalidad o una parte de una la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1,
- (ii) detectar el producto de amplificación generado en la etapa (i), y, adicionalmente
- (iii) cuantificar las bacterias resistentes a tetraciclina.

Las etapas (i) y (ii) del método 1 de cuantificación de la invención corresponden a las etapas (i) y (ii) del método 1 de detección de la invención por lo que todo lo mencionado en relación con dicho método 1 de detección de la invención es aplicable al método 1 de cuantificación de la invención.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “cuantificación” se refiere a la determinación del número de bacterias presentes en la muestra ensayada. La cuantificación puede ser relativa o absoluta. La cuantificación relativa no requiere estándares con concentraciones determinadas y se basa en la comparación de las intensidades de detección de dos o más muestras obtenidas usando el método 1 de detección de la invención y comparando dichas intensidades con valores de referencia fijados tales como, por ejemplo, la cantidad de muestra de partida o un gen de referencia (o “*housekeeping gene*”). Así, a modo ilustrativo, no limitativo, se puede determinar en dos muestras de igual peso la que tiene una mayor intensidad de señal obtenida en la etapa (ii) del método 1 de detección de bacterias; o bien se puede realizar la comparación con genes de referencia (“*housekeeping genes*”), tales como actina, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), etc., detectados en la muestra paralelamente a los genes de resistencia a tetraciclina, e.g., *tetA*, *tetB*, etc.

En una realización particular y preferida, usando la metodología proporcionada por esta invención, es posible realizar la cuantificación absoluta de las bacterias resistentes a tetraciclina en una muestra; para ello se pueden determinar, a modo ilustrativo, no limitativo, las unidades formadoras de colonia (ufc) presentes en la muestra. Así, el método 1 de cuantificación de la invención comprende, adicionalmente, las siguientes etapas:

- a) efectuar diluciones seriadas de unidades formadoras de colonias de un microorganismo control que posee un plásmido que codifica para el gen de resistencia a tetraciclina *tetA*,
- b) realizar una curva patrón de las diluciones obtenidas en la etapa a) empleando una pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1,
- c) determinar las unidades formadoras de colonias relacionando el resultado de la cuantificación obtenido en la etapa (iii) del método 1 de cuantificación de la invención con la curva patrón obtenida en la etapa b).

La primera etapa adicional [etapa a)] comprende efectuar diluciones seriadas de unidades formadoras de colonias de un microorganismo control que posee un plásmido que codifica para el gen de resistencia a tetraciclina *tetA*. Aunque prácticamente cualquier microorganismo que posee un plásmido que codifica para el gen de resistencia a tetraciclina *tetA* puede ser utilizado como microorganismo control en la etapa a), en una realización particular dicho microorganismo es la cepa *Escherichia coli* BM13 (C600 RifR)/RP4. Dicha etapa puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia. En una realización particular, la generación de diluciones seriadas de unidades formadoras de colonias se lleva a cabo de manera que se defina el número de unidades formadoras de colonias por unidad de volumen en cada una de las diluciones.

La segunda etapa adicional [etapa b)] consiste en realizar una curva patrón de las diluciones obtenidas en la etapa a) utilizando una pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. Esta etapa puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia. En una realización particular, se prepara la curva patrón utilizando los mismos métodos descritos anteriormente para la amplificación de la región

## ES 2 370 850 A1

comprendida entre los nucleótidos 592 y el nucleótido 884 en la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En el Ejemplo 1, apartados “Ensayos cuantitativos” y “Preparación de las muestras para la preparación de ensayos de sensibilidad”, se describe una forma particular de realizar una curva patrón para la determinación de las unidades formadoras de colonias.

5

Finalmente, en la tercera etapa adicional [etapa c)], se determinan las unidades formadoras de colonias en la muestra analizada relacionando el resultado obtenido en la cuantificación [etapa (iii) del método 1 de cuantificación de la invención] con la curva patrón obtenida en la etapa b).

10

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para la cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclina en una muestra, en adelante “*método 2 de cuantificación de la invención*”, basado en el método 2 de detección de la invención, que comprende:

15

(i) realizar una reacción de amplificación a partir de una preparación de ácidos nucleicos derivada de dicha muestra empleando una primera pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, y una segunda pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5,

20

(ii) detectar los productos de amplificación generados en la etapa (i), y

(iii) cuantificar las bacterias resistentes a tetraciclina.

25

Las etapas (i) y (ii) del método 2 de cuantificación de la invención corresponden a las etapas (i) y (ii) del método 2 de detección de la invención por lo que todo lo mencionado en relación con dicho método 2 de detección de la invención es aplicable al método 2 de cuantificación de la invención.

30

En una realización particular y preferida, usando la metodología proporcionada por esta invención, es posible realizar la cuantificación absoluta de las bacterias resistentes a tetraciclina en una muestra; para ello se pueden determinar, a modo ilustrativo, no limitativo, las unidades formadoras de colonia (ufc) presentes en la muestra. Así, el método 2 de cuantificación de la invención comprende, adicionalmente, las siguientes etapas:

35

a) efectuar diluciones seriadas de unidades formadoras de colonias de un microorganismo control que posee un plásmido que codifica para el gen de resistencia a tetraciclina *tetA*,

40

b) realizar una curva patrón de las diluciones obtenidas en la etapa a) empleando una pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1,

c) realizar diluciones seriadas de unidades formadoras de colonia de un microorganismo control que posee un plásmido que codifica para el gen de resistencia a tetraciclina *tetB*,

45

d) realizar una curva patrón de las diluciones obtenidas en la etapa c) empleando una pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5, y

50

e) determinar las unidades formadoras de colonias relacionando el resultado de la cuantificación obtenida en la etapa (iii) del método 2 de cuantificación de la invención con las curvas patrón obtenidas en las etapas b) y d).

55

Aunque prácticamente cualquier microorganismo que posee un plásmido que codifica para el gen de resistencia a tetraciclina *tetA* puede ser utilizado como microorganismo control en la etapa a) y cualquier microorganismo que posee un plásmido que codifica para el gen de resistencia a tetraciclina *tetB* puede ser utilizado como microorganismo control en la etapa c), en una realización particular el microorganismo control que posee un plásmido que codifica para el gen de resistencia a tetraciclina *tetA* es la cepa *Escherichia coli* BM13 (C600 RifR)/RP4 y el microorganismo control que posee un plásmido que codifica para el gen de resistencia a tetraciclina *tetB* es *Escherichia coli* NCTC 50365.

60

65

La primera etapa adicional [etapa a)] comprende efectuar diluciones seriadas de unidades formadoras de colonias de un microorganismo control que posee un plásmido que codifica para el gen de resistencia a tetraciclina *tetA*, tal como, por ejemplo, *Escherichia coli* BM13 (C600 RifR)/RP4. Esta etapa puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia. En una realización particular, la generación de diluciones seriadas de unidades formadoras de colonias se lleva a cabo de manera que se defina el número de unidades formadoras de colonias por unidad de volumen en cada una de las diluciones.

## ES 2 370 850 A1

La segunda etapa adicional [etapa b)] consiste en realizar una curva patrón de las diluciones obtenidas en la etapa a) utilizando una pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. Esta etapa puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia. En una realización particular, se prepara la curva patrón utilizando los mismos métodos descritos anteriormente para la amplificación de la región comprendida entre los nucleótidos 592 y el nucleótido 884 en la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En el Ejemplo 1, apartados “Ensayos cuantitativos” y “Preparación de las muestras para la preparación de ensayos de sensibilidad”, se describe una forma particular de realizar una curva patrón para la determinación de las unidades formadoras de colonias.

La tercera etapa adicional [etapa c)] comprende efectuar diluciones seriadas de unidades formadoras de colonias de un microorganismo control que posee un plásmido que codifica para el gen de resistencia a tetraciclina *tetB*, tal como, por ejemplo, *Escherichia coli* NCTC 50365. Esta etapa puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia. En una realización particular, la generación de diluciones seriadas de unidades formadoras de colonias se lleva a cabo de manera que se defina el número de unidades formadoras de colonias por unidad de volumen en cada una de las diluciones.

La cuarta etapa adicional [etapa d)] consiste en realizar una curva patrón de las diluciones obtenidas en la etapa c) utilizando una pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5. Esta etapa puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia. En una realización particular, se prepara la curva patrón utilizando los mismos métodos descritos anteriormente para la amplificación de la región comprendida entre los nucleótidos 75 y el nucleótido 400 en la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5. En el Ejemplo 1, apartados “Ensayos cuantitativos” y “Preparación de las muestras para la preparación de ensayos de sensibilidad”, se describe una forma particular de realizar una curva patrón para la determinación de las unidades formadoras de colonias.

Finalmente, en la quinta etapa adicional [etapa e)], se determinan las unidades formadoras de colonias en la muestra analizada relacionando el resultado obtenido en la cuantificación [etapa (iii) del método 2 de cuantificación de la invención] con las curvas patrón obtenidas en las etapas b) y d).

Para la puesta en práctica de los métodos de detección y cuantificación proporcionados por esta invención, los inventores han desarrollado un conjunto de cebadores y sondas que permiten la detección específica de bacterias resistentes a tetraciclina.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un oligonucleótido cuya secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo de oligonucleótidos cuyas secuencias de nucleótidos se muestran en la SEQ ID NO: 2 [cebador *tetA* F], SEQ ID NO: 3 [cebador *tetA* R], SEQ ID NO: 4 [sonda *tetA*], SEQ ID NO: 6 [cebador *tetB* F], SEQ ID NO: 7 [cebador *tetB* R] y SEQ ID NO: 8 [sonda *tetB*], y sus combinaciones.

Los oligonucleótidos cuyas secuencias de nucleótidos se muestran en las SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 son cebadores que pueden ser utilizados para amplificar un fragmento del gen *tetA*, tal como se menciona más abajo.

Los oligonucleótidos cuyas secuencias de nucleótidos se muestran en las SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7 son cebadores que pueden ser utilizados para amplificar un fragmento del gen *tetB*, tal como se menciona más abajo.

Los oligonucleótidos cuyas secuencias de nucleótidos se muestran en las SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 8 son sondas que pueden ser utilizadas para identificar los productos de amplificación de los genes *tetA* y *tetB*, respectivamente, amplificados por los cebadores previamente mencionados.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una pareja de oligonucleótidos seleccionada entre las parejas de oligonucleótidos formadas por:

- a) una pareja de oligonucleótidos constituida por un oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 [cebador *tetA* F] y la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 [cebador *tetA* R]; y
- b) una pareja de oligonucleótidos constituida por un oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 [cebador *tetB* F] y la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7 [cebador *tetB* R].

