

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 630**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05766629 .9**

96 Fecha de presentación: **24.06.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1759017**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.03.2007**

54 Título: **Secuencias de DNA para la detección de y diferenciación entre cepas de E. coli patógenas**

30 Prioridad:
25.06.2004 US 583296 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2012

73 Titular/es:
**E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY
1007 MARKET STREET
WILMINGTON, DE 19898, US**

72 Inventor/es:
BURNS, Frank, R.

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 380 630 T3

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

DESCRIPCIÓN

Secuencias de DNA para la detección de y diferenciación entre cepas de *E. coli* patógenas.

Campo de la invención

5 El campo de la invención se refiere a un método rápido para detección de y diferenciación entre bacterias *Escherichia coli* basado en la presencia de secuencias de ácido nucleico, en particular, a un método de detección basado en PCR, y a moléculas de oligonucleótidos y reactivos y kits útiles para el mismo.

Antecedentes de la invención

10 *Escherichia coli* (*E. coli*) es una bacteria gram-negativa con forma de bastoncillo. Aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* son benignas y se encuentran como flora intestinal normal de los humanos y otros animales, algunas cepas son patógenas y pueden conducir a enfermedades a veces fatales. Diferentes cepas de *E. coli* patógeno difieren en su epidemiología, curso clínico y potencial para causar brotes de enfermedad. El pase de la enfermedad es generalmente a través de la vía fecal/oral.

15 La patogenicidad se ha ligado a varios serotipos, que se definen por los antígenos O y H. Los diferentes serotipos patógenos se han asociado con diferentes cursos clínicos de la enfermedad y llevan asociados con ellos diferentes niveles de preocupación desde el punto de vista de la salud pública. Varios brotes de enfermedad han sido localizados en fuentes de *E. coli* patógeno transportadas por los alimentos y el agua.

Un serotipo en particular es el serotipo *E. coli* O157:H7, ha sido asociado con varios brotes transportados por alimentos y agua y está regulado como adulterante en la carne picada de vacuno por la USDA con un estándar de tolerancia cero.

20 Dado que *E. coli* es ubicuo, y la mayoría de los serotipos son no patógenos, la posibilidad de detectar serotipos patógenos, y diferenciar entre serotipos patógenos con diferentes implicaciones clínicas y de salud pública es útil.

Por consiguiente, es deseable disponer de un test para la detección rápida de *E. coli* patógenos y diferenciar aquéllos que son cause de preocupación desde el punto de vista de la salud pública y la regulación.

Sumario de la invención

25 La presente invención incluye:

30 Un método para detectar la presencia de *E. coli* patógeno en una muestra, que comprende (a) realizar amplificación por PCR de la muestra utilizando un par de iniciadores seleccionados del grupo constituido por (i) SEQ ID NOs: 2 y 3, (ii) SEQ ID NOs: 5 y 6, (iii) SEQ ID NOs: 8 y 9, (iv) SEQ ID NOs: 10 y 11, (v) SEQ ID NOs: 13 y 14, y (vi) SEQ ID NOs: 16 y 17, para producir un resultado de amplificación por PCR; y (b) examinar el resultado de la amplificación por PCR del paso (a) para detectar un producto de amplificación del par de iniciadores, en cuyo caso una detección positiva del producto de amplificación del par de iniciadores indica la presencia de *E. coli* patógeno en la muestra. Preferiblemente, el par de iniciadores se selecciona del grupo constituido por (a)(ii), (a)(iii) y (a)(iv).

35 Un método para detectar la presencia de *E. coli* patógeno en una muestra, comprendiendo el método: (a) realizar amplificación por PCR de la muestra utilizando dos pares de iniciadores diferentes seleccionados del grupo constituido por (i) SEQ ID NOs: 2 y 3, (ii) SEQ ID NOs: 5 y 6, (iii) SEQ ID NOs: 8 y 9, (iv) SEQ ID NOs: 10 y 11, (v) SEQ ID NOs: 13 y 14, y (vi) SEQ ID NOs: 16 y 17, para producir un resultado de amplificación por PCR; y (b) examinar el resultado de la amplificación por PCR del paso (a) para detectar productos de amplificación de los dos pares de iniciadores diferentes, en cuyo caso una detección positiva de los productos de amplificación de los dos pares de iniciadores diferentes, indica la presencia de *E. coli* patógeno en la muestra. Los dos pares de iniciadores diferentes comprenden preferiblemente (a)(ii) y (a)(iii), y aún más preferiblemente (a)(ii) y (a)(iv).

40 Cualquiera de los métodos anteriores, en donde en el paso (b) se utiliza un análisis de la curva de fusión para detectar el producto de amplificación.

45 Cualquiera de los métodos anteriores, que comprende adicionalmente un paso de preparación de la muestra para amplificación por PCR antes de dicho paso (a). Preferiblemente, el paso de preparación comprende al menos uno de los procesos siguientes: (1) enriquecimiento bacteriano, (2) separación de las células bacterianas de la muestra, (3) lisis celular, y (4) extracción del DNA total.

Cualquiera de los métodos anteriores, en donde la muestra comprende una muestra de alimentos, una muestra de agua, o una matriz de alimentos enriquecida selectivamente.

50 Un polinucleótido aislado para detección de *E. coli* patógeno que comprende SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, o SEQ ID NO:17.

Un kit para detección de *E. coli* patógeno, que comprende (a) al menos un par de iniciadores seleccionados del grupo constituido por (i) SEQ ID NOs:2 y 3, (ii) SEQ ID NOs:5 y 6, (iii) SEQ ID NOs:8 y 9, (iv) SEQ ID NOs:10 y 11, (v) SEQ ID NOs:13 y 14, y (vi) SEQ ID NOs:16 y 17; y (b) DNA-polimerasa termoestable. El kit comprende preferiblemente a la vez (a)(ii) y (a)(iii), y aún más preferiblemente, a la vez (a)(ii) y (a)(iv).

- 5 Una composición de replicación para uso en la realización de una PCR, que comprende al menos un par de iniciadores seleccionados del grupo constituido por (i) SEQ ID NOs:2 y 3, (ii) SEQ ID NOs:5 y 6, (iii) SEQ ID NOs:8 y 9, (iv) SEQ ID NOs:10 y 11, (v) SEQ ID NOs:13 y 14, y (vi) SEQ ID NOs:16 y 17; y (b) DNA-polimerasa termoestable. La composición de replicación comprende preferiblemente a la vez (a)(ii) y (a)(iii), y aún más preferiblemente, a la vez (a)(ii) y (a)(iv).
- 10 Una tableta que comprende cualquiera de las composiciones de replicación anteriores, y un kit para detección de *E. coli* patógeno en una muestra, que comprende la tableta.

Sumario de las secuencias

15 SEQ ID NO: 1 es la secuencia de nucleótidos de *E. coli* patógeno cuya detección demuestra específicamente la presencia de *E. coli* patógeno de serotipos O157:H7, O157:HNM, O55:H7, O26:H11, o O145:HNM. SEQ ID NO:1 está limitada por, contiene, y está amplificada por los iniciadores SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3.

SEQ ID NO: 2 es la secuencia de nucleótidos de un iniciador 5' a una región del genoma de *E. coli* patógeno que amplificará específicamente DNA de *E. coli* patógeno de serotipos O157:H7, O157:HNM, O55:H7, O26:H11, o O145:HNM en una reacción en cadena de polimerasa con DNA bacteriano y SEQ ID NO: 3.

20 SEQ ID NO: 3 es la secuencia de nucleótidos de un iniciador 3' a una región del genoma de *E. coli* patógeno que amplificará específicamente DNA de *E. coli* patógeno de serotipos O157:H7, O157:HNM, O55:H7, O26:H11, o O145:HNM en una reacción en cadena de polimerasa con DNA bacteriano y SEQ ID NO: 2.

25 SEQ ID NO: 4 es la secuencia de nucleótidos de *E. coli* patógeno cuya detección muestra específicamente la presencia de *E. coli* patógeno de serotipos O157:H7, O157:HNM, O55:H7, O26:H11, O26:HNM, O145:HNM, o O111:HNM. SEQ ID NO:4 está limitada por, contiene, y está amplificada por el uso de los iniciadores SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.

SEQ ID NO: 5 es la secuencia de nucleótidos de un iniciador 5' a una región del genoma de *E. coli* patógeno que amplificará específicamente DNA de *E. coli* patógeno de serotipos O157:H7, O157:HNM, O55:H7, O26:H11, O26:HNM, O145:HNM, o O111:HNM en una reacción en cadena de polimerasa con DNA bacteriano y SEQ ID NO: 6.

30 SEQ ID NO: 6 es la secuencia de nucleótidos de un iniciador 3' a una región del genoma de *E. coli* patógeno que amplificará específicamente DNA de *E. coli* patógeno de serotipos O157:H7, O157:HNM, O55:H7, O26:H11, O26:HNM, O145:HNM, o O111:HNM en una reacción en cadena de polimerasa con DNA bacteriano y SEQ ID NO: 5.

35 SEQ ID NO: 7 es la secuencia de nucleótidos de *E. coli* patógeno cuya detección indica específicamente la presencia de *E. coli* patógeno de serotipos O157:H7, O157:HNM u O55:H7. SEQ ID NO:7 está limitada por, contiene, y está amplificada por el uso de iniciadores SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9. SEQ ID NO: 5 está amplificada también por el uso de iniciadores representados por SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11, que son modificaciones de SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9, respectivamente.

SEQ ID NO: 8 es la secuencia de nucleótidos de un iniciador 5' a una región del genoma de *E. coli* patógeno que amplificará específicamente DNA de *E. coli* patógeno de serotipos O157:H7, O157:HNM u O55:H7 en una reacción en cadena de polimerasa con DNA bacteriano y SEQ ID NO: 9.

40 SEQ ID NO: 9 es la secuencia de nucleótidos de un iniciador 3' a una región del genoma de *E. coli* patógeno que amplificará específicamente DNA de *E. coli* patógeno de serotipos O157:H7, O157:HNM u O55:H7 en una reacción en cadena de polimerasa con DNA bacteriano y SEQ ID NO: 8.

45 SEQ ID NO: 10 es una modificación de SEQ ID NO: 8. SEQ ID NO: 10 incluye la secuencia entera de SEQ ID NO: 8 a la que se ha añadido una pinza rica en GC. La adición de esta pinza no altera la especificidad de diana, pero sí altera la temperatura de fusión del producto amplificado. SEQ ID NO: 10 es la secuencia de nucleótidos de un iniciador 5' a una región del genoma de *E. coli* patógeno que amplificará específicamente DNA de *E. coli* patógeno de serotipos O157:H7, O157:HNM u O55:H7 en una reacción en cadena de polimerasa con DNA bacteriano y SEQ ID NO: 11.

50 SEQ ID NO: 11 es una modificación de SEQ ID NO: 9. SEQ ID NO: 11 incluye la secuencia entera de SEQ ID NO: 9 a la que se ha añadido una pinza rica en GC. La adición de esta pinza no altera la especificidad de diana, pero sí altera la temperatura de fusión del producto amplificado. SEQ ID NO: 11 es la secuencia de nucleótidos de un iniciador 3' a una región del genoma de *E. coli* patógeno que amplificará específicamente DNA de *E. coli* patógeno de serotipos O157:H7, O157:HNM u O55:H7 en una reacción en cadena de polimerasa con DNA bacteriano y SEQ ID NO: 10.