La primera pareja de oligonucleótidos [pareja a)] es particularmente adecuada para amplificar una parte de una región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, en particular, la región comprendida entre los nucleótidos 688 y 739 de dicha secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.

## ES 2 370 850 A1

La segunda pareja de oligonucleótidos [pareja b)] es particularmente adecuada para amplificar una parte de una región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5, en particular, la región comprendida entre los nucleótidos 118 y 172 de dicha secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5.

5

Los kits que comprenden los reactivos y agentes necesarios para la puesta en práctica de los métodos de detección y cuantificación proporcionados por esta invención constituyen aspectos adicionales de la misma.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un kit, en adelante “*kit de la invención*”, que comprende una pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En una realización particular del kit de la invención, dicha pareja de cebadores está constituida por un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3.

15

En otra realización particular, el kit de la invención comprende, además de dicha pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de una región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, una segunda pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de una región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5. En una realización particular del kit de la invención, dicha segunda pareja de cebadores está constituida por un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7.

En una realización particular, el kit de la invención comprende una primera pareja de cebadores constituida por un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3, y una segunda pareja de cebadores está constituida por un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7.

En otra realización particular, el kit de la invención comprende, además, una sonda capaz de detectar el producto de amplificación del gen *tetA* consistente en un producto que comprende la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, preferentemente entre los nucleótidos 688 y 739 de dicha secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. Así, en una realización particular, dicha sonda comprende, o está constituida por, la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4.

35

En otra realización particular, el kit de la invención comprende, además de la sonda capaz de detectar el producto de amplificación del gen *tetA*, una segunda sonda capaz de detectar el producto de amplificación del gen *tetB*, consistente en un producto que comprende la totalidad o una parte de la región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5, preferentemente entre los nucleótidos 118 y 172 de dicha secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5. En una realización particular del kit de la invención, dicha segunda sonda comprende, o está constituida por, la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 8.

En una realización particular, el kit de la invención comprende una primera sonda que comprende, o está constituida por, la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 y una segunda sonda que comprende, o está constituida por, la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 8.

En una realización particular, la sonda o sondas presentes en el kit de la invención comprende(n) en su extremo 5' un pigmento reportero y en su extremo 3' un pigmento quencher, preferentemente, un MGB en su extremo 3'.

50

En otra realización particular, el kit comprende, un agente intercalante fluorescente, tal como 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 capaces de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En otra realización particular, el kit de la invención comprende, además de dicho primer ADN exógeno, un segundo ADN exógeno cuyos extremos contienen secuencias que pueden ser amplificadas usando los mismos cebadores capaces de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5.

60

El empleo del kit de la invención constituye un aspecto adicional de esta invención. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un kit de la invención para la detección y/o cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclina en una muestra.

65

En una realización particular, dichas bacterias resistentes a tetraciclina son bacterias gram negativas. En otra realización particular, las bacterias resistentes a tetraciclina son bacterias patógenas, especialmente bacterias patógenas que causan una enfermedad derivada de la ingestión de alimentos infectados con dichas bacterias en animales, en

## ES 2 370 850 A1

particular, en humanos. Ejemplos ilustrativos, no limitativos de bacterias resistentes a tetraciclina incluyen bacterias pertenecientes a los géneros *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Edwardsiella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Laribacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Yersinia*, etc., tales como *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas punctata*, *Aeromonas salmonicida*, *Edwardsiella tarda*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Laribacter hongkongensis*, *Pseudomonas* sp., *Salmonella enterica*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Vibrio* sp., *Yersinia ruckeri*, etc. En un realización particular, dichas bacterias resistentes a tetraciclina son bacterias de la especie *Salmonella enterica* pertenecientes a distintas subespecies (*subsp.*), por ejemplo, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Brandenburg*, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Cholerasuis*, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Dublin*, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Kentucky*, etc.

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

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la invención y no pretenden ser limitativos de la misma.

### Ejemplo 1

#### *Detección y Cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclina*

##### I. Materiales y Métodos

###### *Cepas bacterianas y condiciones de cultivo*

Para realizar una curva patrón, se utilizaron dos cepas de referencia: *Escherichia coli* BM13 (C600 Rif<sup>R</sup>)/RP4 (suministrada por el Instituto Pasteur), con el determinante *tetA*, y *Escherichia coli* NCTC 50365 (suministrado por el Centro Nacional de Cultivos Tipo o NCTC), con el gen *tetB*. Ambos cultivos fueron incubados a 41°C en *Violet Red Bile agar with Glucose* (VRBG) (Liofilchem).

Tras 24 horas de incubación, las colonias aisladas se inocularon en *Brain Heart Infusion* (BHI) (Difco) a 31°C hasta su saturación, cuando ambos cultivos alcanzaron una concentración de 10<sup>9</sup> ufc/mL (unidades formadoras de colonias/ml).

###### *Aislamiento del ADN*

El ADN de cultivos puros se aisló usando *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche, Mannheim, Germany), usando el protocolo para bacterias y levaduras y siguiendo las indicaciones del fabricante. De igual manera, el ADN artificialmente inoculado a muestras de comida se aisló usando el mismo kit y protocolo. Tras la extracción, el ADN se guardó a -20°C.

###### *Secuenciación del ADN y diseño de cebadores*

Los determinantes *tetA* y *tetB* se eligieron como dianas para determinar y cuantificar los dos genes de resistencia a tetraciclinas en células gram negativas (Fan, W., *et al.* 2007. *Mol. Cell. Probes.* 21:245-256).

El plásmido pTOJO2 (*Gene bank accession number*: AJ313332.1) sirvió de modelo para comparar las distintas secuencias con otras bacterias, algunas de ellas patógenas, y el plásmido HB101 de *E. coli* NCTC 50365 sirvió como modelo para el gen *tetB*.

Se realizaron alineamientos usando el algoritmo *ClustalX* (1.81) para las siguientes secuencias de *tetA* (*Gene bank accession number*): CP000971, AB366441, AM746674, EF679779, EF633507, AY214164.3, AY333434, DQ464880, AY458016, AF542061, X61367, AJ634602, AJ628353, AY509004, EU664602, AJ419171, AY608912, AF534183, AF502943, AF497970, AJ307714, L29404, AJ517790.2, AM261760, CR376602, CU459141, DQ645594. En la Figura 3 se muestran los resultados de dicho alineamiento.

Para *tetB* se analizaron las secuencias (*Gene bank accession number*): AB089594, EF646764, AB089592, AB089587, AB089590, AB089593, AM886293, AM746675.2, AM412236, AF250878, AL513383, AB089588, AB089595, AF223162, AB089585, AF326777.3, AB366440, AJ277653, AY528506.1, V00611.1, CP001122.1, CP000602, DQ835008, DQ316139, EF467365. En la Figura 4 aparecen los resultados de dicho alineamiento.

Tras el alineamiento se seleccionó una región altamente conservada entre todas las cepas. Los cebadores y las sondas se diseñaron usando el *software* Primer Express 2.0.



## ES 2 370 850 A1

### *Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR)*

Los cebadores, sondas y el *Environmental Master Mix 2.0* (que contienen ROX como una referencia pasiva, la Taq polimerasa, así como nucleótidos y tampón necesarios) se obtuvieron de Applied Biosystems (Warrington, UK).

La cuantificación se realizó con un termociclador ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems).

Para un volumen total de reacción de 25  $\mu\text{L}$ , la mezcla reactivos consta de:

- 50 ng ADN
- 12,5  $\mu\text{L}$  *Master Mix*
- 2,25  $\mu\text{L}$  cebador directo
- 2,25  $\mu\text{L}$  cebador reverso y
- 0,5  $\mu\text{L}$  sonda TaqMan
- Agua PCR

Los cebadores (primers) y sonda Taqman diseñados para cada determinante, son los siguientes:

• *Para tetA:*

Cebador directo: CCGCGCTTTGGGTCATT (SEQ ID NO: 2)

Cebador reverso: TGGTCGCGTCCCAGTGA (SEQ ID NO: 3)

Sonda Taqman MGB: TCGGCGAGGATCG (SEQ ID NO: 4)

• *Para tetB:*

Cebador directo: AGGCGCATCGCTGGATT (SEQ ID NO: 6)

Cebador reverso: CAGCATCCAAAGCGCACTT (SEQ ID NO: 7)

Sonda Taqman MGB: CTTATTGCTGGCTTTTT (SEQ ID NO: 8)

Estos cebadores amplifican una región de 51 pb dentro del gen *tetA* y un fragmento de 55 pb en el gen *tetB*, respectivamente.

Las condiciones de trabajo son las siguientes:

- 10 minutos/95°C, para la activación de la polimerasa (1 sola vez)
- 15 segundos/95°C, para la desnaturalización del ADN, y 1 min/60°C, para las fases de anillamiento y extensión (ambas 40 ciclos).

Al introducir los datos en el termociclador se indicará la concentración en ufc/ml de cada estándar, de tal modo que al acabar la amplificación se obtendrá una relación directa de estas unidades frente a los valores de Ct del equipo.

Las muestras para las curvas patrón se realizaron por triplicado y las muestras de comida por duplicado. Se incluyeron controles negativos en todos los tests y se realizaron añadiendo todos los elementos a excepción de la muestra de ADN.

### *Ensayos cuantitativos*

Para la cuantificación, se elaboraron unas curvas patrón usando en un primer paso diluciones seriadas a partir de cultivos saturados de las cepas *E. coli* BM13 (C600 RifR)/RP4 (*tetA*) y *E. coli* NCTC 50365 (*tetB*) en el medio "*Brain Heart Infusion*" (Difco), cubriendo un rango de 1 a  $10^5$  ufc/mL determinados por medio de diferentes conteos en placas de *Agar Court* (PCA, del inglés "*Plate Court Agar*").

## ES 2 370 850 A1

En un segundo paso, se realizan diluciones seriadas de los mismos cultivos saturados mezclados con diferentes tipos de comida en cada caso, cubriendo un rango de  $10^1$  a  $10^6$  ufc/g. Se extrajo el ADN de 200  $\mu\text{L}$  de cada dilución usando el kit *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche).