SEQ ID NO: 12 es la secuencia de nucleótidos de *E. coli* patógeno cuya detección indica específicamente la presencia de serotipos patógenos de *E. coli* que incluyen O157:H7. SEQ ID NO: 12 está limitada por, contiene, y está amplificada por los iniciadores SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14.

5 SEQ ID NO: 13 es la secuencia de nucleótidos de un iniciador 5' a una región del genoma de *E. coli* patógeno que amplificará específicamente DNA de *E. coli* patógeno de serotipos que incluyen O157:H7 en una reacción en cadena de polimerasa con DNA bacteriano y SEQ ID NO: 14.

SEQ ID NO: 14 es la secuencia de nucleótidos de un iniciador 3' a una región del genoma de *E. coli* patógeno que amplificará específicamente DNA de *E. coli* patógeno de serotipos que incluyen O157:H7 en una reacción en cadena de polimerasa con DNA bacteriano y SEQ ID NO: 13.

10 SEQ ID NO: 15 es la secuencia de nucleótidos de *E. coli* patógeno cuya detección indica específicamente la presencia de *E. coli* patógeno de serotipos que incluyen O157:H7. SEQ ID NO: 15 está limitada por, contiene, y está amplificada por los iniciadores SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17.

15 SEQ ID NO: 16 es la secuencia de nucleótidos de un iniciador 5' a una región del genoma de *E. coli* patógeno que amplificará específicamente DNA de *E. coli* patógeno de serotipos que incluyen O157:H7 en una reacción en cadena de polimerasa con DNA bacteriano y SEQ ID NO: 17.

SEQ ID NO: 17 es la secuencia de nucleótidos de un iniciador 3' a una región del genoma de *E. coli* patógeno que amplificará específicamente DNA de *E. coli* patógeno de serotipos que incluyen O157:H7 en una reacción en cadena de polimerasa con DNA bacteriano y SEQ ID NO: 16.

20 Las secuencias están de acuerdo con 37 C.F.R. §§ 1.821-1.825 ("Requirements for Patent Applications Containing Nucleotide Sequences and/or Amino Acid Sequence Disclosures - the Sequence Rules") y son consistentes con el Estándar ST.25 (1988) de la World Intellectual Property Organization (WIPO) y los requisitos del listado de secuencias de EPO y PCT (Reglas 5.2 y 49.5 (a-bis), y la Sección 208 y el Anexo C de las Instrucciones Administrativas). Los símbolos y el formato utilizados para los datos de secuencia de nucleótidos y aminoácidos cumplen con las reglas indicadas en 37 C.F.R. § 1.822.

25 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra el proceso de análisis de la curva de fusión. El cambio en fluorescencia del DNA diana se captura durante la fusión. El análisis matemático del valor negativo del cambio del logaritmo de la fluorescencia dividido por el cambio en temperatura representado contra la temperatura da como resultado el pico del gráfico conocido como una curva de fusión.

30 La Figura 2 muestra un análisis representativo de curva de fusión para una muestra positiva de *E. coli* O157:H7 patógeno amplificada con el Juego de Iniciadores 1 (PS1). La curva de fusión de la diana amplificada (SEQ ID NO: 1) se obtiene a aproximadamente 83°C.

35 La Figura 3 muestra un análisis representativo de curva de fusión para una muestra positiva de *E. coli* O157:H7 patógeno amplificada con el Juego de Iniciadores 2 (PS2). La curva de fusión de la diana amplificada (SEQ ID NO: 4) se obtiene a aproximadamente 88°C.

La Figura 4 muestra un análisis representativo de curva de fusión para una muestra positiva patógena de *E. coli* O157:H7 amplificada con el Juego de Iniciadores 3 (PS3). La curva de fusión de la diana amplificada (SEQ ID NO: 7) se obtiene a aproximadamente 80°C.

40 La Figura 5 muestra la inclusión de un control interno positivo y DNA de *E. coli* O157:H7 amplificado con el Juego de Iniciadores 2 (PS2) y el Juego de Iniciadores 4 (PS4). La diana amplificada (SEQ ID NO: 4) con el Juego de Iniciadores 2 (PS2) genera una curva de fusión a aproximadamente 88°C. El Juego de Iniciadores 4 (PS4), que tiene adiciones ricas en GC en los extremos 5', desplaza la curva de fusión de la diana amplificada (SEQ ID NO: 7 con adiciones GC de las pinzas GC) a una temperatura más alta (aproximadamente 83°C) frente a SEQ ID NO: 7 (aproximadamente 80°C) de tal modo que puede distinguirse más fácilmente de la curva de fusión del control interno positivo (aproximadamente 81°C).

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La descripción de cada referencia indicada en esta memoria se incorpora por referencia en su totalidad.

Definiciones

50 En esta descripción, se utilizan cierto número de términos y abreviaturas. Se proporcionan las definiciones siguientes.

La "reacción en cadena de polimerasa" se abrevia PCR.

El término "aislado" se refiere a materiales, tales como moléculas de ácido nucleico y/o proteínas, que están sustancialmente exentas o separadas de cualquier otro modo de componentes que acompañan normalmente o interaccionan con los materiales en un ambiente existente naturalmente. Los polinucleótidos aislados pueden purificarse a partir de una célula hospedadora en la cual existen naturalmente. Los métodos convencionales de purificación de ácido nucleico conocidos por los profesionales expertos pueden utilizarse para obtener polinucleótidos aislados. El término abarca también polinucleótidos recombinantes y polinucleótidos sintetizados químicamente.

Los términos "polinucleótido", "secuencia de polinucleótidos", "secuencia de ácido nucleico", y "fragmento de ácido nucleico" se utilizan intercambiabilmente en esta memoria. Estos términos abarcan secuencias de nucleótidos y análogas. Un polinucleótido puede ser un polímero de RNA o DNA que es mono- o bicatenario, que contiene opcionalmente bases de nucleótidos sintéticas, no naturales o bases nucleotídicas alteradas. Un polinucleótido en la forma de un polímero de DNA puede estar compuesto de una o más cadenas de cDNA, DNA genómico, DNA sintético, o mezclas de los mismos.

El término "producto de amplificación" se refiere a fragmentos de ácido nucleico producidos durante una reacción de amplificación dirigida por iniciadores. Métodos típicos de amplificación dirigida por iniciadores incluyen reacción en cadena de polimerasa (PCR), reacción en cadena de ligasa (LCR) o amplificación con desplazamiento de cadena (SDA). Si se selecciona la metodología PCR, la composición de replicación puede comprender los componentes para replicación de ácido nucleico, por ejemplo: nucleótido-trifosfatos, dos (o más) iniciadores con secuencias apropiadas, polimerasa termoestable, tampones, solutos y proteínas. Estos reactivos y detalles que describen procedimientos para su uso en amplificación de ácidos nucleicos se proporcionan en la patente U.S. No. 4.683.202 (1987, Mullis et al.) y la patente U.S. No. 4.683.195 (1986, Mullis, et al.). Si se selecciona la metodología LCR, entonces las composiciones para replicación de ácido nucleico pueden comprender, por ejemplo, una ligasa termoestable (v.g., ligasa de *T. aquaticus*), dos series de oligonucleótidos adyacentes (en donde un miembro de cada serie es complementario a cada una de las cadenas diana), tampón Tris-HCl, KCl, EDTA, NAD, ditiotreitól y DNA de esperma de salmón. Véase, por ejemplo, Tabor et al., *Proc. Acad. Sci. U.S.A.*, 82:1074-1078 (1985)).

El término "iniciador" hace referencia a un oligonucleótido (sintético o existente naturalmente), que es capaz de actuar como un punto de iniciación de la síntesis o replicación de ácido nucleico a lo largo de una cadena complementaria cuando se pone en condiciones en las cuales la síntesis de una cadena complementaria está catalizada por una polimerasa.

El término "sonda" se refiere a un oligonucleótido (sintético o existente naturalmente) que es complementario (aunque no necesariamente totalmente complementario) a un polinucleótido de interés y forma una estructura dúplex por hibridación con al menos una cadena del polinucleótido de interés.

El término "resto inhibidor de la replicación" hace referencia a cualquier átomo, molécula o grupo químico que está unido al grupo hidroxilo del terminal 3' de un oligonucleótido que bloqueará la iniciación de la extensión de cadena para replicación de una cadena de ácido nucleico. Ejemplos incluyen, pero sin carácter limitante: 3'-desoxinucleótidos (v.g., cordicepina), didesoxinucleótidos, fosfato, ligandos (v.g., biotina y dinitrofenol), moléculas informadoras (v.g., fluoresceína y rodamina), cadenas de carbono (v.g., propanol), un nucleótido o polinucleótido apareado erróneamente, o unidades de ácido nucleico peptídico. El término "no participativo" hace referencia a la falta de participación de una sonda o iniciador en una reacción para la amplificación de una molécula de ácido nucleico. Específicamente, una sonda o iniciador no participativo es una(o) que no servirá como sustrato para, o será extendido por, una DNA- o RNA-polimerasa. Una "sonda no participativo" es inherentemente incapaz de ser extendida en cadena por una polimerasa. La misma puede tener o no un resto inhibidor de la replicación.

Una molécula de ácido nucleico es "hibridable" a otra molécula de ácido nucleico, tal como un cDNA, DNA genómico, o RNA, cuando una forma monocatenaria de la molécula de ácido nucleico puede reasociarse a la otra molécula de ácido nucleico en las condiciones apropiadas de temperatura y concentración iónica de la solución. Las condiciones de hibridación y lavado son bien conocidas y se ilustran en Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1989), particularmente en el capítulo 11 y la Tabla 11.1 de dicha obra (que se incorporan enteramente en esta memoria por referencia). Las condiciones de temperatura y concentración iónica determinan la "severidad" de la hibridación. Para cribado preliminar de ácidos nucleicos homólogos, pueden utilizarse condiciones de hibridación de severidad baja, correspondientes a una T_m de 55°, v.g., 5X SSC, 0,1% SDS, 0,25% leche, y ausencia de formamida; o 30% formamida, 5X SSC, 0,5% SDS. Condiciones de hibridación de severidad moderada corresponden a una T_m más alta, v.g. 40% formamida, con 5X o 6X SSC. La hibridación requiere que los dos ácidos nucleicos contengan secuencias complementarias, aunque dependiendo de la severidad de la hibridación son posibles apareamientos erróneos entre bases. La severidad apropiada para la hibridación de ácidos nucleicos depende de la longitud de los ácidos nucleicos y el grado de complementación, variables bien conocidas en la técnica. Cuanto mayor es el grado de semejanza u homología entre dos secuencias de nucleótido, tanto mayor es el valor de T_m para los híbridos de ácidos nucleicos que tienen dichas secuencias. La estabilidad relativa (correspondiente a T_m más alta) de las hibridaciones de ácido nucleico decrece en el orden siguiente: RNA:RNA, DNA:RNA, DNA:DNA. Para híbridos de longitud mayor que 100 nucleótidos, se han deducido ecuaciones para el cálculo de T_m (véase Sambrook et al., *supra*, 9.50-9.51). Para hibridaciones con ácidos nucleicos más cortos, es decir, oligonucleótidos, la posición de los

apareamientos erróneos se hace más importante, y la longitud del oligonucleótido determina su especificidad (véase Sambrook et al., *supra*, 11.7-11.8). En una realización preferida, la longitud de un ácido nucleico hibridable es al menos aproximadamente 10 nucleótidos. Más preferiblemente, una longitud mínima para un ácido nucleico hibridable es al menos aproximadamente 15 nucleótidos; más preferiblemente al menos aproximadamente 20 nucleótidos; y muy preferiblemente la longitud es al menos 30 nucleótidos. Adicionalmente, el profesional experto reconocerá que la temperatura y la concentración de sales de la solución de lavado pueden ajustarse en caso necesario de acuerdo con factores tales como la longitud de la sonda.

"Gen" hace referencia a un fragmento de ácido nucleico que expresa una proteína específica, con inclusión de secuencias reguladoras que preceden (secuencias no codificantes 5') y que siguen (secuencias no codificantes 3') a la secuencia codificante.

El término "expresión", como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la transcripción y acumulación estable de RNA sentido (mRNA) o RNA antisentido derivado del fragmento de ácido nucleico de la invención. La expresión puede hacer referencia también a la traducción de mRNA en un polipéptido.

El DNA recombinante estándar y las técnicas de clonación molecular utilizados en esta memoria son bien conocidos en la técnica y han sido descritos por Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1989) (en lo sucesivo "Maniatis"); y por Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, publicado por Greene Publishing Assoc. y Wiley-Interscience (1987).

Iniciadores/Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos de la presente invención han sido desarrollados para la detección e identificación de *E. coli* patógeno.

Los oligonucleótidos de la presente invención se indican en SEQ ID NOs: 1-17.

Ciertos oligonucleótidos de la presente invención pueden utilizarse como iniciadores para la amplificación por la reacción en cadena de polimerasa (PCR), como se muestra a continuación en la Tabla I.

TABLA I

Juego de Iniciadores	SEQ ID NOs
PS1	2 y 3
PS2	5 y 6
PS3	8 y 9
PS4	10 y 11
PS5	13 y 14
PS6	16 y 17

Los Juegos de Iniciadores PS1 (SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3), PS2 (SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6), PS3 (SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:9), PS5 (SEQ ID NO:13 y SEQ ID NO:14), y PS6 (SEQ ID NO:16 y SEQ ID NO:17) se diseñaron sobre la base del análisis de la secuencia de una región del genoma de *E. coli* O157:H7. El Juego de Iniciadores PS4 (SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11) eran modificaciones de los iniciadores en PS3 que se generaron para elevar el punto de fusión del producto PCR sin alterar la especificidad de los iniciadores. Las búsquedas a ráfagas de la base de datos del NCBI revelaron la ausencia de homologías de secuencia significativas con genes de función conocida. El ensayo de los iniciadores no se vio ayudado por ningún programa de software.

Estos iniciadores oligonucleotídicos pueden ser útiles también para otros métodos de amplificación de ácido nucleico tales como la reacción en cadena de ligasa (LCR) (Backman et al., 1989, EP 0320308; Carrino et al., 1995, *J. Microbio!. Methods* 23: 3-20); amplificación de ácido nucleico basada en secuencias (NASBA), (Carrino et al., 1995, *supra*); y replicación autónoma de secuencias (3SR) y 'amplificación de replicasa Q' (Pfeffer et al., 1995 *Veterinary Res. Comm.*, 19: 375407).

Los oligonucleótidos de la presente invención pueden utilizarse también como sondas de hibridación. La hibridación utilizando sondas de DNA ha sido utilizada frecuentemente para la detección de patógenos en alimentos, muestras clínicas y ambientales, y la metodología es generalmente conocida por un experto en la técnica. Se reconoce generalmente que el grado de sensibilidad y especificidad de la hibridación de la sonda es menor que el alcanzado por las técnicas de amplificación descritas anteriormente.

Métodos de Ensayo

SEQ ID NOs: 1-17 pueden utilizarse en una diversidad de formatos para la detección de *E. coli* patógeno. Son muy preferidos los métodos de amplificación dirigidos por iniciadores y los métodos de hibridación de ácido nucleico.

5 Estos métodos pueden utilizarse para detectar *E. coli* patógeno en una muestra, v.g. de una fuente animal, ambiental o sospechosa de contaminación.

Pueden utilizarse también métodos tanto basados en amplificación como basados en hibridación que utilizan las secuencias de ácido nucleico y oligonucleótidos de la invención para confirmar la identificación de *E. coli* en una matriz compleja o un cultivo purificado. Una realización preferida de la presente invención comprende (1) cultivar una mixtura de muestra compleja en un medio de crecimiento no selectivo para resucitar la bacteria diana, (2) liberar el DNA total de la bacteria diana, y (3) someter el DNA total a un protocolo de amplificación con un par de iniciadores de la invención.

Métodos de Ensayo de Amplificación Dirigidos por Iniciadores

En una realización preferida, pueden utilizarse los pares de iniciadores PS1-PS6 como iniciadores para uso en una amplificación de ácido nucleico dirigida por iniciadores para la detección de *E. coli* patógeno.

15 Se conocen en la técnica una diversidad de métodos de amplificación de ácido nucleico dirigidos por iniciadores, con inclusión de métodos de sometimiento a ciclos térmicos (v.g., PCR, RT-PCR, y LCR), así como métodos isotérmicos y de amplificación con desplazamiento de cadena (SDA).

El método preferido es PCR.

Preparación de la muestra

20 Los oligonucleótidos y métodos de acuerdo con la presente invención pueden utilizarse directamente con cualesquiera muestras clínicas o ambientales adecuadas, sin necesidad alguna de preparación de la muestra. Con objeto de alcanzar una mayor sensibilidad, y en situaciones en las que el tiempo no es un factor limitante, se prefiere que las muestras se sometan a pretratamiento, y que se realice un enriquecimiento previo a la amplificación.

25 El estándar mínimo de la industria para la detección de patógenos bacterianos transportados por los alimentos es un método que detectará fiablemente la presencia de una célula patógena en 25 g de una matriz de alimentos como se describe en Andrews et al., 1984, "Food Sample y Preparation of Sample Homogenate", Chapter 1 in *Bacteriological Analytical Manual*, 8th Edition, Revision A, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA. Con objeto de satisfacer este criterio riguroso, se han desarrollado métodos y medios de enriquecimiento para aumentar el crecimiento de la célula patógena diana a fin de facilitar su detección por medios bioquímicos, inmunológicos o de hibridación de ácidos nucleicos. Los procedimientos de enriquecimiento típicos emplean medios que mejorarán el crecimiento y el estado de salud de la bacteria diana e inhibirán también el crecimiento de cualquier microorganismo productor de ruido de fondo o distinto a la diana, presente. Por ejemplo, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) ha establecido un protocolo para enriquecimiento de muestras de carne picada de vacuno que deba ser testada por *E. coli* patógeno. U.S. Food y Drug Administration, Bacterial Analytical Manual.

35 Se han desarrollado medios selectivos para una diversidad de patógenos bacterianos, y un experto en la técnica conocerá el modo de seleccionar un medio apropiado para el organismo particular que deba enriquecerse. Una exposición general y recetas de medios no selectivos se describen en el FDA Bacteriological Analytical Manual. (1998) publicado y distribuido por la Association of Analytical Chemists, Suite 400, 2200 Wilson Blvd, Arlington, VA 22201-3301.

40 Después del crecimiento selectivo, se retira una muestra de las mixturas complejas para análisis ulterior. Este procedimiento de muestreo puede realizarse por una diversidad de medios bien conocidos por los expertos en la técnica. En una realización preferida, se apartan 5 µl del cultivo de enriquecimiento y se añaden a 200 µl de solución de lisis que contiene proteasa. La solución de lisis se calienta a 37°C durante 20 min seguido por desactivación de la proteasa a 95°C durante 10 min como se describe en el BAX® System User's Guide, Qualicon, Inc., Wilmington, DE.

45 Métodos de Ensayo PCR

Un método preferido para detectar la presencia de *E. coli* patógeno en una muestra comprende (a) realizar una amplificación por PCR de la muestra utilizando un par de iniciadores seleccionado del grupo constituido por PS1, PS2, PS3, PS4, PS5, y PS6, para producir un resultado de amplificación por PCR; y (b) examinar el resultado de la amplificación por PCR del paso (a) para detectar un producto de amplificación del par de iniciadores, en cuyo caso una detección positiva del producto de amplificación del par de iniciadores indica la presencia de *E. coli* patógeno en la muestra.

Más preferiblemente, en el método que antecede, el par de iniciadores se selecciona del grupo constituido por PS2, PS3, y PS4.

Otro método preferido para detectar la presencia de *E. coli* patógeno en una muestra comprende (a) realizar una amplificación por PCR de la muestra utilizando dos pares de iniciadores diferentes seleccionados del grupo constituido por PS1, PS2, PS3, PS4, PS5, y PS6, para producir un resultado de amplificación por PCR; y (b) examinar el resultado de la amplificación por PCR del paso (a) para detectar productos de amplificación de los dos pares de iniciadores diferentes, en cuyo caso una detección positiva de los productos de amplificación de los dos pares de iniciadores diferentes indica la presencia de *E. coli* patógeno en la muestra.

En el método que antecede, los dos pares de iniciadores comprenden preferiblemente PS2 y PS3, más preferiblemente, PS2 y PS4.

En otra realización preferida, antes de la realización de la amplificación por PCR, puede llevarse a cabo un paso de preparación de la muestra. El paso de preparación puede comprender al menos uno de los procesos siguientes: (1) enriquecimiento bacteriano, (2) separación de las células bacterianas de la muestra, (3) lisis celular, y (4) extracción del DNA total.

Condiciones de Amplificación

Una persona experta comprenderá que cualesquiera condiciones PCR generalmente aceptables pueden utilizarse para detectar con éxito las bacterias *E. coli* patógenas diana utilizando los oligonucleótidos de la presente invención, y dependiendo de la muestra a testar y otras condiciones de laboratorio, puede ser necesaria una optimización de rutina para las condiciones PCR a fin de conseguir la sensibilidad y especificidad óptimas. Óptimamente, las mismas consiguen productos de amplificación por PCR de todas las dianas específicas propuestas, en tanto que no dan producto PCR alguno para otras especies distintas de la diana.

En una realización preferida, pueden utilizarse los reactivos y condiciones de sometimiento a ciclos siguientes. Se añaden 45 microlitros de lisado a un tubo PCR que contiene una tableta de reactivo BAX® (fabricado por Qualicon, Inc., Wilmington, DE), conteniendo la tableta DNA-polimerasa *Taq*, desoxinucleótidos, SYBR® Green (Molecular Probes, Eugene, OR), y componentes tampón, y 5 microlitros de mezcla de iniciadores, para alcanzar una concentración final en la PCR de 0,150 micromoles de cada iniciador. Condiciones de sometimiento a ciclos de la PCR preferidas: 94°C, 2 min desnaturalización inicial del DNA, seguido por 38 ciclos de 94°C, 15 segundos y reasociación/extensión a 70°C durante 3 minutos.

Detección/Examen/Análisis

Los productos de la amplificación dirigida por iniciadores pueden analizarse utilizando diversos métodos.

Detección homogénea se refiere a un método preferido para la detección de productos de amplificación en el cual no es necesaria separación alguna (por ejemplo por electroforesis en gel) de los productos de amplificación del molde o los iniciadores. La detección homogénea se realiza típicamente por medida del nivel de fluorescencia de la mixtura de reacción en presencia de un tinte fluorescente.

En una realización preferida, se utiliza el análisis de la curva de fusión del DNA para realizar una detección homogénea, particularmente con el hardware del Sistema BAX® y las tabletas de reactivo de Qualicon Inc. Los detalles del sistema se dan en la Patente U.S. No. 6.312.930 y las Publicaciones PCT Núms. WO 97/11197 y WO 00/66777, cada una de las cuales se incorpora en esta memoria por referencia en su totalidad.