### 5 *Preparación de las muestras para la preparación de ensayos de sensibilidad*

Distintas muestras de carne (pollo y pavo) y pescado (merluza) fueron inoculadas para realizar los ensayos de cuantificación en alimentos. Para la inoculación, 35 g de cada muestra fueron cortados asépticamente y añadidos a 10 315 ml de tampón de agua de peptona (Merck) en una bolsa estéril con un filtro lateral. Posteriormente, las muestras fueron homogeneizadas durante 2 minutos con un homogeneizador (AES laboratoire, Mix 2). Se rellenaron 9 tubos para cada gen de resistencia a tetraciclina con 9 ml del homogeneizado por la parte del filtro de la bolsa. De los tubos, uno fue inoculado con 1 ml de cultivo saturado de *E. coli* BM13 (C600 Rif<sup>R</sup>)/RP4, para la cuantificación del gen *tetA* y otro tubo con *E. coli* NCTC 50365, para *tetB*. El resto de tubos fue inoculado con diluciones seriadas de orden 10, cubriendo un rango de 1 a  $10^5$  ufc/mL (que corresponde a una concentración final de 10 a  $10^6$  ufc/g). Como control negativo se analizaron dos alícuotas no inoculadas.

## II. Resultados

### 20 *Especificidad del ensayo*

Se realizaron ensayos independientes para los genes *tetA* y *tetB*, por separado, usando diferentes cepas con y sin dicho gen de resistencia a tetraciclina. No se detectó la amplificación cuando se utilizaba ADN de bacterias sin el gen correspondiente. Solamente se amplificó el ADN de las bacterias que presentaban el gen correspondiente.

25

### *Sensibilidad y cuantificación del rango*

El rango de cuantificación se determinó usando cultivos puros y diferentes tipos de comida como pescado y carne. 30 Para los cultivos puros, la sensibilidad del método se determinó usando ADN insertado en plásmidos. Así, se utilizaron como muestra de DNA 200  $\mu\text{L}$  de cultivos saturados de *E. coli* BM13 (C600 Rif<sup>R</sup>)/RP4 (*tetA*) y *E. coli* NCTC 50365 (*tetB*) de diluciones decimales a partir de una dilución con una concentración de  $10^9$  ufc/mL en ambos casos.

La curva patrón de la Figura 5, muestra una relación lineal entre las ufc (log ufc input) y el Ct (del inglés “*threshold cycle*”). Para el gen *tetA*, la pendiente de la curva fue de -3,33 y el  $R^2$  (del inglés “*lineal regression coefficient*” o coeficiente de regresión lineal) fue de 0,9853. El límite de detección fue de 5 ufc/mL teóricamente (Ct 35,37), con una desviación estándar (SD) de 0,34, puesto que el volumen inicial de la extracción de ADN fue de 200  $\mu\text{L}$ . Resultados similares se obtuvieron para el gen *tetB*, en donde la pendiente de la curva fue de -2,74 y el  $R^2$  de 0,9932, calculándose así un límite de detección teórico de 50 ufc/ml (Ct 37,21, SD 0,04).

El límite mínimo de detección también fue examinado en muestras de carne y pescado, usando carne de pavo como estándar. Ambas muestras fueron inoculadas con *E. coli* con los genes *tetA* y *tetB*, tal y como se ha indicado en el apartado de Materiales y Métodos. En todos los casos se observa una relación lineal entre el “log ufc input” y el Ct. La carne inoculada con *E. coli* BM13 (C600 Rif<sup>R</sup>)/RP4 (*tetA*) (Figura 6) presentaba una pendiente de la curva de -3,2067 y un coeficiente  $R^2$  de 0,9925, por lo que el límite de detección es de  $5 \times 10^2$  ufc/g (Ct 34,52, SD 0,2). La carne de pavo inoculada con *E. coli* NCTC 50365 (*tetB*) (Figura 6) mostraba una pendiente de -3,27 y un coeficiente  $R^2$  de 0,9893, siendo así el límite de detección también de  $5 \times 10^2$  ufc/g (Ct 38,18, SD 0,9). Estos valores se aproximan al valor óptimo de -3,32 (Higuchi, R., *et al.* 1993. *Bio-Technology*. 11:1026-1030).

Por otro lado, el pescado inoculado con los mismos microorganismos mostró resultados similares, resultando para 50 *tetA* una pendiente de -2,98, un  $R^2$  de 0,9887 y un límite de  $5 \times 10^2$  ufc/g (Ct 35,00, SD 0,9), siendo estos valores similares a los recomendados por Higuchi *et al.*, (1993) citado *supra*. Para *tetB* en el pescado, la pendiente fue de -2,53 (Ct 34,88, SD 0,8), y el coeficiente  $R^2$  fue de 0,9954 (Figura 7).

### 55 *Detección y cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclina en comida*

Se analizaron 30 muestras para la detección de genes *tetA* y *tetB*: 10 muestras de carne de pavo, 10 de carne de pollo (Figura 8) y 10 muestras de merluza (Figura 9). Estas muestras sirvieron de muestra para la determinación y cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclina aisladas directamente de alimentos. Estos alimentos, procedentes de supermercados, se seleccionaron por ser una representación de productos de origen animal que son consumidos de manera habitual en nuestra sociedad y que frecuentemente están contaminados con bacterias entéricas, siendo en estas bacterias donde aparecen los genes seleccionados (Chopra, I. *et al.* 2001. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 65:232-260). La presencia de ambos genes *tetA* y *tetB* y la cuantificación de ufc se realizó tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos.

65 Como se puede ver en las Figuras 8 y 9 la cuantificación de la contaminación en muestras de comida con bacterias resistentes a tetraciclinas (en ufc/g) medida con la tecnología de la invención, se correlaciona perfectamente con la cuantificación usando técnicas de microbiología tradicionales.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para la detección y/o cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclina 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 la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, y
- (ii) detectar el producto de amplificación generado en la etapa (i).

2. Método según la reivindicación 1, que comprende además una etapa (iii) para cuantificar dichas bacterias resistentes a tetraciclina.

3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que las bacterias resistentes a tetraciclina se seleccionan de los géneros *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Edwardsiella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Laribacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio* y *Yersinia*.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dichas bacterias resistentes a tetraciclina son bacterias patógenas de humanos.

5. Método según la reivindicación 4, en el que dichas bacterias resistentes a tetraciclina se seleccionan del grupo de bacterias formado por *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas punctata*, *Aeromonas salmonicida*, *Edwardsiella tarda*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Laribacter hongkongensis*, *Pseudomonas* sp., *Salmonella enterica*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Vibrio* sp. y *Yersinia ruckeri*.

6. Método según la reivindicación 5, en el que dichas bacterias resistentes a tetraciclina son bacterias de la especie *Salmonella enterica* seleccionadas del grupo formado por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Brandenburg*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Cholerasuis*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Dublin* y *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Kentucky*.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la reacción de amplificación se lleva a cabo en presencia de un ADN exógeno cuyos extremos contienen secuencias que pueden ser amplificadas usando los mismos cebadores capaces de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, que comprende, además, las siguientes etapas:

- a) efectuar diluciones seriadas de unidades formadoras de colonias de un microorganismo control que posee un plásmido que codifica para el gen de resistencia a tetraciclina *tetA*,
- b) realizar una curva patrón de las diluciones obtenidas en la etapa a) empleando una pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, y
- c) determinar las unidades formadoras de colonias relacionando el resultado de la cuantificación obtenido en la etapa (iii) del método de cuantificación definido en la reivindicación 2 con la curva patrón obtenida en la etapa b).

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicha pareja de cebadores está constituida por un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la reacción de amplificación se lleva a cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que detección del producto de amplificación se lleva a cabo mediante el empleo de una sonda marcada.

12. Método según la reivindicación 11, en el que dicha sonda comprende en su extremo 5' un pigmento reportero y en su extremo 3' un pigmento *quencher*.

13. Método según la reivindicación 12, en el que dicha sonda comprende en su extremo 3' un MGB (*minor groove binder*).

## ES 2 370 850 A1

14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que dicha sonda comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4.

5 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 que comprende además realizar una segunda reacción de amplificación empleando una segunda pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5.

10 16. Método según la reivindicación 15, que comprende además una etapa (iii) para cuantificar dichas bacterias resistentes a tetraciclina.

15 17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16, en el que las bacterias resistentes a tetraciclina se seleccionan de los géneros *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Edwardsiella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Laribacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio* y *Yersinia*.

18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en el que dichas bacterias resistentes a tetraciclina son bacterias patógenas de humanos.

20 19. Método según la reivindicación 18, en el que dichas bacterias resistentes a tetraciclina se seleccionan del grupo de bacterias formado por *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas punctata*, *Aeromonas salmonicida*, *Edwardsiella tarda*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Laribacter hongkongensis*, *Pseudomonas* sp., *Salmonella enterica*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Vibrio* sp. y *Yersinia ruckeri*.

25 20. Método según la reivindicación 19, en el que dichas bacterias resistentes a tetraciclina son bacterias de la especie *Salmonella enterica* seleccionadas del grupo formado por *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Brandenburg*, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Cholerasuis*, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Dublin* y *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Kentucky*.

30 21. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 20, en el que la reacción de amplificación se lleva a cabo en presencia de un ADN exógeno cuyos extremos contienen secuencias que pueden ser amplificadas usando los mismos cebadores capaces de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y/o 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 de los genes *tetB* capaces de amplificar la totalidad o una parte de una región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5.

22. Método según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21, que comprende, además, las siguientes etapas:

- 40 a) efectuar diluciones seriadas de unidades formadoras de colonias de un microorganismo control que posee un plásmido que codifica para el gen de resistencia a tetraciclina *tetA*,
- b) realizar una curva patrón de las diluciones obtenidas en la etapa a) empleando una pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1,
- 45 c) realizar diluciones seriadas de unidades formadoras de colonia de un microorganismo control que posee un plásmido que codifica para el gen de resistencia a tetraciclina *tetB*,
- 50 d) realizar una curva patrón de las diluciones obtenidas en la etapa c) empleando una pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5, y
- 55 e) determinar las unidades formadoras de colonias relacionando el resultado de la cuantificación obtenida en la etapa (iii) del método de cuantificación definido en la reivindicación 16 con las curvas patrón obtenidas en las etapas b) y d).

23. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 20, en el que la primera pareja de cebadores está constituida por un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 y la segunda pareja de cebadores está constituida por un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7.

65 24. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 23, en el que dicha reacción de amplificación se lleva a cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.

## ES 2 370 850 A1

25. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 24, en el que la detección de los productos de amplificación se lleva a cabo mediante el empleo de sondas marcadas.

5 26. Método según la reivindicación 25, en el que dichas sondas comprenden en su extremo 5' un pigmento reportero y en su extremo 3' un pigmento *quencher*.

27. Método según la reivindicación 26, en el que dichas sondas comprenden en su extremo 3' un MGB.

10 28. Método según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27, en el que dicha primera sonda comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 y la segunda sonda comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 8.

15 29. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, en el que dicha preparación de ácidos nucleicos comprende ADN genómico y/o plasmídico y/o ADNc obtenido a partir del ARN.

30. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, en el que dicha muestra es una muestra ambiental, una muestra alimentaria, una muestra biológica o una muestra clínica.

20 31. Un oligonucleótido seleccionado del grupo de oligonucleótidos cuya secuencia de nucleótidos se muestra en las secuencias SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y sus combinaciones.

32. Una pareja de oligonucleótidos seleccionada entre las parejas de oligonucleótidos formadas por:

25 a) una pareja de oligonucleótidos constituida por un oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 y la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3; y

30 b) una pareja de oligonucleótidos constituida por un oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 y la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7.

35 33. Un kit que comprende una primera pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de una región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.

34. Kit según la reivindicación 33, que comprende, además, una segunda pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5.

40 35. Kit según la reivindicación 34, en el que dicha primera pareja de cebadores está constituida por un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 y la segunda pareja de cebadores está constituida por un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7.

45 36. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 33 a 35, que comprende, al menos, una primera sonda capaz de identificar el producto de amplificación, amplificado mediante una reacción de amplificación en presencia de dicha primera pareja de cebadores y, opcionalmente, una segunda sonda capaz de detectar el producto de amplificación, amplificado mediante una reacción de amplificación en presencia de dicha segunda pareja de cebadores.

50 37. Kit según la reivindicación 36, en el que dicha primera y/o segunda sonda comprende en su extremo 5' un pigmento reportero y en su extremo 3' un pigmento *quencher*.

55 38. Kit según la reivindicación 37, en el que dicha sonda comprende en su extremo 3' un MGB.

39. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 36 a 38, en el que dicha primera sonda comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 y dicha segunda sonda comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 8.

60 40. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 33 a 38, que comprende, además, un primer ADN exógeno cuyos extremos contienen secuencias que pueden ser amplificadas usando los mismos cebadores capaces de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y un segundo ADN exógeno cuyos extremos contienen secuencias que pueden ser amplificadas usando los mismos cebadores capaces de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5.

## ES 2 370 850 A1

41. Uso de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 33 a 40 para la detección y/o cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclina en una muestra.

5 42. Uso según la reivindicación 41, en el que dichas bacterias resistentes a tetraciclina se seleccionan de los géneros *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Edwardsiella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Laribacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio* y *Yersinia*.

10 43. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 41 ó 42, en el que dichas bacterias resistentes a tetraciclina son bacterias patógenas de humanos.

15 44. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 41 a 43, en el que dichas bacterias resistentes a tetraciclina se seleccionan del grupo de bacterias formado por *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas punctata*, *Aeromonas salmonicida*, *Edwardsiella tarda*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Laribacter hongkongensis*, *Pseudomonas* sp., *Salmonella enterica*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Vibrio* sp. y *Yersinia ruckeri*.

20 45. Uso según la reivindicación 44, en el que dichas bacterias resistentes a tetraciclina son bacterias de la especie *Salmonella enterica* seleccionadas del grupo formado por *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Brandenburg*, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Cholerasuis*, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Dublin* y *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Kentucky*.

25 46. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 41 a 45, en el que dicha muestra es una muestra ambiental, una muestra alimentaria, una muestra biológica o una muestra clínica.

30

35

40

45

50

55

60

65

**Figura 1**

>AJ313332

GTGAAACCCAACAGACCCCTGATCGTAATTCTGAGCACTGTCGCGCTCGAC  
GCTGTCGGCATCGGCCTGATTATGCCGGTGCTGCCGGGCCTCCTGCGCGATCTG  
GTTCACTCGAACGACGTCACCGCCACTATGGCATTCTGCTGGCGCTGTATGCG  
TTGATGCAATTTGCCTGCGCACCTGTGCTGGGCGCGCTGTCGGATCGTTTCGGGC  
GGCGGCCGGTCTTGCTCGTCTCGCTGGCCGGCGCTGCTGTGACTACGCCATCA  
TGGCGACGGCGCCTTTCCTTTGGGTTCTCTATATCGGGCGGATCGTGGCCGGCAT  
CACCGGGGCGACTGGGGCGGTAGCCGGCGCTTATATTGCCGATATCACTGATGG  
CGATGAGCGCGCGCGGCACTTCGGCTTCATGAGCGCCTGTTTCGGGTTCGGGAT  
GGTCGCGGGACCTGTGCTCGGTGGGCTGATGGGCGGTTTCTCCCCCACGGTCC  
GTTCTTCGCCGCGGCAGCCTTGAACGGCCTCAATTTCTGACGGGCTGTTTCCTT  
TTGCCGGAGTCGCACAAAGGCGAACGCCGGCCGTTACGCCGGGAGGCTCTCAA  
CCCGCTCGCTTCGTTCCGGTGGGCCCGGGGCATGACCGTCGTCGCCGCCCTGAT  
GGCGGTCTTCTTCATCATGCAACTTGTCGGACAGGTGCCGGCCCGCTTTGGGT  
CAITTCGGCGAGGATCGCTTTCAC TGGGACCGGACCACGATCGGCATTTCGCTT  
GCCGCATTTGGCATTCTGCATTCACTCGCCAGGCAATGATCACCGGCCCTGTA  
GCCGCCCGGCTCGGCGAAAGGCGGGCACTCATGCTCGGAATGATTGCCGACGG  
CACAGGCTACATCCTGCTTGCTTCGCGACACGGGGATGGATGGCGTTCCCGAT  
CATGGTCCTGCTTGCTTCGGGTGGCATCGGAATGCCGGCGCTGCAAGCAATTT  
GTCCAGGCAGGTGGATGAGGAACGTCAGGGGCAGCTGCAAGGCTCACTGGCGG  
CGCTCACCAGCCTGACCTCGATCGTCGGACCCCTCCTCTTACGGCGATCTATGC  
GGCTTCTATAACAACGTGGAACGGGTGGGCATGGATTGCAGGCGCTGCCCTCTA  
CTTGCTCTGCCTGCCGGCGCTGCGTCGCGGGCTTTGGAGCGGCGCAGGGCAACG  
AGCCGATCGCTGA

**Figura 2**

>E. coli NCTC 50365

TAACCACTTTGGCGTATTGCTTGCACTTTATGCGTTAATGCAGGTTATCTTTG  
CTCCTTGGCTTGGAAAAATGTCTGACCGATTTGGTCCGGCGCCCAGTGCTGTTGTT  
GTCATTAATAGGCCGCATCGCTGGATTACTTATTGCTGGCTTTTTCAAGTGGCT  
TTGGATGCIGTATTTAGGCCGTTTGCTTTCAGGGATCACAGGAGCTACTGGGGC  
TGTCGCGGCATCGGTCATTGCCGATACCACCTCAGCTTCTCAACGCGTGAAGTG  
GTTCCGTTGGTTAGGGGCAAGTTTTGGGCTTGGTTTAATAGCGGGGCCTATTATT  
GGTGGTTTTGCAGGAGAGATTTACCCGCATAGTCCCTTTTTTATCGCTGCGTTGC  
TAAATATTGTCACCTTTCCTTGTGGTTATGTTTTGGTTCCGTGAAACCAAAAATAC  
ACGTGATAATACAGATACCGAAGTAGGGGTTGAGACGCAATCGAATTCGGTAT  
ACATCACTTTATTTAAAACGATGCCCATTTTGTGATTATTTATTTTTCAGCGCA  
ATTGATAGGCCAAATTCCCGCAACGGTGTGGGTGCTATTTACCGAAAATCGTTT  
TGGATGGAATAGCATGATGGTTGGCTTTTCATTAGCGGGTCTTGGTCTTTTACAC  
TCAGTATTCCAAGCCTTTGTGGCAGGAAGAATAGCCACtAAATGGGGCGAAAAA  
ACGGCAGTAcTGCTCGGATTTATTGCAGATAGTAGTGCATTTGCCTTTTTAGCGT  
TTATATCTGAAGGTTGGTTAGTTTTCCCTGTTTTAATTTTATTGGCTGGTGGTGGG  
ATCKCTTACCTGCATTACAGGGAGTGATGTCTATCCAACAAAGAGTCATCAG  
CAAGGTGCTTTACAGGGATTATTGGTGAGCCTTACCAATGCAACCGGTGTTATT  
GGCCATTACTGTTTGCTGTTATTTATAATCATTCACTACCACTTTGGGATGGCT  
GGATTGATTA