El análisis de la curva de fusión detecta y cuantifica la molécula de ácido nucleico bicatenaria ("dsDNA" o "diana") por monitorización de la fluorescencia del producto de amplificación diana ("amplicón diana") durante cada ciclo de amplificación en momentos seleccionados.

Como es bien conocido por los expertos en la técnica, las dos cadenas de un dsDNA se separan o funden, cuando la temperatura es mayor que su temperatura de fusión. La fusión de una molécula de dsDNA es un proceso, y en una condición de solución dada, la fusión comienza a una temperatura (designada en lo sucesivo T_{MS}), y se completa a otra temperatura (designada en lo sucesivo T_{ME}). El término familiar, T_m , designa la temperatura a la cual la fusión se ha completado en un 50%.

Un ciclo PCR típico implica una fase de desnaturalización en la cual el dsDNA diana se funden, una fase de reasociación con iniciadores en la cual la temperatura es la óptima para que los iniciadores se fijen a la diana ahora monocatenaria, y una fase de elongación de cadena (a una temperatura T_E) en la cual la temperatura es óptima para el funcionamiento de la DNA-polimerasa.

De acuerdo con la presente invención, T_{MS} debe ser mayor que T_E , y T_{ME} debe ser más baja (en muchos casos sustancialmente más baja) que la temperatura a la cual la DNA-polimerasa se desactiva por el calor. Las características de fusión se ven afectadas por las propiedades intrínsecas de una molécula de dsDNA dada, tales como la composición de desoxinucleótidos y la longitud del dsDNA.

Se fijarán tintes de intercalación al DNA bicatenario. El complejo tinte/dsDNA emitirá fluorescencia cuando se expone a la longitud de onda de excitación apropiada de la luz, que es dependiente del tinte, y la intensidad de la

fluorescencia puede ser proporcional a la concentración del dsDNA. Se conocen en la técnica métodos que aprovechan la ventaja del uso de tintes de intercalación del DNA para detectar y cuantificar dsDNA. Muchos tintes son conocidos y utilizados en la técnica para estos propósitos. Los presentes métodos aprovechan también la ventaja de dicha relación.

5 Un ejemplo de tales tintes incluye tintes de intercalación. Ejemplos de tales tintes incluyen, pero sin carácter limitante, SYBR Green-I®, bromuro de etidio, yoduro de propidio, TOTO®-1 {Quinolinium, 1,1'-[1,3-propanodiiibis[(dimetiliminio)-3,1-propanodiiil]]bis[4-[(3-metil-2(3H)-benzotiazolilideno)metil]]-, tetrayoduro}, y YoPro® {Quinolinium, 4-[(3-metil-2(3H)-benzoxazolilideno)metil]-1-[3-(trimetilamonio)propil]-, diyoduro}. Es muy preferido para la presente invención un tinte de cianuro no asimétrico tal como SYBR Green-I®, fabricado por Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR).

10 El análisis de la curva de fusión se realiza por monitorización del cambio de fluorescencia mientras se eleva la temperatura. Cuando la temperatura alcanza la T_{MS} específica para el amplicón diana, el dsDNA comienza a desnaturalizarse. Cuando el dsDNA se desnaturaliza, el tinte de intercalación se disocia del DNA y disminuye la fluorescencia. El análisis matemático del valor negativo del cambio del logaritmo de fluorescencia dividido por el cambio en temperatura representado contra la temperatura da como resultado el pico del gráfico conocido como curva de fusión (véase la Figura 6, que ilustra un análisis de la curva de fusión en general).

El proceso de transformación de los datos que se muestra en la Figura 1 implica lo siguiente:

1. Interpolación de los datos para obtener puntos de dato espaciados uniformemente
2. Toma de un logaritmo de la fluorescencia (F)
- 20 3. Alisado de log F
4. Cálculo de $-d(\log F)/dT$
5. Reducción de los datos a 11-13 puntos de datos espaciados con separación de un grado (dependiendo del organismo diana).

25 El presente método de detección homogénea puede utilizarse para detectar y cuantificar dsDNAs diana, a partir de los cuales pueden determinarse la presencia y el nivel de organismos diana. Este método es muy específico y sensible. El número mínimo de dsDNA diana detectables está comprendido entre 1 y 10 en condiciones y volúmenes de reacción típicos.

30 Puede emplearse detección homogénea para realizar amplificaciones de ácido nucleico dirigidas por iniciadores en "tiempo real", utilizando pares de iniciadores de la presente invención (v.g., PCR "en tiempo real" y RT-PCR "en tiempo real"). Métodos "en tiempo real" preferidos se indican en las Patentes U.S. Núms. 6.171.785 y 5.994.056, cada una de las cuales se incorpora en esta memoria por referencia en su totalidad.

Otro método de detección es el método de detección de la nucleasa 5', como se indica en las Patentes U.S. Núms. 5.804.375, 5.538.848, 5.487.972, y 5.210.015, cada una de las cuales se incorpora en esta memoria por referencia en su totalidad.

35 Una diversidad de otros métodos de detección por PCR se conocen en la técnica, con inclusión de electroforesis en gel no desnaturizante estándar (v.g. acrilamida o agarosa), electroforesis en gel de gradiente desnaturizante, y electroforesis en gel de gradiente de temperatura. La electroforesis en gel no desnaturizante estándar es un método simple y rápido de detección por PCR, pero puede no ser adecuada para todas las aplicaciones.

40 La Detección en Gel con Gradiente Desnaturizante (DGGE) es un método de separación que detecta diferencias en el comportamiento de desnaturización de pequeños fragmentos de DNA (200-700 pb). El principio de la separación está basado a la vez en longitud de fragmento y secuencia de nucleótidos. En los fragmentos que son de la misma longitud, puede detectarse una diferencia tan pequeña como un solo par de bases. Esto está en contraste con la electroforesis en gel no desnaturizante, en la cual los fragmentos de DNA se separan únicamente por tamaño. Esta limitación de la electroforesis en gel no desnaturizante se produce como resultado de que la diferencia en densidad de carga entre las moléculas de DNA es aproximadamente neutra y juega un papel escaso en su separación. A medida que aumenta el tamaño del fragmento de DNA, su velocidad a través del gel decrece.

45 La DGGE se utiliza principalmente para separación de fragmentos de DNA del mismo tamaño basada en sus perfiles de desnaturización y su secuencia. Utilizando DGGE, dos cadenas de una molécula de DNA se separan, o funden, cuando se aplica calor o un desnaturizante químico. La desnaturización de un dúplex de DNA se ve influida por dos factores: 1) los enlaces de hidrógeno formados entre los pares de bases complementarios (dado que las regiones ricas en GC funden en condiciones de desnaturización más altas que las regiones que son ricas en AT); y 2) la atracción entre bases vecinas de la misma cadena, o "apilamiento". Por consiguiente, una molécula de DNA puede tener varios dominios de fusión, estando determinada cada una de sus condiciones individuales de desnaturización características por su secuencia nucleotídica. La DGGE aprovecha el hecho de que moléculas de

DNA idénticas por lo demás que tienen la misma longitud y secuencia de DNA, con la excepción de un solo nucleótido dentro de un dominio de desnaturalización específico, se desnaturalizarán a temperaturas o T_m diferentes. Así, cuando el fragmento de DNA bicatenario (ds) se somete a electroforesis a través de un gradiente de desnaturalizante químico creciente, comienza a desnaturalizarse y sufre a la vez cambio de conformación y de movilidad. El fragmento de dsDNA se desplazará más rápidamente que un fragmento de DNA monocatenario (ss) desnaturalizado, dado que la estructura ramificada del resto monocatenario de la molécula queda enredada en la matriz del gel. A medida que aumenta el ambiente desnaturalizante, el fragmento de dsDNA se disociará por completo y la movilidad de la molécula a través del gel se verá retardada a la concentración de desnaturalizante para la cual se disocian los dominios de desnaturalización baja particulares de la cadena de DNA. En la práctica, la electroforesis se conduce a una temperatura constante (alrededor de 60°C) y se utilizan desnaturalizantes químicos a concentraciones que dan como resultado que el 100% de las moléculas de DNA se desnaturalicen (a saber, 40% formamida y urea 7 M). Este gradiente desnaturalizante variable se crea utilizando un promotor de gradiente, tal que la composición de cada gel de DGEE cambia gradualmente desde 0% de desnaturalizante hasta 100% de desnaturalizante. Por supuesto, gradientes que contengan un intervalo reducido de desnaturalizante (v.g., 35% a 60%) pueden añadirse también para separación incrementada del DNA.

El principio utilizado en la DGGE puede aplicarse también a un segundo método que utiliza un gradiente de temperatura en lugar de un gradiente de desnaturalizante químico. Este método se conoce como Electroforesis en Gel con Gradiente de Temperatura (TGGE). Este método hace uso de un gradiente de temperatura para inducir el cambio conformacional de dsDNA a ssDNA para separar fragmentos de igual tamaño con secuencias diferentes. Como en la DGGE, los fragmentos de DNA con secuencias de nucleótidos diferentes se mantendrán inmóviles en diferentes posiciones en el gel. Pueden utilizarse variaciones en el diseño de los iniciadores para obtener la ventaja en el aumento de la utilidad de la DGGE para caracterización e identificación de los productos PCR. Estos métodos y principios de utilización de variaciones en el diseño de iniciadores se describen en PCR Technology Principles y Applications, Henry A. Erlich Ed., M. Stockton Press, NY, páginas 71 a 88 (1988).

Instrumentación

De acuerdo con una realización preferida, se utilizan el sistema BAX® (DuPont Qualicon, Wilmington, DE) y el análisis de la curva de fusión.

Reactivos y kits

Puede utilizarse cualquier composición de replicación de ácido nucleico adecuada ("composición de replicación") en cualquier formato.

Una composición de replicación típica para amplificación por PCR puede comprender, por ejemplo, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, iniciadores específicos diana y una polimerasa adecuada.

Si la composición de replicación está en forma líquida, pueden utilizarse tampones adecuados conocidos en la técnica (Sambrook, J. et al. 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Alternativamente, si la composición de replicación está contenida en una forma de tableta, entonces pueden incluirse reactivos de prensado en tabletas típicos tales como estabilizadores y agentes de fijación. Una tecnología de prensado en tabletas preferida se expone en las patentes U.S. núms. 4.762.857 y 4.678.812, cada una de las cuales se incorpora en esta memoria por referencia en su totalidad.

Una composición de replicación preferida de la presente invención comprende (a) al menos un par de iniciadores seleccionado del grupo constituido por PS1, PS2, PS3, PS4, PS5, y PS6; y (b) DNA-polimerasa termoestable. Más preferiblemente, la composición de replicación comprende a la vez los pares de iniciadores PS2 y PS3, y aún más preferiblemente, a la vez los pares de iniciadores PS2 y PS4.

Un kit preferido de la presente invención comprende (a) al menos un par de iniciadores seleccionado del grupo constituido por PS1, PS2, PS3, PS4, PS5, y PS6; y (b) DNA-polimerasa termoestable. Más preferiblemente, el kit preferido comprende a la vez los pares de iniciadores PS2 y PS3 y, aún más preferiblemente, a la vez los pares de iniciadores PS2 y PS4.

Una tableta preferida de la presente invención comprende (a) al menos un par de iniciadores seleccionado del grupo constituido por PS1, PS2, PS3, PS4, PS5, y PS6; y (b) DNA-polimerasa termoestable. Más preferiblemente, la tableta preferida comprende a la vez los pares de iniciadores PS2 y PS3 y, aún más preferiblemente, a la vez los pares de iniciadores PS2 y PS4. Aún más preferiblemente, un kit de la presente invención comprende la tableta preferida que antecede.

En otra realización preferida, una composición de replicación contiene un control interno positivo. Las ventajas de un control interno positivo contenidas en una reacción PCR han sido descritas previamente (Patente U.S. No. 6.312.930 y Solicitud PCT No. WO 97/11197, cada una de las cuales se incorpora en esta memoria por referencia en su totalidad), e incluyen: (i) el control puede amplificarse utilizando un solo iniciador; (ii) la cantidad del producto de

amplificación de control es independiente de cualquier DNA o RNA diana contenido en la muestra; (iii) el DNA de control puede prensarse en tabletas con otros reactivos de amplificación para facilidad de uso y alto grado de reproducibilidad en procedimientos de test tanto manuales como automáticos; (iv) el control puede utilizarse con detección homogénea, es decir, sin separación del producto DNA de las sustancias reaccionantes; y (v) el control interno tiene un perfil de fusión que es distinto de otros productos de amplificación potenciales en la reacción.

El DNA de control será de un tamaño y composición de bases apropiados para permitir la amplificación en una reacción de amplificación dirigida por iniciadores. La secuencia de DNA de control puede obtenerse a partir del genoma de *E. coli*, o de otra fuente, pero tiene que amplificarse reproduciblemente en las mismas condiciones que permiten la amplificación del producto de amplificación diana.

La reacción de control es útil para validar la reacción de amplificación. La amplificación del DNA de control ocurre en el mismo tubo de reacción que la muestra que está siendo testada, y por tanto indica una reacción de amplificación exitosa cuando las muestras son negativas respecto a la diana, es decir cuando no se produce cantidad alguna de producto de amplificación. Con objeto de conseguir una validación significativa de la reacción de amplificación, tiene que incluirse un número adecuado de copias del DNA de control en cada reacción de amplificación.

En algunos casos, puede ser útil incluir una composición de replicación de control negativa adicional. La composición de replicación de control negativa contendrá los mismos reactivos que la composición de replicación pero sin la polimerasa. La función primaria de un control de este tipo es monitorizar la fluorescencia de fondo espuria en un formato homogéneo cuando el método emplea un medio de detección fluorescente.

Las composiciones de replicación pueden modificarse dependiendo de si están diseñadas para ser utilizadas a fin de amplificar el DNA diana o el DNA de control. Las composiciones de replicación que amplificarán el DNA diana (composiciones de replicación de test) pueden incluir (i) una polimerasa (generalmente termoestable), (ii) un par de iniciadores capaz de hibridarse al DNA diana y (iii) tampones necesarios para que transcurra la reacción de amplificación. Composiciones de replicación que amplificarán el DNA de control (control positivo, o composición de replicación positiva) pueden incluir (i) una polimerasa (generalmente termoestable) (ii) el DNA de control; (iii) al menos un iniciador capaz de hibridarse al DNA de control; y (iv) tampones necesarios para que transcurra la reacción de amplificación.

Métodos de Hibridación de Ácidos Nucleicos

Sondas particularmente útiles en los métodos de hibridación de ácido nucleico son cualesquiera de SEQ ID NOs: 1-17 o secuencias derivadas de las mismas.

Los componentes básicos de un test de hibridación de ácido nucleico incluyen una sonda, una muestra que se sospecha contiene *E. coli* patógeno, y un método de hibridación específico. Las sondas son secuencias de ácido nucleico monocatenario que son complementarias a las secuencias de ácido nucleico a detectar. Las sondas son "hibridables" a la secuencia de ácido nucleico a detectar. Típicamente, la longitud de la sonda puede variar desde tan pocas como 5 bases a la longitud total de la secuencia de diagnóstico de *E. coli* y dependerán del test específico a realizar. Únicamente parte de la molécula de sonda precisa ser complementaria a la secuencia de ácido nucleico a detectar. Adicionalmente, no es preciso que la complementariedad entre la sonda y la secuencia diana sea perfecta. La hibridación ocurre de hecho entre moléculas imperfectamente complementarias, con el resultado de que cierta fracción de las bases en la región hibridada no están apareadas con la base complementaria apropiada. Una sonda puede estar compuesta de RNA o DNA. La forma de la sonda de ácido nucleico puede ser una molécula monocatenaria marcada de una sola polaridad o una molécula monocatenaria marcada que tenga ambas polaridades presentes. La forma de la sonda, al igual que su longitud, estará determinada por el tipo de test de hibridación a realizar.

La muestra puede contener o no *E. coli* patógeno. La muestra puede tomar una diversidad de formas; sin embargo, generalmente se extraerá de una fuente animal, ambiental o alimentaria sospechosa de contaminación.

El DNA puede detectarse directamente, pero de modo más preferible, el ácido nucleico muestra tiene que estar disponible para ponerse en contacto con la sonda antes que pueda ocurrir cualquier hibridación de la sonda y la molécula diana. Así, el DNA del organismo tiene que liberarse de la célula y ponerse en las condiciones apropiadas antes que pueda ocurrir la hibridación. Los métodos de hibridación en solución precisan la purificación del DNA a fin de que pueda lograrse la hibridación del DNA muestra con la sonda. Esto significa que la utilización del método en solución para detección de secuencias diana en una muestra requiere que los ácidos nucleicos de la muestra tienen que purificarse primeramente para eliminar proteínas, lípidos, y otros componentes celulares, y ponerse luego en contacto con la sonda en condiciones de hibridación. Métodos para la purificación del ácido nucleico muestra son comunes y bien conocidos en la técnica (Maniatis, *supra*).

Análogamente, los métodos de hibridación están bien definidos. Típicamente, la sonda y la muestra tienen que mezclarse en condiciones que permitan la hibridación del ácido nucleico. Esto implica poner en contacto la sonda y la muestra en presencia de una sal inorgánica u orgánica en las condiciones apropiadas de concentración y temperatura. La sonda y los ácidos nucleicos muestra tienen que estar en contacto durante un periodo de tiempo lo suficientemente largo para que pueda ocurrir cualquier posible hibridación entre la sonda y el ácido nucleico

muestra. La concentración de sonda o diana en la mixtura determinará el tiempo necesario para que ocurra la hibridación. Cuanto mayor es la concentración de sonda o diana, tanto más corto es el tiempo de incubación necesario para la hibridación.

5 En una realización preferida, los ensayos de hibridación pueden conducirse directamente sobre lisados de células, sin necesidad de extraer los ácidos nucleicos. Esto elimina varios pasos del proceso de manipulación de la muestra y acelera el ensayo. Para realizar tales ensayos sobre lisados de células brutos, se añade típicamente un agente caotrópico a los lisados de células preparados como se ha descrito arriba. El agente caotrópico estabiliza los ácidos nucleicos por inhibir la actividad de las nucleasas. Adicionalmente, el agente caotrópico permite una hibridación sensible y rigurosa de las sondas oligonucleotídicas cortas al DNA a la temperatura ambiente (Van Ness y Chen, *Nucl. Acids Res.* 19:5143-5151 (1991)). Agentes caotrópicos adecuados incluyen cloruro de guanidinio, tiocianato de guanidinio, tiocianato de sodio, tetracloroacetato de litio, perclorato de sodio, tetracloroacetato de rubidio, yoduro de potasio, y trifluoroacetato de cesio, entre otros. Típicamente, el agente caotrópico estará presente a una concentración final de aproximadamente 3 M. Si se desea, puede añadirse formamida a la mixtura de hibridación, típicamente 30-50% (v/v).

15 Alternativamente, los ácidos nucleicos muestra pueden purificarse antes de la hibridación de la sonda. Una diversidad de métodos son conocidos por un experto en la técnica (v.g., extracción con fenol-cloroformo, extracción IsoQuick (MicroProbe Corp., Bothell, WA), y otros). La purificación previa a la hibridación es particularmente útil para ensayos de hibridación estándar en filtro. Adicionalmente, la purificación facilita las medidas para aumentar la sensibilidad del ensayo por incorporación de métodos de amplificación de RNA *in vitro* tales como replicación autónoma de secuencias (véase por ejemplo Fahy et al., en PCR Methods y Applications, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1991), pp. 25-33) o Reverse Transcriptase PCR (Kawasaki, en PCR Protocols: A Guide to Methods y Applications, M. A. Innis et al., Eds., (1990), pp. 21-27).

20 Una vez que se libera el DNA, el mismo puede detectarse por cualquiera de una diversidad de métodos. Sin embargo, las realizaciones más útiles tienen al menos ciertas características de velocidad, conveniencia, sensibilidad, y especificidad.

25 Pueden emplearse diversas soluciones de hibridación. Típicamente, éstas comprenden desde aproximadamente 20 a 60% en volumen, preferiblemente 30%, de un disolvente orgánico polar. Una solución de hibridación común emplea aproximadamente 30-50% v/v formamida, aproximadamente 0,15 a 1 M cloruro de sodio, aproximadamente 0,05 a 0,1 M tampones, tales como citrato de sodio, Tris-HCl, PIPES o HEPES (intervalo aproximado de pH 6-9), aproximadamente 0,05 a 0,2% detergente, tal como dodecilsulfato de sodio, o entre 0,5 y 20 mM EDTA, FICOLL (Pharmacia Inc.) (aproximadamente 300-500 kilodaltons), polivinilpirrolidona (aproximadamente 250-500 kdal), y seroalbúmina. Se incluirán también en la solución de hibridación típica ácidos nucleicos portadores sin marcar desde aproximadamente 0,1 a 5 mg/ml, DNA nucleico fragmentado (v.g., DNA de timo de ternero o de esperma de salmón, o RNA de levadura), y de modo opcional desde aproximadamente 0,5 a 2% p/v glicina. Pueden incluirse también otros aditivos, tales como agentes de volumen de exclusión que incluyen una diversidad de agentes solubles o hinchables en agua (v.g. polietilenglicol), polímeros aniónicos (v.g., poliacrilato o polimetacrilato), y polímeros aniónicos sacáridos (v.g., sulfato de dextrano).

30 La hibridación de ácidos nucleicos es adaptable a una diversidad de formatos de ensayo. Uno de los más adecuados es el formato de ensayo sándwich. El ensayo sándwich es particularmente adaptable para hibridación en condiciones no desnaturalizantes. Un componente primario de un ensayo de tipo sándwich es un soporte sólido. El soporte sólido tiene adsorbida en él o unida covalentemente al mismo una sonda de ácido nucleico inmovilizada que está sin marcar y es complementaria a una porción de la secuencia de DNA.

35 El ensayo sándwich puede realizarse en un kit de ensayo. Este kit podría incluir un primer componente para la recogida de muestras sospechosas de contaminación y tampones para la distribución y lisis de la muestra. Un segundo componente podría incluir medios en forma seca o forma líquida para la hibridación de los polinucleótidos diana y sonda, así como para la eliminación por lavado de formas indeseables y no dúplex. Un tercer componente incluye un soporte sólido (varilla de inmersión) sobre el cual se fijan (o al cual está(n) conjugada(s)) una o más sondas de ácido nucleico sin marcar que es/son complementarias a una parte del genoma de *E. coli*. Un cuarto componente contendría una sonda marcada que es complementaria a una región segunda y diferente de la misma cadena de DNA a la que se hibrida la sonda de ácido nucleico inmovilizada y sin marcar del tercer componente.