Figura 3

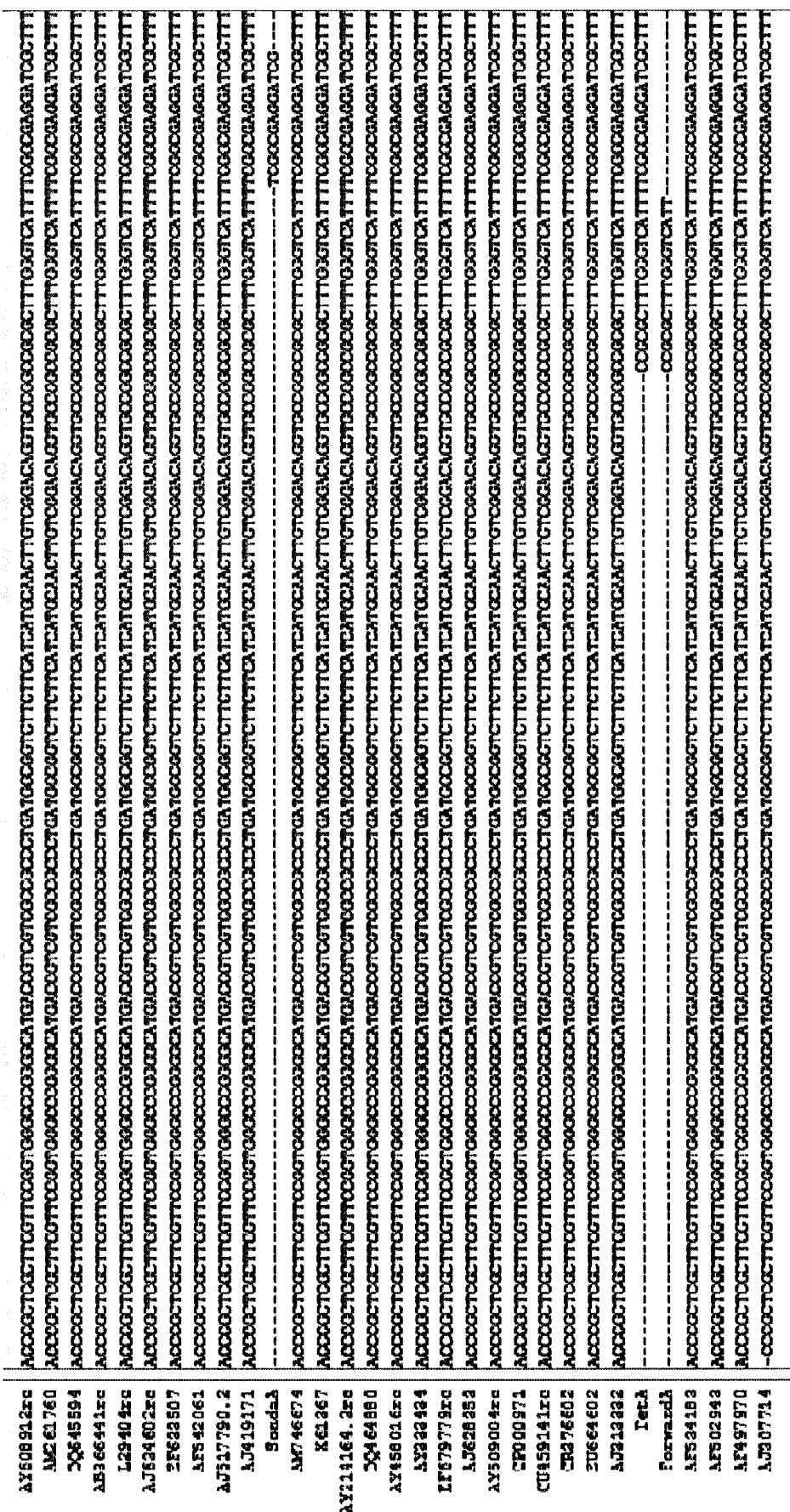






Figura 4

2B0B354	CTGACCAATTGGTCGGCCGCGTCTGTTGTTGTCATTAATTAAGCCCATGCTGGATTAAGTACCTTAATGCTGCTTTTGGATGCTGTAATTAAGCCCGTTTACTTTCAAGGATTCACAGCA
2B0B350	CTGACCAATTGGTCGGCCGCGTCTGTTGTTGTCATTAATTAAGCCCATGCTGGATTAAGTACCTTAATGCTGCTTTTGGATGCTGTAATTAAGCCCGTTTACTTTCAAGGATTCACAGCA
2B0B352	CTGACCAATTGGTCGGCCGCGTCTGTTGTTGTCATTAATTAAGCCCATGCTGGATTAAGTACCTTAATGCTGCTTTTGGATGCTGTAATTAAGCCCGTTTACTTTCAAGGATTCACAGCA
2B0B357	CTGACCAATTGGTCGGCCGCGTCTGTTGTTGTCATTAATTAAGCCCATGCTGGATTAAGTACCTTAATGCTGCTTTTGGATGCTGTAATTAAGCCCGTTTACTTTCAAGGATTCACAGCA
T00611.1	CTGACCAATTGGTCGGCCGCGTCTGTTGTTGTCATTAATTAAGCCCATGCTGGATTAAGTACCTTAATGCTGCTTTTGGATGCTGTAATTAAGCCCGTTTACTTTCAAGGATTCACAGCA
2B0B358	CTGACCAATTGGTCGGCCGCGTCTGTTGTTGTCATTAATTAAGCCCATGCTGGATTAAGTACCTTAATGCTGCTTTTGGATGCTGTAATTAAGCCCGTTTACTTTCAAGGATTCACAGCA
Caampson	CTGACCAATTGGTCGGCCGCGTCTGTTGTTGTCATTAATTAAGCCCATGCTGGATTAAGTACCTTAATGCTGCTTTTGGATGCTGTAATTAAGCCCGTTTACTTTCAAGGATTCACAGCA
2E23142	CTGACCAATTGGTCGGCCGCGTCTGTTGTTGTCATTAATTAAGCCCATGCTGGATTAAGTACCTTAATGCTGCTTTTGGATGCTGTAATTAAGCCCGTTTACTTTCAAGGATTCACAGCA
2E8-3TC-12-E	CTGACCAATTGGTCGGCCGCGTCTGTTGTTGTCATTAATTAAGCCCATGCTGGATTAAGTACCTTAATGCTGCTTTTGGATGCTGTAATTAAGCCCGTTTACTTTCAAGGATTCACAGCA
DQ88308	CTGACCAATTGGTCGGCCGCGTCTGTTGTTGTCATTAATTAAGCCCATGCTGGATTAAGTACCTTAATGCTGCTTTTGGATGCTGTAATTAAGCCCGTTTACTTTCAAGGATTCACAGCA
2M41226	CTGACCAATTGGTCGGCCGCGTCTGTTGTTGTCATTAATTAAGCCCATGCTGGATTAAGTACCTTAATGCTGCTTTTGGATGCTGTAATTAAGCCCGTTTACTTTCAAGGATTCACAGCA
AL12332x	CTGACCAATTGGTCGGCCGCGTCTGTTGTTGTCATTAATTAAGCCCATGCTGGATTAAGTACCTTAATGCTGCTTTTGGATGCTGTAATTAAGCCCGTTTACTTTCAAGGATTCACAGCA
AM74675.2x	CTGACCAATTGGTCGGCCGCGTCTGTTGTTGTCATTAATTAAGCCCATGCTGGATTAAGTACCTTAATGCTGCTTTTGGATGCTGTAATTAAGCCCGTTTACTTTCAAGGATTCACAGCA
2B0B359	CTGACCAATTGGTCGGCCGCGTCTGTTGTTGTCATTAATTAAGCCCATGCTGGATTAAGTACCTTAATGCTGCTTTTGGATGCTGTAATTAAGCCCGTTTACTTTCAAGGATTCACAGCA
ZF46784x	CTGACCAATTGGTCGGCCGCGTCTGTTGTTGTCATTAATTAAGCCCATGCTGGATTAAGTACCTTAATGCTGCTTTTGGATGCTGTAATTAAGCCCGTTTACTTTCAAGGATTCACAGCA
AT22677.3	CTGACCAATTGGTCGGCCGCGTCTGTTGTTGTCATTAATTAAGCCCATGCTGGATTAAGTACCTTAATGCTGCTTTTGGATGCTGTAATTAAGCCCGTTTACTTTCAAGGATTCACAGCA
2B0B355	CTGACCAATTGGTCGGCCGCGTCTGTTGTTGTCATTAATTAAGCCCATGCTGGATTAAGTACCTTAATGCTGCTTTTGGATGCTGTAATTAAGCCCGTTTACTTTCAAGGATTCACAGCA
2B0B355	CTGACCAATTGGTCGGCCGCGTCTGTTGTTGTCATTAATTAAGCCCATGCTGGATTAAGTACCTTAATGCTGCTTTTGGATGCTGTAATTAAGCCCGTTTACTTTCAAGGATTCACAGCA
CP00102.1x	CTGACCAATTGGTCGGCCGCGTCTGTTGTTGTCATTAATTAAGCCCATGCTGGATTAAGTACCTTAATGCTGCTTTTGGATGCTGTAATTAAGCCCGTTTACTTTCAAGGATTCACAGCA
ZF46785.1	CTGACCAATTGGTCGGCCGCGTCTGTTGTTGTCATTAATTAAGCCCATGCTGGATTAAGTACCTTAATGCTGCTTTTGGATGCTGTAATTAAGCCCGTTTACTTTCAAGGATTCACAGCA
2J27782	CTGACCAATTGGTCGGCCGCGTCTGTTGTTGTCATTAATTAAGCCCATGCTGGATTAAGTACCTTAATGCTGCTTTTGGATGCTGTAATTAAGCCCGTTTACTTTCAAGGATTCACAGCA
2B26540	CTGACCAATTGGTCGGCCGCGTCTGTTGTTGTCATTAATTAAGCCCATGCTGGATTAAGTACCTTAATGCTGCTTTTGGATGCTGTAATTAAGCCCGTTTACTTTCAAGGATTCACAGCA
AME86232x	CTGACCAATTGGTCGGCCGCGTCTGTTGTTGTCATTAATTAAGCCCATGCTGGATTAAGTACCTTAATGCTGCTTTTGGATGCTGTAATTAAGCCCGTTTACTTTCAAGGATTCACAGCA
2E28387B	CTGACCAATTGGTCGGCCGCGTCTGTTGTTGTCATTAATTAAGCCCATGCTGGATTAAGTACCTTAATGCTGCTTTTGGATGCTGTAATTAAGCCCGTTTACTTTCAAGGATTCACAGCA
DQ23149	CTGACCAATTGGTCGGCCGCGTCTGTTGTTGTCATTAATTAAGCCCATGCTGGATTAAGTACCTTAATGCTGCTTTTGGATGCTGTAATTAAGCCCGTTTACTTTCAAGGATTCACAGCA
2E28576.1	CTGACCAATTGGTCGGCCGCGTCTGTTGTTGTCATTAATTAAGCCCATGCTGGATTAAGTACCTTAATGCTGCTTTTGGATGCTGTAATTAAGCCCGTTTACTTTCAAGGATTCACAGCA
CP00112.1x	CTGACCAATTGGTCGGCCGCGTCTGTTGTTGTCATTAATTAAGCCCATGCTGGATTAAGTACCTTAATGCTGCTTTTGGATGCTGTAATTAAGCCCGTTTACTTTCAAGGATTCACAGCA