40 En otra realización preferida, pueden utilizarse SEQ ID NOs: 1-17 o derivados de las mismas como sondas de detección bloqueadas en 3' en un formato de ensayo homogéneo o heterogéneo. Por ejemplo, una sonda generada a partir de estas secuencias puede estar bloqueada en 3' o ser no-participativo, y no se extenderá por, o participará en, una reacción de amplificación de ácido nucleico. Adicionalmente, la sonda incorpora un marcador que puede servir como ligando reactivo que actúa como punto de fijación para la inmovilización del híbrido sonda/análito o como informador para producir una señal detectable. De acuerdo con ello, DNA genómico o cDNA aislado de una muestra sospechosa de contaminación con *E. coli*, se amplifica por protocolos de amplificación estándar dirigidos por iniciadores en presencia de un exceso de la sonda de detección bloqueada en 3' para producir productos de amplificación. Dado que la sonda está bloqueada en 3', no participa o interfiere con la amplificación de la diana.

Después del ciclo de amplificación final, la sonda de detección se reasocia a la porción relevante del DNA amplificado, y el complejo reasociado es capturado luego en un soporte por el ligando reactivo.

5 En algunos casos es deseable incorporar un dNTP marcado con ligando, con la sonda marcadora en la composición de replicación para facilitar la inmovilización del producto de reacción PCR en un soporte y la detección posterior del producto inmovilizado por medio del reactivo sonda marcado. Por ejemplo, un dNTP marcado con biotina, digoxigenina o digoxina podría añadirse a la composición de la reacción PCR. La biotina o digoxina incorporada en el producto PCR podría inmovilizarse luego respectivamente sobre un soporte de anticuerpo estreptavidina, anti-digoxina o antidigoxigenina. El producto PCR inmovilizado podría detectarse después por la presencia del marcador de la sonda.

10 Las sondas de la presente invención pueden diseñarse en varias formas alternativas. El extremo 3' de la sonda se bloquea para impedir su participación en una reacción de extensión con iniciadores por la fijación de un resto inhibidor de la replicación. Restos inhibidores de replicación típicos incluirán, pero sin carácter limitante: didesoxinucleótidos, 3-desoxinucleótido, una secuencia de nucleósidos o nucleótidos apareados erróneamente, grupos 3'-fosfato y agentes químicos. Se prefiere emplear cordicepina (3'-desoxiadenosina).

15 El inhibidor de la replicación está unido covalentemente al grupo 3'-hidroxi del nucleótido 3'-terminal de la sonda no participativo durante la síntesis química, utilizando química estándar de cianoetil-fosforamido. Este proceso utiliza química de síntesis en fase sólida en la cual el extremo 3' está unido covalentemente a un soporte insoluble (vidrio de poro controlado, o "CPG") mientras que la cadena recién sintetizada crece en el término 5'. Los 3-desoxirribonucleótidos son los inhibidores de replicación preferidos. Es muy preferida la cordicepina (3-desoxiadenosina).
 20 Dado que la cordicepina se unirá al extremo 3'-terminal de la sonda, la síntesis se inicia desde una cordicepina unida covalentemente a CPG, 5-dimetoxitritil-N-benzoil-3-desoxiadenosina (cordicepina), 2-succinil-alquilamino de cadena larga-CPG (Glen Research, Sterling, VA). Se retira el grupo dimetoxitritilo y la iniciación de la síntesis de la cadena comienza en el grupo 5' hidroxilo desprotegido de la cordicepina de fase sólida. Después de completarse la síntesis, la sonda oligonucleotídica se escinde del soporte sólido dejando un grupo 2'-hidroxilo libre en la cordicepina unida en el terminal 3'.
 25 Pueden unirse también otros reactivos al término 3' durante la síntesis de la sonda no participativa para servir como inhibidores de la replicación. Éstos incluyen, pero sin carácter limitante: otros 3-desoxirribonucleótidos, biotina, dinitrofenol, fluoresceína, y digoxigenina. Cada uno de estos reactivos están derivatizados también sobre soportes CPG (Glen Research; Clontech Laboratories, Palo Alto, CA).

Ejemplos

30 La presente invención se define adicionalmente en los ejemplos siguientes. Debe entenderse que estos ejemplos, si bien indican realizaciones preferidas de la invención, se dan únicamente a modo de ilustración.

Métodos Generales y Materiales Utilizados en los Ejemplos

35 Los materiales y métodos adecuados para el mantenimiento y crecimiento de cultivos bacterianos son bien conocidos en la técnica. Métodos adecuados para uso en los ejemplos siguientes pueden encontrarse en Manual of Methods for Genus Bacteriology (Phillipp Gerhardt, R. G. E. Murray, Ralph N. Costilow, Eugene W. Nester, Willis A. Wood, Noel R. Krieg y G. Briggs Phillips, eds.), American Society for Microbiology, Washington, DC (1994) o Thomas D. Brock en Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, Second Edition (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA o Bacteriological Analytical Manual. 6th Edition, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA (1984).

40 El medio utilizado para cultivar las cepas patógenas de *E. coli* y cepas no diana comparativas fue caldo de Infusión Cerebro-Corazón (BHI) obtenido de BBL (Becton-Dickenson). Se obtuvieron muestras de cepas patógenas de *E. coli* de cultivos desarrollados durante una noche en caldo BHI y se diluyeron luego a aproximadamente 10^6 cfu/ml en agua con 0,1% de peptona. Las muestras de las cepas comparativas no-diana se enriquecieron en BHI hasta aproximadamente 10^9 cfu/ml.

45 Los iniciadores (SEQ ID NOs: 2, 3, 5, 6, 8, 9 10, 11) fueron preparados por Sigma-Genosys, Woodlands, TX.

Los reactivos que se utilizaron en la PCR eran de BAX® System Reagent Tablet Kits (DuPont Qualicon, Wilmington, DE) e incluyen SYBR® Green (Molecular Probes, Eugene, OR), DNA- Polimerasa *Taq* (Applied Biosystems, 30 Foster City, CA), desoxinucleótidos (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), y tampón (EM Science, New Jersey).

50 Todas las reacciones PCR se llevaron a cabo utilizando un sistema BAX® estándar (DuPont Qualicon, Wilmington, DE).

El significado de las abreviaturas es como sigue: "h" significa hora(s), "min" significa minuto(s), "sec" significa segundo(s), "d" día(s), "ml" significa mililitros.

Ejemplos 1-3

Amplificación de Fragmentos de DNA Especificos de *E. Coli* Patógeno

Se diseñaron tres Juegos de Iniciadores (PS1, PS2, PS3) basados en el análisis de secuencia de una región del genoma de *E. coli* O157:H7. Un Juego de Iniciadores (PS4) es una modificación de PS3 que no altera la especificidad pero sí altera la temperatura de fusión del producto amplificado. Búsquedas a ráfagas de la base de datos NCBI revelaron la ausencia de homologías de secuencia significativas con genes de función conocida. El diseño de los iniciadores no se vio ayudado por ningún programa de software.

5

Se testaron las condiciones de sometimiento a ciclos siguientes con los juegos de iniciadores arriba mencionados: 94°C, 2 min desnaturalización inicial del DNA, seguido por 38 ciclos de 94°C, 15 segundos y reasociación/extensión a 70°C durante 3 minutos.

10

Se testaron cepas múltiples de *E. coli* de serotipos patógenos y no patógenos.

La determinación de la presencia de SEQ ID NO: 1 es una PCR positiva realizada con el Juego de Iniciadores 1 (PS1), y el análisis de la curva de fusión del DNA como se ha mencionado arriba. Una reacción positiva para el Juego de Iniciadores 1 (PS1) dio como resultado la aparición de un pico en la curva de fusión a aproximadamente 83°C. La Figura 2 muestra un análisis representativo de curva de fusión para un *E. coli* patógeno positivo para el producto de amplificación diana (SEQ ID NO: 1) amplificado con el Juego de Iniciadores 1 (PS1).

15

La determinación de la presencia de SEQ ID NO: 4 es una PCR positiva realizada con el Juego de Iniciadores 2 (PS2) y análisis de la curva de fusión del DNA como se ha mencionado arriba. Una reacción positiva para el Juego de Iniciadores 2 (PS2) dio como resultado la aparición de un pico en la curva de fusión a aproximadamente 88°C. La Figura 3 muestra un análisis de curva de fusión representativo para un *E. coli* patógeno positivo para el producto de amplificación diana (SEQ ID NO: 4) amplificado con el Juego de Iniciadores 2 (PS2).

20

La determinación de la presencia de SEQ ID NO: 7 es una PCR positiva realizada con el Juego de Iniciadores 3 (PS3) y análisis de la curva de fusión del DNA como se ha mencionado arriba. Una reacción positiva para el Juego de Iniciadores 3 (PS3) dio como resultado la aparición de un pico en la curva de fusión a aproximadamente 80°C. La Figura 4 muestra un análisis de curva de fusión representativo para un *E. coli* patógeno positivo para el producto de amplificación diana (SEQ ID NO: 7) amplificado con el Juego de Iniciadores 3 (PS3).

25

La determinación de la presencia de SEQ ID NO: 7 es una PCR positiva realizada con el Juego de Iniciadores 4 (PS4) y análisis de la curva de fusión del DNA como se ha mencionado arriba. Una reacción positiva para el Juego de Iniciadores 4 (PS4) dio como resultado la aparición de un pico en la curva de fusión a aproximadamente 83°C, debido a las pinzas CC (como se ha explicado arriba, el Juego de Iniciadores PS4 es el Juego de Iniciadores PS3 con pinzas GC). La Figura 5 muestra un análisis de curva de fusión representativo para un *E. coli* patógeno positivo amplificado con el Juego de Iniciadores 4 (PS4).

30

Los resultados completos se exponen en la Tabla II (PS1, Ejemplo 1), Tabla III (PS2, Ejemplo 2), y Tabla IV (PS3 o PS4, Ejemplo 3).

TABLA 2

Resultados para SEQ ID NO: 1 por PCR con el Juego de Iniciadores PS1 (Ejemplo 1)			
Serotipo <i>E.coli</i> * denota patógeno	No. Total de Cepas testadas	No. de Producto PCR Positivo	No. de Producto PCR Negativo
O157:H7*	112	112	0
O157:HNM*	3	3	0
O55:H7*	3	3	0
O26:H11*	9	8	1
O091:1421*	1	0	1
O91:111\114*	1	0	1
O113:H11*	3	0	3
O146:H21*	2	0	2
O45:H2*	2	0	2
O103:H2*	2	0	2

ES 2 380 630 T3

Resultados para SEQ ID NO: 1 por PCR con el Juego de Iniciadores PS1 (Ejemplo 1)			
Serotipo <i>E. coli</i> * denota patógeno	No. Total de Cepas testadas	No. de Producto PCR Positivo	No. de Producto PCR Negativo
O125:HNM*	2	0	2
O5:HNM*	2	0	2
O145:HNM*	3	2	1
O1:H7	1	0	1
O113:H7	1	0	1
O2:H7	1	0	1
O25:H7	1	0	1
O157:H19	1	0	1
O55:H10	1	0	1

TABLA 3

Resultados para SEQ ID NO: 4 por PCR con el Juego de Iniciadores PS2 (Ejemplo 2)			
Serotipo <i>E. coli</i> *denota patógeno	No. Total de Cepas Testadas	No. de Producto PCR Positivo	No. de Producto PCR Negativo
O157:H7*	112	112	0
O157:HNM*	3	3	0
O55:H7*	4	4	0
O26:H11*	11	10	1
O26:HNM	1	1	0
O91:H21*	1	0	1
O91:HNM*	1	0	1
O113:H11*	3	0	3
O146:H21*	2	0	2
O45:H2*	2	0	2
O103:H2*	2	0	2
O125:HNM*	2	0	2
O5:HNM*	2	0	2
O145:HNM*	3	2	1
O111:HNM*	3	2	1
Los aislados no patógenos representan cada uno uno de 93 serotipos diferentes	93	0	93

TABLA 4

Resultados para SEQ ID NO: 7 diana por PCR con el Juego de Iniciadores PS3 o PS4 (Ejemplo 3)			
Serotipo <i>E. coli</i> * denota patógeno	No. Total de Cepas Testadas	No. de Producto PCR Positivo	No. de Producto PCR Negativo

ES 2 380 630 T3

O157:H7*	112	112	0
O157:HNM*	3	3	0
O55:H7*	4	4	0
O26:H11*	11	0	11
O26:HNM	1	0	1
O91:H21*	1	0	1
O91:HNM*	1	0	1
O113:H11*	3	0	3
O146:H21*	2	0	2
O45:H2*	2	0	2
O103:H2*	2	0	2
O125:HNM*	2	0	2
O5:HNM*	2	0	2
O145:HNM*	3	0	3
O111:HNM*	3	0	3
Los aislados no patógenos representan cada uno uno de 93 serotipos diferentes	93	0	93

Ejemplo 4

Uso de Juegos de Iniciadores Múltiples y un Control Interno en la Misma Reacción PCR

5 La Figura 5 muestra una muestra en la cual se añadió un control interno positivo. El control interno positivo funde a aproximadamente 77-78°C, que es fácilmente distinguible de los amplicones de *E. coli* patógeno de dos juegos de iniciadores empleados, a saber, el Juego de Iniciadores 4 (PS4) (en lugar del Juego de Iniciadores 3 (PS3) para la detección de SEQ ID NO: 7), dando como resultado un pico en la curva de punto de fusión a aproximadamente 83°C, y el Juego de Iniciadores 1 (PS2) para detección de SEQ ID NO: 4, dando como resultado un pico en la curva de punto de fusión a aproximadamente 88°C.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Qualicon, Inc.

<120> SECUENCIAS DE DNA PARA LA DETECCIÓN DE Y DIFERENCIACIÓN ENTRE E. COLI PATÓGENOS

<130> MD6666

<140>
<141>

<150> 60/583,296
<151> 2004-06-25

<160> 17

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 138
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<220>
<221> característica diversa
<222> (1)..(138)
<223> específica para los serotipos O157:H7, O157:HNM, O55:H7, O26:H11, u O145HNM

<400> 1
acaataactcg tactttcgaa agttcgctaa ccaggtgcta cacgcgaggt gttgcagttt 60
tcctttacgat ttatcattca atcctaatacc atgcatgaca tgtggtgcct gtgggggtgat 120
cctacactag taatgtgg 138

<210> 2
<211> 27
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<220>
<221> característica diversa
<222> (1)..(27)
<223> iniciador PCR 5' para SEQ ID NO:1

<400> 2
acaataactcg tactttcgaa agttcgc 27

<210> 3
<211> 24
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<220>
<221> característica diversa
<222> (1)..(24)
<223> iniciador PCR 3' para SEQ ID NO:1

<400> 3
ccacattacg taggtaggat cacc 24

<210> 4
<211> 464
<212> DNA
<213> Escherichia coli

ES 2 380 630 T3

<220>
 <221> característica diversa
 <222> (1)..(464)
 <223> específica para los serotipos O157:H7, O157:HNM, O55:H7, O26:H11, O26:HNM, O145HNM, u O111HNM
 <400> 4
 caaggcgatt ctttgtcttc ttgcactaat tttttatcat aaaaatgttc cttagcactgg 60
 gcatcaatat cgcaggtcag aaagagctcc tggggatgcg gctggccgaa aatgaagggg 120
 cgaatttctg gttcaatgtg ctgactgaac tgaaaaaccg cggctctgac gatatactca 180
 tgcctctgtg gtatggcctg aaagaattcc cggaggcccg catccagtta tgcactcgtc 240
 atatgggtgc caacagcatg cgcttcgtgt catggaagga atacaaagcc gtcactcgcg 300
 acctgaaagc gattagcctc ccacagaaga ggcaggccag caggcactgg aagcgtttgc 360
 tgcggcctgg gactgccgct atccgcagat aagccgggtc tagctgtcaa actggactaa 420
 cttggcgacg tttttcgctt atccggcaga tatccgcaaa gtga 464

<210> 5
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> característica diversa
 <222> (1)..(25)
 <223> iniciador PCR 5' para SEQ ID NO:4
 <400> 5
 caaggcgatt ctttgtcttc ttgcac 26

<210> 6
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> característica diversa
 <222> (1)..(27)
 <223> iniciador PCR 3' para SEQ ID NO:4
 <400> 6
 tcactttgcg gatatactgcc ggataag 27

<210> 7
 <211> 163
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> característica diversa
 <222> (1)..(162)
 <223> específica para los serotipos O157:H7, O157:HNM, u O55:H7
 <400> 7
 tattaagaga ttgcaaagac attaaaggtg gggatgaagag gaaaagaaag aaggttgcgt 60
 taaacacatg ttatatagaa gaagtgcctg catcctgctc agagcttggg tttcgaactg 120
 acaaaatgaa aaatttaaca cagatttaac tcatgctctt gcc 163

<210> 8
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> característica diversa

ES 2 380 630 T3

<222> (1)..(29)
 <223> iniciador PCR 5' para SEQ ID NO:7

 <400> 8
tattaagaga ttgcaaagac attaagggt 29

 <210> 9
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

 <220> característica diversa
 <221> (1)..(25)
 <222> iniciador PCR 3' para SEQ ID NO:7

 <400> 9
ggcaagagca tgaattaaat ctgtg 25

 <210> 10
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

 <220> característica diversa
 <221> (13)..(41)
 <222> iniciador PCR 5' para SEQ ID NO:7

 <400> 10
ggcggcggcg gctattaaga gattgcaaag acattaaggg t 41

 <210> 11
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

 <220> característica diversa
 <221> (10)..(34)
 <222> iniciador PCR 3' para SEQ ID NO:7

 <400> 11
ggcggcggcg gcaagagcat gaattaaatc tgtg 34

 <210> 12
 <211> 151
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

 <220> característica diversa
 <221> (1)..(150)
 <222> específica para el serotipo O157:H7

 <400> 12
aaaagttgcc gtttgcgtag aatgtagaca aaagcgtggt gtcaaggagg ggaggttaac 60
gtcatagtga agaggagtgg tggcaccgat caggatcatga tgtagtggaa gtcctggag 120
gtgagcaggc agggcaagat tacgaaagcc c 151

 <210> 13
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

ES 2 380 630 T3

<220>
 <221> característica diversa
 <222> (1)..(27)
 <223> iniciador PCR 5' para SEQ ID NO:12
 <400> 13
 aaaagttagc gtttgcgtag aatgtag 27

<210> 14
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli
 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (1)..(25)
 <223> iniciador PCR 3' para SEQ ID NO:12
 <400> 14
 gggctttcgt aatcttgccc tgcctg 26

<210> 15
 <211> 177
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli
 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (1)..(190)
 <223> específica para el serotipo O157:H7
 <400> 15
 catatctcca gccgccagtg tcgatgtggc acttatctgt gaacttgatg aacaatggag 60
 ttttgcgaa aacaaagctc gtcagcagtg gcactggtag gcgtataaga ccaaagctga 120
 cgggtgctg gcttacatt ttggcctcg cactgatgaa acatgccgtg agttgcc 177

<210> 16
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli
 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (1)..(24)
 <223> iniciador PCR 5' para SEQ ID NO:15
 <400> 16
 catatctcca gccgccagtg tcga 24

<210> 17
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli
 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (1)..(26)
 <223> iniciador PCR 3' para SEQ ID NO:15
 <400> 17
 gcttcaggaa ttccggcaac tcacgg 26

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para detectar la presencia de *E. coli* patógeno en una muestra, comprendiendo el método:
- (a) realizar amplificación por PCR de la muestra utilizando un par de iniciadores seleccionado del grupo constituido por:
- 5 (i) SEQ ID NOs: 2 y 3,
(ii) SEQ ID NOs: 5 y 6,
(iii) SEQ ID NOs: 8 y 9,
(iv) SEQ ID NOs: 10 y 11,
(v) SEQ ID NOs: 13 y 14, y
- 10 (vi) SEQ ID NOs: 16 y 17,
para producir un resultado de amplificación por PCR; y
- (b) examinar el resultado de la amplificación por PCR del paso (a) para detectar un producto de amplificación del par de iniciadores, en cuyo caso una detección positiva del producto de amplificación del par de iniciadores indica la presencia de *E. coli* patógeno en la muestra.
- 15 2.- El método de la reivindicación 1, en donde el par de iniciadores se selecciona del grupo constituido por (a)(ii), (a)(iii), y (a)(iv).
- 3.- El método de la reivindicación 1, en donde el par de iniciadores comprende (a)(ii).
- 4.- El método de la reivindicación 1, en donde el par de iniciadores comprende (a)(iii).
- 5.- El método de la reivindicación 1, en donde el par de iniciadores comprende (a)(iv).
- 20 6.- Un método para detectar la presencia de *E. coli* patógeno en una muestra, comprendiendo el método:
- (a) realizar la amplificación por PCR de la muestra utilizando dos pares de iniciadores diferentes seleccionados del grupo constituido por:
- (i) SEQ ID NOs: 2 y 3,
(ii) SEQ ID NOs: 5 y 6,
- 25 (iii) SEQ ID NOs: 8 y 9,
(iv) SEQ ID NOs: 10 y 11,
(v) SEQ ID NOs: 13 y 14, y
(vi) SEQ ID NOs: 16 y 17,
para producir un resultado de amplificación por PCR; y
- 30 (b) examinar el resultado de la amplificación por PCR del paso (a) para detectar productos de amplificación de los dos pares de iniciadores, en cuyo caso una detección positiva de los productos de amplificación de los dos pares de iniciadores diferentes indica la presencia de *E. coli* patógeno en la muestra.
- 7.- El método de la reivindicación 6, en donde los dos pares de iniciadores comprenden (a)(ii) y (a)(iv).
- 8.- El método de la reivindicación 6, en donde los dos pares de iniciadores comprende (a)(ii) y (a)(iii).
- 35 9.- El método de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde en el paso (b) se utiliza un análisis de curva de fusión para detectar el producto de amplificación.
- 10.- El método de las reivindicaciones 1 ó 2, que comprende adicionalmente un paso de preparación de la muestra para amplificación por PCR antes de dicho paso (a).
- 40 11.- El método de la reivindicación 10, en donde dicho paso de preparación comprende al menos uno de los procesos siguientes: (1) enriquecimiento en bacterias, (2) separación de las células bacterianas de la muestra, (3) lisis celular, y (4) extracción del DNA total.

12.- El método de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde la muestra comprende una muestra de alimentos o una muestra de agua.

13.- El método de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde la muestra comprende una matriz de alimentos enriquecida selectivamente.

5 14.- Un polinucleótido aislado para detección de *E. coli* patógeno que comprende SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, o SEQ ID NO:17.