AE089594	CGTACTCGG3CTGTCC338GCATC2867TCATT680GATVACCGJCCCTCAGCTTCCTGAC336TCGAAJTC867TCG333TAA7A0000380CCTAATTAATGGT
AE089590	CGTACTCGG3CTGTCC338GCATC2867TCATT690GATVACCGJCCCTCAGCTTCCTGAC336TCGAAJTC867TCG333TAA7A0000380CCTAATTAATGGT
AE089592	CGTACTCGG3CTGTCC338GCATC2867TCATT680GATVACCGJCCCTCAGCTTCCTGAC336TCGAAJTC867TCG333TAA7A0000380CCTAATTAATGGT
AE089587	CGTACTCGG3CTGTCC338GCATC2867TCATT680GATVACCGJCCCTCAGCTTCCTGAC336TCGAAJTC867TCG333TAA7A0000380CCTAATTAATGGT
VL0611.1	CGTACTCGG3CTGTCC338GCATC2867TCATT680GATVACCGJCCCTCAGCTTCCTGAC336TCGAAJTC867TCG333TAA7A0000380CCTAATTAATGGT
AE089588	CGTACTCGG3CTGTCC338GCATC2867TCATT680GATVACCGJCCCTCAGCTTCCTGAC336TCGAAJTC867TCG333TAA7A0000380CCTAATTAATGGT
U=azmpozon	CGTACTCGG3CTGTCC338GCATC2867TCATT680GATVACCGJCCCTCAGCTTCCTGAC336TCGAAJTC867TCG333TAA7A0000380CCTAATTAATGGT
AE222162	CGTACTCGG3CTGTCC338GCATC2867TCATT680GATVACCGJCCCTCAGCTTCCTGAC336TCGAAJTC867TCG333TAA7A0000380CCTAATTAATGGT
465-XTC-DEC-B	CGTACTCGG3CTGTCC338GCATC2867TCATT680GATVACCGJCCCTCAGCTTCCTGAC336TCGAAJTC867TCG333TAA7A0000380CCTAATTAATGGT
DQ885208	CGTACTCGG3CTGTCC338GCATC2867TCATT680GATVACCGJCCCTCAGCTTCCTGAC336TCGAAJTC867TCG333TAA7A0000380CCTAATTAATGGT
AM412236	CGTACTCGG3CTGTCC338GCATC2867TCATT680GATVACCGJCCCTCAGCTTCCTGAC336TCGAAJTC867TCG333TAA7A0000380CCTAATTAATGGT
AL5128831c	CGTACTCGG3CTGTCC338GCATC2867TCATT680GATVACCGJCCCTCAGCTTCCTGAC336TCGAAJTC867TCG333TAA7A0000380CCTAATTAATGGT
2A746675.21c	CGTACTCGG3CTGTCC338GCATC2867TCATT680GATVACCGJCCCTCAGCTTCCTGAC336TCGAAJTC867TCG333TAA7A0000380CCTAATTAATGGT
AE089593	CGTACTCGG3CTGTCC338GCATC2867TCATT680GATVACCGJCCCTCAGCTTCCTGAC336TCGAAJTC867TCG333TAA7A0000380CCTAATTAATGGT
2F467641c	CGTACTCGG3CTGTCC338GCATC2867TCATT680GATVACCGJCCCTCAGCTTCCTGAC336TCGAAJTC867TCG333TAA7A0000380CCTAATTAATGGT
AF42877.4	CGTACTCGG3CTGTCC338GCATC2867TCATT680GATVACCGJCCCTCAGCTTCCTGAC336TCGAAJTC867TCG333TAA7A0000380CCTAATTAATGGT
AE089595	CGTACTCGG3CTGTCC338GCATC2867TCATT680GATVACCGJCCCTCAGCTTCCTGAC336TCGAAJTC867TCG333TAA7A0000380CCTAATTAATGGT
AE089585	CGTACTCGG3CTGTCC338GCATC2867TCATT680GATVACCGJCCCTCAGCTTCCTGAC336TCGAAJTC867TCG333TAA7A0000380CCTAATTAATGGT
CPJ00602.11c	CGTACTCGG3CTGTCC338GCATC2867TCATT680GATVACCGJCCCTCAGCTTCCTGAC336TCGAAJTC867TCG333TAA7A0000380CCTAATTAATGGT
2F467265.1	CGTACTCGG3CTGTCC338GCATC2867TCATT680GATVACCGJCCCTCAGCTTCCTGAC336TCGAAJTC867TCG333TAA7A0000380CCTAATTAATGGT
A.277552	CGTACTCGG3CTGTCC338GCATC2867TCATT680GATVACCGJCCCTCAGCTTCCTGAC336TCGAAJTC867TCG333TAA7A0000380CCTAATTAATGGT
AE866440	CGTACTCGG3CTGTCC338GCATC2867TCATT680GATVACCGJCCCTCAGCTTCCTGAC336TCGAAJTC867TCG333TAA7A0000380CCTAATTAATGGT
AM8E2931c	CGTACTCGG3CTGTCC338GCATC2867TCATT680GATVACCGJCCCTCAGCTTCCTGAC336TCGAAJTC867TCG333TAA7A0000380CCTAATTAATGGT
AE250378	CGTACTCGG3CTGTCC338GCATC2867TCATT680GATVACCGJCCCTCAGCTTCCTGAC336TCGAAJTC867TCG333TAA7A0000380CCTAATTAATGGT
DQ816189	CGTACTCGG3CTGTCC338GCATC2867TCATT680GATVACCGJCCCTCAGCTTCCTGAC336TCGAAJTC867TCG333TAA7A0000380CCTAATTAATGGT
AY528506.1	CGTACTCGG3CTGTCC338GCATC2867TCATT680GATVACCGJCCCTCAGCTTCCTGAC336TCGAAJTC867TCG333TAA7A0000380CCTAATTAATGGT
CPJ01122.11c	CGTACTCGG3CTGTCC338GCATC2867TCATT680GATVACCGJCCCTCAGCTTCCTGAC336TCGAAJTC867TCG333TAA7A0000380CCTAATTAATGGT

Figura 4 (cont.)

Figura 4 (cont.)

```

AB0E5894      DTTTTCCAGGAGGATTTTCAGGCAATGTCGCTTTTAACTTGGTTAAGTTTTGGTTCCGTERAACAAAATACAGCTGCTGATAATACACATACCGAAGT
AB0E5898      DTTTTCCAGGAGGATTTTCAGGCAATGTCGCTTTTAACTTGGTTAAGTTTTGGTTCCGTERAACAAAATACAGCTGCTGATAATACACATACCGAAGT
AB0E5892      DTTTTCCAGGAGGATTTTCAGGCAATGTCGCTTTTAACTTGGTTAAGTTTTGGTTCCGTERAACAAAATACAGCTGCTGATAATACACATACCGAAGT
AB0E5897      DTTTTCCAGGAGGATTTTCAGGCAATGTCGCTTTTAACTTGGTTAAGTTTTGGTTCCGTERAACAAAATACAGCTGCTGATAATACACATACCGAAGT
V0061.1      DTTTTCCAGGAGGATTTTCAGGCAATGTCGCTTTTAACTTGGTTAAGTTTTGGTTCCGTERAACAAAATACAGCTGCTGATAATACACATACCGAAGT
AB0E5800      DTTTTCCAGGAGGATTTTCAGGCAATGTCGCTTTTAACTTGGTTAAGTTTTGGTTCCGTERAACAAAATACAGCTGCTGATAATACACATACCGAAGT
Transposon      DTTTTCCAGGAGGATTTTCAGGCAATGTCGCTTTTAACTTGGTTAAGTTTTGGTTCCGTERAACAAAATACAGCTGCTGATAATACACATACCGAAGT
AF255.62      DTTTTCCAGGAGGATTTTCAGGCAATGTCGCTTTTAACTTGGTTAAGTTTTGGTTCCGTERAACAAAATACAGCTGCTGATAATACACATACCGAAGT
365-MTC-DET-B      DTTTTCCAGGAGGATTTTCAGGCAATGTCGCTTTTAACTTGGTTAAGTTTTGGTTCCGTERAACAAAATACAGCTGCTGATAATACACATACCGAAGT
DQ825008      -----
AM412226      DTTTTCCAGGAGGATTTTCAGGCAATGTCGCTTTTAACTTGGTTAAGTTTTGGTTCCGTERAACAAAATACAGCTGCTGATAATACACATACCGAAGT
AF538658.rc      DTTTTCCAGGAGGATTTTCAGGCAATGTCGCTTTTAACTTGGTTAAGTTTTGGTTCCGTERAACAAAATACAGCTGCTGATAATACACATACCGAAGT
AF746275.1.rc      DTTTTCCAGGAGGATTTTCAGGCAATGTCGCTTTTAACTTGGTTAAGTTTTGGTTCCGTERAACAAAATACAGCTGCTGATAATACACATACCGAAGT
AB0E5894      DTTTTCCAGGAGGATTTTCAGGCAATGTCGCTTTTAACTTGGTTAAGTTTTGGTTCCGTERAACAAAATACAGCTGCTGATAATACACATACCGAAGT
ZF646764.rc      DTTTTCCAGGAGGATTTTCAGGCAATGTCGCTTTTAACTTGGTTAAGTTTTGGTTCCGTERAACAAAATACAGCTGCTGATAATACACATACCGAAGT
AF226777.3      DTTTTCCAGGAGGATTTTCAGGCAATGTCGCTTTTAACTTGGTTAAGTTTTGGTTCCGTERAACAAAATACAGCTGCTGATAATACACATACCGAAGT
AB0E5895      DTTTTCCAGGAGGATTTTCAGGCAATGTCGCTTTTAACTTGGTTAAGTTTTGGTTCCGTERAACAAAATACAGCTGCTGATAATACACATACCGAAGT
AB0E5885      DTTTTCCAGGAGGATTTTCAGGCAATGTCGCTTTTAACTTGGTTAAGTTTTGGTTCCGTERAACAAAATACAGCTGCTGATAATACACATACCGAAGT
CPJ00605.1.rc      DTTTTCCAGGAGGATTTTCAGGCAATGTCGCTTTTAACTTGGTTAAGTTTTGGTTCCGTERAACAAAATACAGCTGCTGATAATACACATACCGAAGT
ZF467655.1      DTTTTCCAGGAGGATTTTCAGGCAATGTCGCTTTTAACTTGGTTAAGTTTTGGTTCCGTERAACAAAATACAGCTGCTGATAATACACATACCGAAGT
AJ275658      DTTTTCCAGGAGGATTTTCAGGCAATGTCGCTTTTAACTTGGTTAAGTTTTGGTTCCGTERAACAAAATACAGCTGCTGATAATACACATACCGAAGT
AB3666440      DTTTTCCAGGAGGATTTTCAGGCAATGTCGCTTTTAACTTGGTTAAGTTTTGGTTCCGTERAACAAAATACAGCTGCTGATAATACACATACCGAAGT
AMB82593.rc      DTTTTCCAGGAGGATTTTCAGGCAATGTCGCTTTTAACTTGGTTAAGTTTTGGTTCCGTERAACAAAATACAGCTGCTGATAATACACATACCGAAGT
AF255078      DTTTTCCAGGAGGATTTTCAGGCAATGTCGCTTTTAACTTGGTTAAGTTTTGGTTCCGTERAACAAAATACAGCTGCTGATAATACACATACCGAAGT
DQ816139      DTTTTCCAGGAGGATTTTCAGGCAATGTCGCTTTTAACTTGGTTAAGTTTTGGTTCCGTERAACAAAATACAGCTGCTGATAATACACATACCGAAGT
AF528556.1      DTTTTCCAGGAGGATTTTCAGGCAATGTCGCTTTTAACTTGGTTAAGTTTTGGTTCCGTERAACAAAATACAGCTGCTGATAATACACATACCGAAGT
CPJ01125.1.rc      DTTTTCCAGGAGGATTTTCAGGCAATGTCGCTTTTAACTTGGTTAAGTTTTGGTTCCGTERAACAAAATACAGCTGCTGATAATACACATACCGAAGT