15.- Un kit para detección de *E. coli* patógeno, que comprende:

(a) al menos un par de iniciadores seleccionados del grupo constituido por:

- 10 (i) SEQ ID NOs: 2 y 3,
(ii) SEQ ID NOs: 5 y 6,
(iii) SEQ ID NOs: 8 y 9,
(iv) SEQ ID NOs: 10 y 11,
(v) SEQ ID NOs: 13 y 14, y
15 (vi) SEQ ID NOs: 16 y 17; y

(b) DNA-polimerasa termoestable.

16.- El kit de la reivindicación 15, en donde el componente (a) comprende a la vez (a)(ii) y (a)(iv).

17.- El kit de la reivindicación 15, en donde el componente (a) comprende a la vez (a)(ii) y (a)(iii).

18.- Una composición de replicación para uso en la realización de una PCR, que comprende:

20 (a) al menos un par de iniciadores seleccionados del grupo constituido por:

- (i) SEQ ID NOs: 2 y 3,
(ii) SEQ ID NOs: 5 y 6,
(iii) SEQ ID NOs: 8 y 9,
(iv) SEQ ID NOs: 10 y 11,
25 (v) SEQ ID NOs: 13 y 14, y
(vi) SEQ ID NOs: 16 y 17, y

(b) DNA-polimerasa termoestable.

19.- La composición de replicación de la reivindicación 18, en donde el componente (a) comprende a la vez (a)(ii) y (a)(iv).

30 20.- La composición de replicación de la reivindicación 18, en donde el componente (a) comprende a la vez (a)(ii) y (a)(iii).

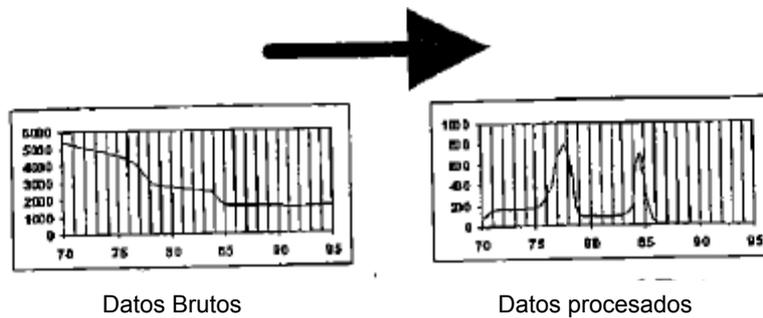
21.- Una tableta que comprende la composición de replicación de la reivindicación 18, 19, ó 20.

22.- Un kit para detección de *E. coli* patógeno en una muestra, que comprende la tableta de la reivindicación 21.

FIG. 1

Mecanismo del análisis de la curva de fusión

Transformación de los datos



Las transformaciones de los datos implican lo siguiente:

1. Interpolación de los datos para obtener puntos de datos espaciados uniformemente
2. Toma del logaritmo de la fluorescencia (F)
3. Alisar log F
4. Calcular $-d(\log F)/dT$ **$-d_F/d_T$**
5. Reducción de los datos a 11-13 puntos de datos espaciados con un grado de separación dependiendo del organismo diana

FIG. 2

CURVA DE FUSIÓN DE SEQ ID NO: 1 AMPLIFICADA POR PS1

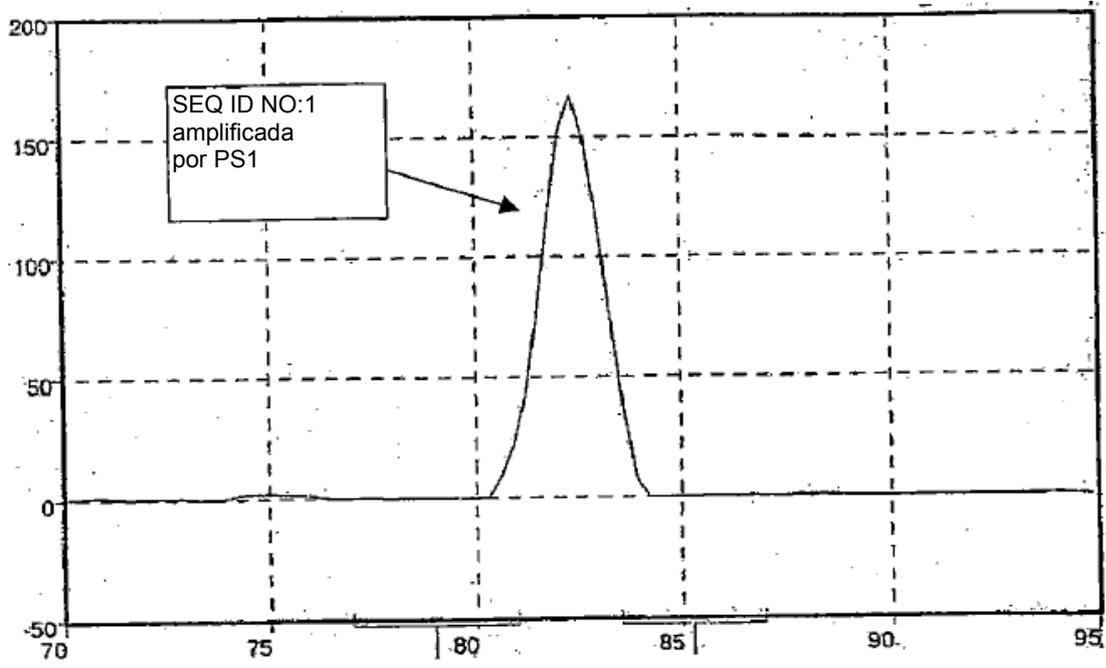


FIG. 3

CURVA DE FUSIÓN DE SEQ ID NO: 4 AMPLIFICADA POR PS2

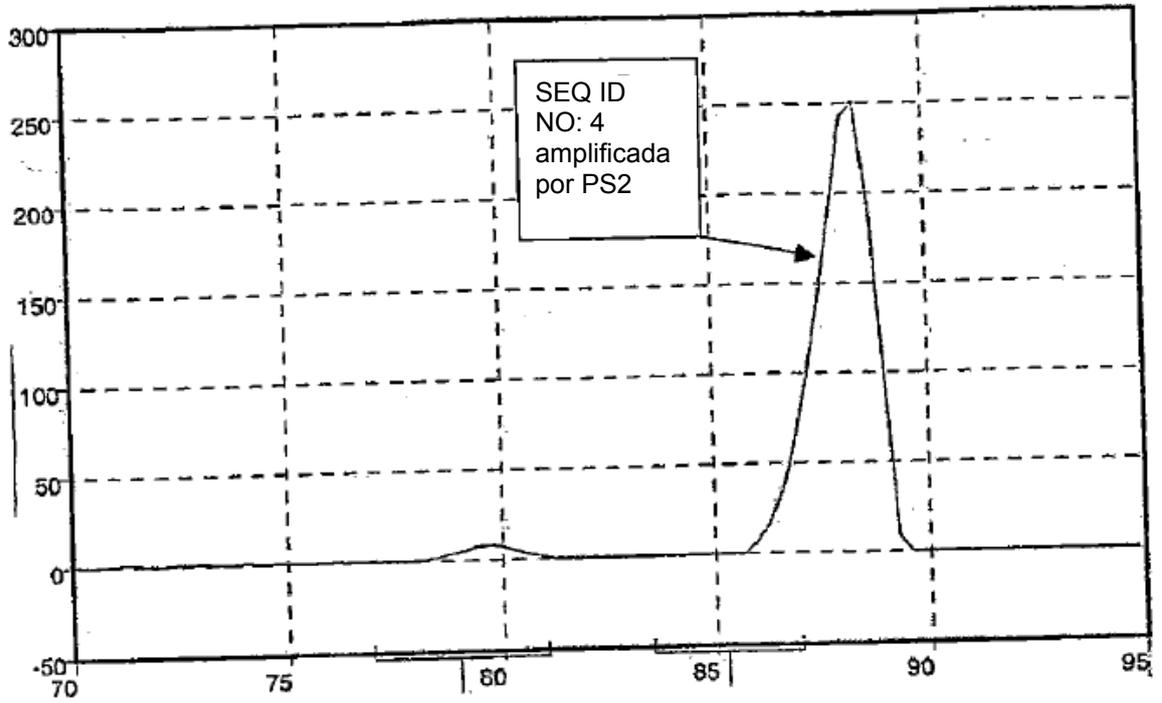


FIG. 4

CURVA DE FUSIÓN DE SEQ ID NO: 7 AMPLIFICADA POR PS3

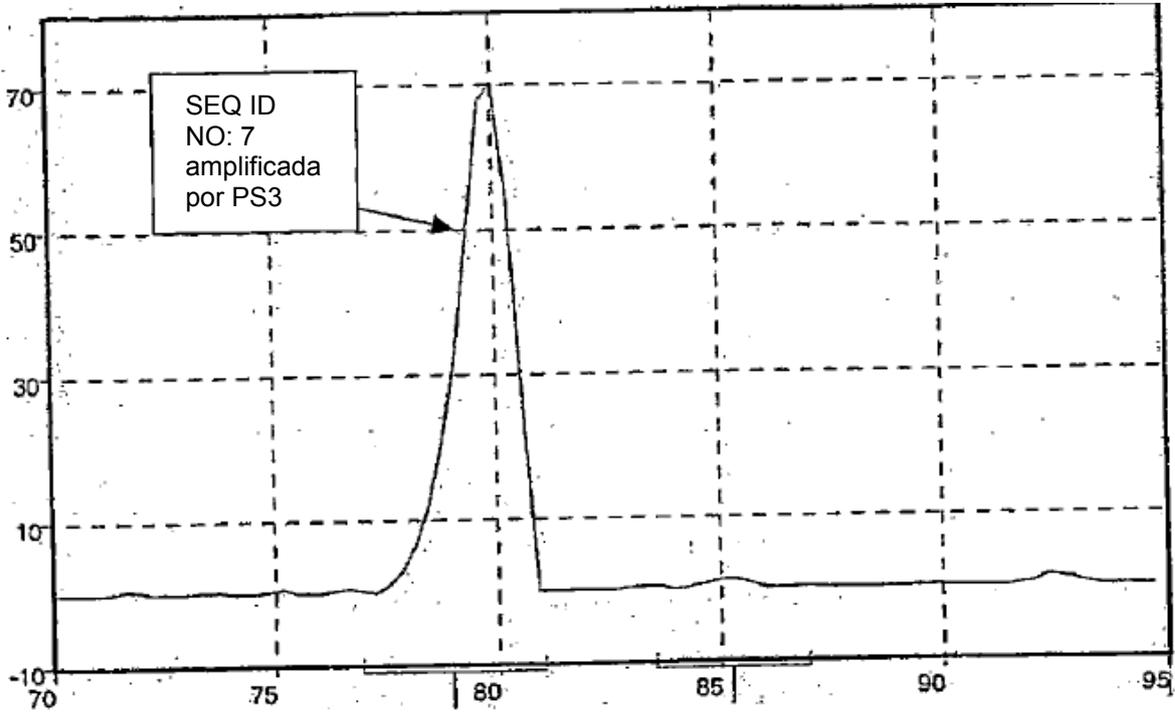


FIG. 5

CURVA DE FUSIÓN PARA PCR MULTI-DIANA, CONTROL POSITIVO
INTERNO, SEQ ID NO: 4 AMPLIFICADA CON PS2 Y SEQ ID NO: 7
AMPLIFICADA CON PS4