```

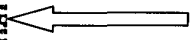


Figura 5

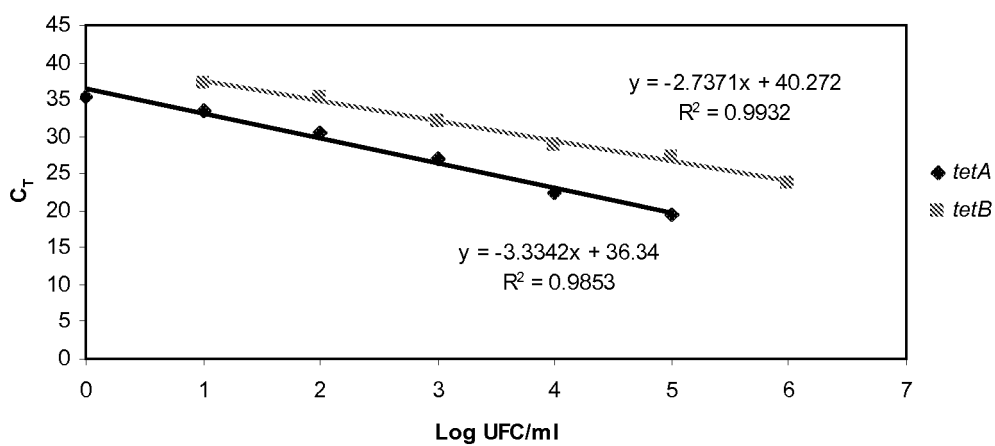
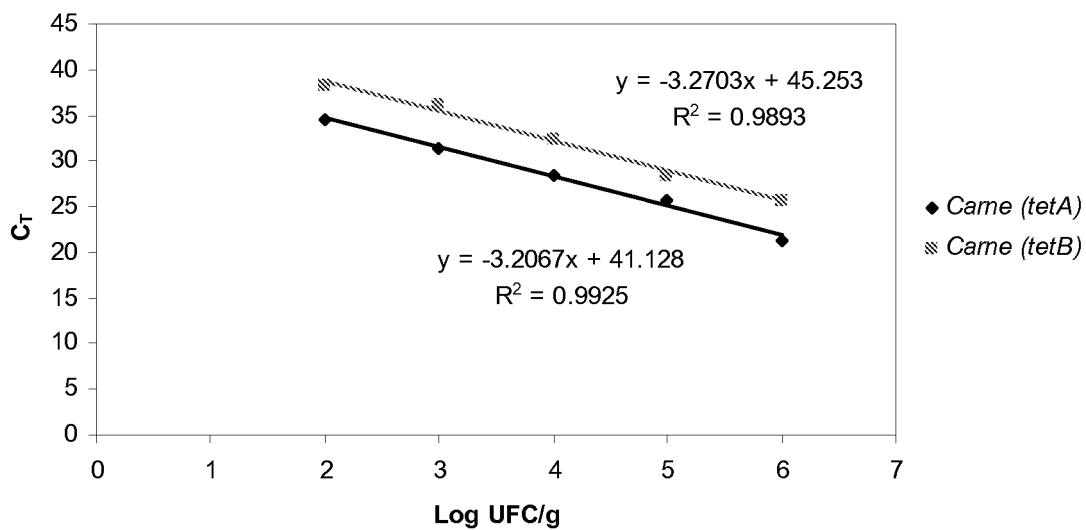
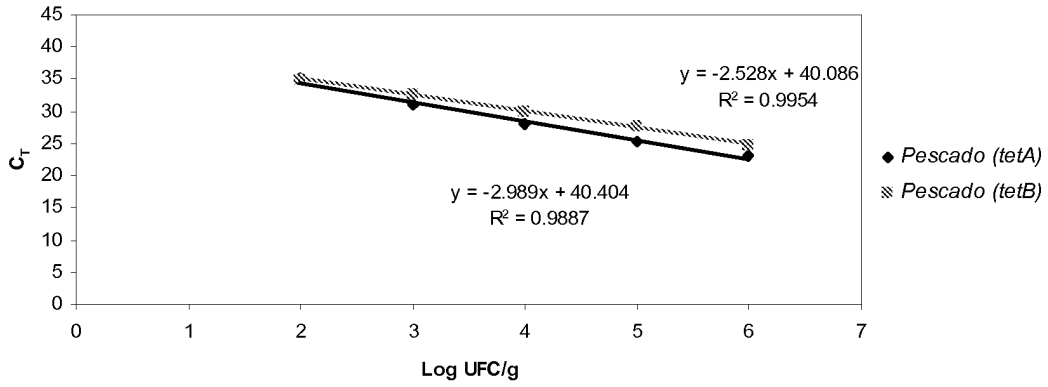


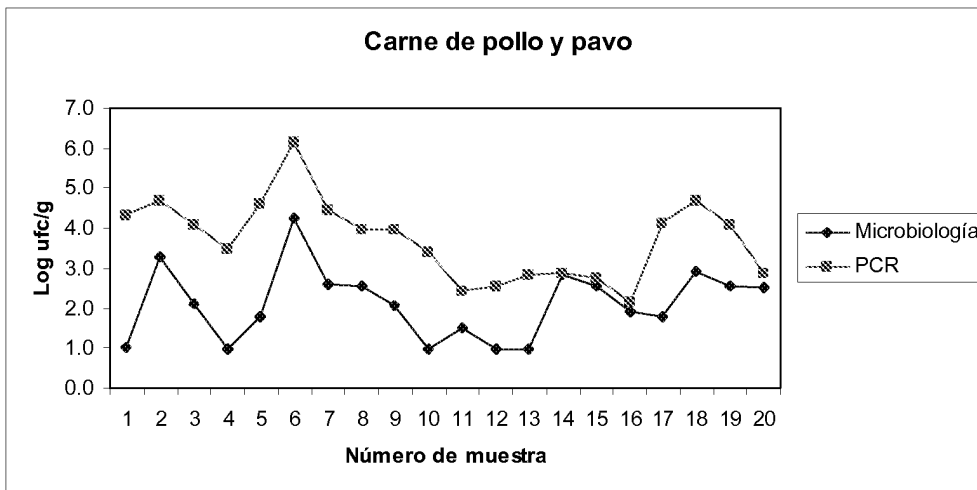
Figura 6



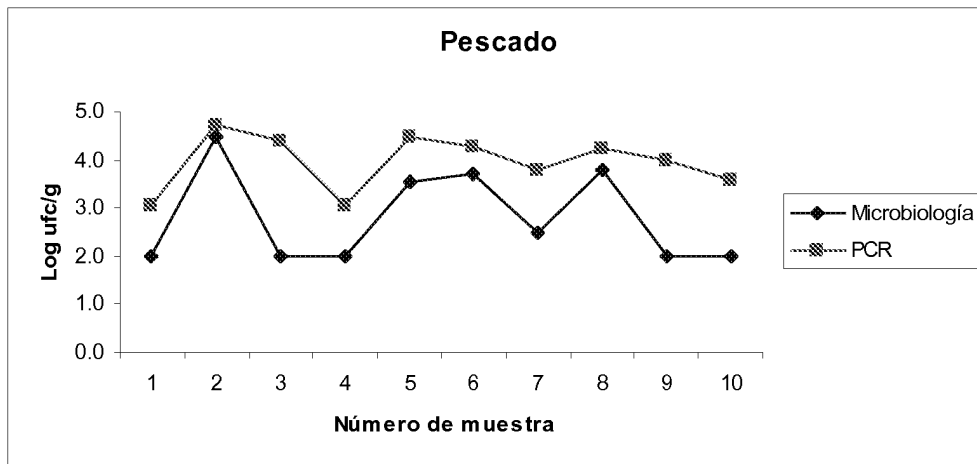
**Figura 7**



**Figura 8**



**Figura 9**





# ES 2 370 850 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5 <120> MÉTODOS Y REACTIVOS PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS RESISTENTES A TETRACICLINAS

10 <130> P486ES00

<160> 8

15 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1200

<212> DNA

20 <213> *Escherichia coli*

<400> 1

25 gtgaaaccca acagaccct gatcgtaatt ctgagcactg tcgcgctcga cgctgtcggc 60  
atcggcctga ttatgccggt gctgccgggc ctctgcgcg atctggttca ctcgaacgac 120  
30 gtcaccgccc actatggcat tctgctggcg ctgtatgcgt tgatgcaatt tgctgcgca 180  
cctgtgctgg gcgcgctgtc ggatcgtttc gggcggcggc cggctctgct cgtctcgtg 240  
35 gccggcgctg ctgtcgacta cgccatcatg gcgacggcgc ctttccttg gtttctctat 300  
atcgggcgga tcgtggccgg catcaccggg gcgactgggg cggtagccgg cgcttatatt 360  
40 gccgatatca ctgatggcga tgagcgcgcg cggcacttcg gcttcatgag cgctgtttc 420  
gggttcggga tggtcgcggg acctgtgctc ggtgggctga tgggcggttt ctccccccac 480  
45 ggtccgttct tcgccgcggc agccttgaac ggcctcaatt tcctgacggg ctgtttcctt 540  
ttgccggagt cgcacaaagg cgaacgccgg ccgttacgcc gggaggctct caaccgctc 600  
50 gcttcgttcc ggtgggcccg gggcatgacc gtcgtcgcgc cctgatggc ggtcttcttc 660  
atcatgcaac ttgtcggaca ggtgccggcc gcgctttggg tcattttcgg cgaggatcg 720  
55 tttcactggg acgcgaccac gatcggcatt tcgcttgccg catttggcat tctgcattca 780  
ctcggcccagg caatgatcac cggccctgta gccgcccggc tcggcgaaag gcgggcactc 840  
60 atgctcggaa tgattgccga cggcacaggc tacatcctgc ttgccttcgc gacacgggga 900  
tggatggcgt tcccgatcat ggtcctgctt gcttcgggtg gcatcggaat gccggcgctg 960  
65

## ES 2 370 850 A1

caagcaattt tgtccaggca ggtggatgag gaacgtcagg ggcagctgca aggctcactg 1020  
gcggcgctca ccagcctgac ctcgatcgtc ggaccctcc tcttcacggc gatctatgcg 1080  
5 gcttctataa caacgtggaa cgggtgggca tggattgcag gcgctgccct ctacttgctc 1140  
tgctgcccg cgctgcgtcg cgggctttg agcggcgag ggcaacgagc cgatcgctga 1200  
10  
<210> 2  
<211> 17  
15 <212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
20 <223> cebador *tetA* directo  
<400> 2  
25 ccgcgctttg ggtcatt 17  
<210> 3  
30 <211> 17  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
35 <223> cebador *tetA* reverso  
<400> 3  
40 tggtcgcgctc ccagtga 17  
<210> 4  
45 <211> 13  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
50 <220>  
<223> Sonda Taqman MGB *tetA*  
55 <400> 4  
tcggcgagga tcg 13  
60 <210> 5  
<211> 990  
<212> DNA  
65 <213> *Escherichia coli*

## ES 2 370 850 A1

<400> 5

5 taaccacttt ggcgatttgc ttgcacttta tgcgttaatg caggttatct ttgctccttg 60  
gcttggaaaa atgtctgacc gatttggctg gcgcccagtg ctggtgttgt cattaatagg 120  
10 cgcacgctg gattacttat tgctggcttt ttcaagtgcg ctttggatgc tgtatttagg 180  
cggtttgctt tcagggatca caggagctac tggggctgct gcggcatcgg tcattgccga 240  
15 taccacctca gcttctcaac gcgtgaagtg gttcggttgg ttaggggcaa gttttgggct 300  
tggtttaata gcggggccta ttattggtgg ttttgcagga gagatttcac cgcatagtcc 360  
20 cttttttatc gctgcgttgc taaatattgt cactttcctt gtggttatgt tttggttccg 420  
tgaaaccaa aatacacgtg ataatacaga taccgaagta ggggttgaga cgcaatcgaa 480  
25 ttcggtatac atcactttat ttaaaacgat gccattttg ttgattatct atttttcagc 540  
gcaattgata ggccaaattc ccgcaacggt gtgggtgcta tttaccgaaa atcgttttgg 600  
30 atggaatagc atgatggtg gcttttcatt agcgggtcct ggtcttttac actcagtatt 660  
ccaagccttt gtggcaggaa gaatagccac taaatggggc gaaaaaacgg cagtactgct 720  
35 cggatttatt gcagatagta gtgcatttgc ctttttagcg tttatatctg aaggttggtt 780  
agttttccct gttttaatct tattggctgg tgggtggatc kctttacctg cattacaggg 840  
40 agtgatgtct atccaaacaa agagtcatca gcaaggtgct ttacagggat tattggtgag 900  
ccttaccaat gcaacoggtg ttattggccc attactgttt gctgttattt ataatcattc 960  
45 actaccactt tgggatggct ggattgatta 990

<210> 6

<211> 17

50 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

55 <223> Cebador directo *tetB*

<400> 6

60 aggcgcatcg ctggatt

17

<210> 7

<211> 19

65 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

## ES 2 370 850 A1

<220>

<223> Cebador *tetB* reverso

5 <400> 7

cagcatccaa agcgcactt

19

10 <210> 8

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15

<220>

<223> Sonda Taqman MGB *tetB*

20 <400> 8

cttattgctg gcttttt

17

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201030856

②② Fecha de presentación de la solicitud: 02.06.2010

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)  
**C12N1/20** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	YU Z et al. Development and Application of Real-Time PCR Assays for Quantification of Genes Encoding Tetracycline Resistance. Applied and Environmental Microbiology. Noviembre 2005. Vol. 71 (11), páginas: 6926-6933, todo el documento.	1-46
A	AMINOV RI et al. Molecular Ecology of Tetracycline Resistance: Development and Validation of Primers for Detection of Tetracycline Resistance Genes Encoding Ribosomal Protection Proteins. Applied and Environmental Microbiology. Enero 2001. Vol. 67 (1), páginas: 22-32, todo el documento.	1-46
A	AMINOV RI et al. Development, Validation, and Application of PCR Primers for Detection of Tetracycline Efflux Genes of Gram-Negative Bacteria Applied and Environmental Microbiology. Abril 2002. Vol. 68 (4), páginas: 1786-1793, todo el documento.	1-46
A	NAWAZ M. Isolation and characterization of tetracycline-resistant Citrobacter spp. from catfish. Food Microbiology. 2008. Vol. 25, páginas: 85-91, todo el documento.	1-46

#### 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  
17.10.2011

Examinador  
M. D. García Grávalos

Página  
1/5

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

C12Q, C12N

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, MEDLINE, NPL, XPESP, EMBASE, BIOSIS, GOOGLE SCHOLAR, EBI.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 17.10.2011

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-46	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-46	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

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 se publica.

**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	YU Z et al. Applied and Environmental Microbiology. Noviembre 2005. Vol. 71 (11), páginas: 6926-6933.	2005
D02	AMINOV RI et al. Applied and Environmental Microbiology. Enero 2001. Vol. 67 (1), páginas: 22-32.	2001
D03	AMINOV RI et al. Applied and Environmental Microbiology. Abril 2002. Vol. 68 (4), páginas: 1786-1793.	2002
D04	NAWAZ M. Food Microbiology. 2008. Vol. 25, páginas: 85-91.	2008

**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**

La presente solicitud divulga un método *in vitro*, basado en técnicas de PCR a tiempo real, para detección y cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclinas, en muestras alimentarias, biológicas, clínicas, etc., empleando cebadores específicos para la región del gen *tetA* comprendida entre los nucleótidos 592 y 884 de la secuencia definida como SEQ ID NO:1 (reivindicaciones 1-35). La invención también se refiere a un kit para la puesta en marcha de dichos métodos (reivindicaciones 36-46).

El documento D01 divulga el desarrollo, validación y uso de un método *in vitro*, basado en técnicas de PCR a tiempo real, empleando cebadores adecuados, para detección y cuantificación de varios grupos de genes (*tet*), de resistencia a tetraciclinas, en bacterias procedentes de muestras de estiércol de ganado bovino y/o porcino (ver todo el documento).

El documento D02 se refiere al desarrollo, validación y uso de cebadores para detección de genes resistentes a tetraciclinas que codifican proteínas de protección ribosomal (RPPs). Basándose en el origen monofilético de estos genes, se diseñan un conjunto de cebadores capaces de reconocer fragmentos comunes en diversas especies bacterianas de distinta procedencia. Estos cebadores son empleados para detectar genes de resistencia a tetraciclinas, que codifican proteínas RPPs, en ADN aislado de bacterias procedentes de muestras de estiércol de ganado bovino y/o porcino (ver todo el documento).

El documento D03 se refiere al desarrollo, validación y uso de cebadores para detección de genes relacionados con las bombas de eflujo de tetraciclina en bacterias Gram-negativas. Basándose en el origen monofilético de estos genes, que comparten 12 segmentos transmembrana, es posible diseñar un conjunto de cebadores adecuados para la detección de un amplio rango de genes, relacionados con las bombas de eflujo en bacterias Gram-negativas, para detectar resistencia a tetraciclinas en ADN aislado de muestras de heces porcinas procedentes de aguas residuales y subterráneas profundas (ver todo el documento).

El documento D04 se refiere al aislamiento y caracterización de especies del género *Citrobacter*, resistentes a tetraciclinas en siluro (*Ictalurus punctatus*). Una vez aislados los microorganismos, se caracteriza la resistencia a tetraciclinas, detectando la presencia de los genes de resistencia (*tetA*, *tetB* y *tetC*) mediante ensayos de PCR, empleando cebadores específicos para estos genes (ver todo el documento).

**1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)**

La presente solicitud divulga un método *in vitro*, basado en técnicas de PCR a tiempo real, para detección y cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclinas, en muestras alimentarias, biológicas, clínicas, etc., empleando cebadores específicos para la región del gen *tetA* comprendida entre los nucleótidos 592 y 884 de la secuencia definida como SEQ ID NO:1. La invención también se refiere a un kit para la puesta en marcha de dichos métodos.

**1.1. Reivindicaciones 1-46.**

El documento D01 se considera el más cercano en el estado de la técnica al objeto de la presente invención, ya que anticipa el desarrollo, validación y uso de un método *in vitro*, basado en técnicas de PCR a tiempo real, para detección y cuantificación de varios grupos de genes de resistencia a tetraciclinas (*tet*), entre ellos el gen *tetA*, empleando cebadores específicos, en ADN bacterias procedentes de muestras de estiércol de ganado bovino y/o porcino.



La diferencia fundamental entre el objeto técnico de las reivindicaciones de la presente solicitud y el documento D01 consiste en las parejas de cebadores y sondas empleadas, que además de no coincidir con las empleadas en el documento D01, son capaces de detectar, con un único ensayo, un fragmento del gen *tetA* muy conservado entre especies, por lo que se considera que el objeto de las reivindicaciones de la presente solicitud no se encuentra en el estado de la técnica y tampoco derivaría del mismo de forma evidente para un experto en la materia.

En conclusión, las reivindicaciones 1-46 cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva ((Art. 6.1 y 8.1) LP 11/1986).

Aunque los documentos D02-D04 también se refieren al desarrollo, validación y uso de cebadores específicos para detección de genes resistentes a tetraciclinas, tampoco coinciden con los desarrollados en la presente invención y no se consideran relevantes a efectos de la valoración de la novedad y actividad inventiva de la presente solicitud.