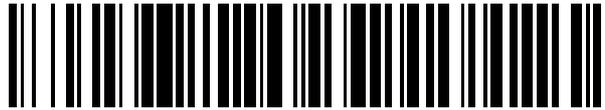


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 453**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.04.2007 E 07747198 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2012 EP 2020449**

54 Título: **Método para la detección y cuantificación múltiple y simultánea de patógenos mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real**

30 Prioridad:

24.04.2006 MX NL06000028

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

21.02.2013

73 Titular/es:

**SIGMA ALIMENTOS, S.A. DE C.V. (100.0%)
AVE. GOMEZ MORIN 1111 CO. CARRIZALEJO
C.P. 66254 SAN PEDRO GARZA GARCIANEUVO
LEON, MX**

72 Inventor/es:

**GARZA GONZÁLEZ, ELVIRA;
BOSQUES PADILLA, FRANCISCO JAVIER y
MORENO CAMPAÑA, VICTOR MANUEL**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 396 453 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

Método para la detección y cuantificación múltiple y simultánea de patógenos mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

5

Campo técnico de la invención

La presente invención se relaciona, en general, con la detección, identificación y cuantificación de bacterias patógenas, y particularmente a un método para la detección y cuantificación múltiple de cualquier combinación de patógenos, tales como *Listeria spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y/o *Escherichia coli* O157:H7, mediante reacción de amplificación múltiple empleando la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

10

Antecedentes de la invención

En la actualidad, la detección de bacterias patógenas transmisibles por alimentos, tales como *Listeria spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli* O157:H7, constituye una tarea muy importante en el campo de la medicina y de la higiene pública y tiene mucho interés en la industria agroalimentaria, tanto para la productora como la distribuidora de productos alimenticios (materias primas y/o productos elaborados), por lo que se han descrito diversos métodos para sus detección e identificación.

15

20

Una de las metodologías actuales, consideradas entre las más efectivas para la detección, identificación y cuantificación de patógenos, es aquella que se basa en técnicas moleculares, como lo es el método de reacción en cadena de la polimerasa, comúnmente conocido como PCR. El procedimiento PCR generalmente es considerado como la metodología más sensible y rápida empleada para detectar ácidos nucleicos de patógenos en una determinada muestra de ensayo en particular, y la podemos encontrar descrita dentro del estado de la técnica por Kary B. Mullis *et al.* en la familia de patentes estadounidenses US-4,683,195, US-4,683,202, US-4,800,159, US-4,889,818, US-4,965,188, US-5,008,182, US-5,038,852, US-5,079,352, US-5,176,995, US-5,310,652, US-5,310,893, US-5,322,770, US-5,333,675, US-5,352,600, US-5,374,553, US-5,386,022, US-5,405,774, US-5,407,800, US-5,418,149, US-5,420,029 entre otras.

25

30

Para llevar a cabo la técnica PCR, básicamente se tiene que contar con al menos un par de oligonucleótidos para cada uno de los patógenos a identificar, tal que cada par de iniciadores comprenden una primera secuencia nucleotídica complementaria a una secuencia que linda con el extremo 5' de una secuencia de ácido nucleico objetivo y una segunda secuencia nucleotídica complementaria a una secuencia que linda con el extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico objetivo. Las secuencias de nucleótidos deben tener cada par de iniciadores de oligonucleótidos que son específicos al patógeno a detectar, de tal manera que no reaccionen o se crucen con otros patógenos.

35

Al ser la técnica PCR un método sensible y rápido para detectar patógenos en forma individual, esta también se puede emplear para detectar simultáneamente múltiples patógenos presentes en una muestra. Sin embargo, emplear la metodología PCR para la detección simultánea de múltiples patógenos en una muestra tiene su problemática, pues su principal obstáculo radica en la reacción cruzada que se pueda presentar debido al empleo de múltiples secuencias de nucleótidos a fin de tener la amplificación preferencial de ciertas secuencias objetivo presentes en la muestra a expensas de otras secuencias objetivo también presentes.

40

45

Ejemplos de detección múltiple y simultánea de patógenos, empleando la metodología de PCR, son descritos por John W. Czajka en la publicación de solicitud de patente internacional WO-0314704, y por Linxian Wo y otros en la familia de patentes estadounidenses US-5,612,473, US-5,738,995, US-5,753,444, US-5,756,701 y US-5,846,783.

50

En la publicación de solicitud de patente internacional WO-0314704 se describe un método para detectar específica y simultáneamente especies patógenas de *Campylobacter* en una muestra de ensayo compleja. Las especies patógenas de *Campylobacter* a detectar pueden ser *Campylobacter jejuni* o *Campylobacter coli*. La muestra de ensayo compleja puede ser una muestra de alimento, agua o una matriz enriquecida de alimento. El método utiliza la amplificación por PCR con o sin un control positivo interno y pares apropiados de iniciadores. Múltiples especies pueden ser detectadas en dicha reacción.

55

En la familia de patentes estadounidenses US-5,612,473, US-5,738,995, US-5,753,444, US-5,756,701 y US-5,846,783 se describe un método de PCR múltiple para detectar rápida y simultáneamente agentes infecciosos en una muestra. Los agentes infecciosos detectados son *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Yersinia spp.* y *Escherichia coli*, en particular *Escherichia coli* O157:H7. La limitación del método descrito en estas patentes es que permite una reacción cruzada mínima entre los oligonucleótidos y sondas, así como de estos primeros con otras secuencias de ácido nucleico durante la amplificación.

60

La solicitud de patente FR-A-2844522, a su vez, describe un método para la amplificación simultánea de bacteria en el que las especies son: *Shigella spp.* y/o *Hafnia alvei* y/o *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Yersinia enterocolitica* y *Campylobacter jejuni*. La amplificación se lleva a cabo de forma espacialmente separada, no en el mismo tubo como una PCR múltiple. Además, algunos iniciadores y sondas no son específicas de especie: por ejemplo, los iniciadores y sondas diseñados para *E. coli* también permiten la detección de *Hafnia alvei*, *Shigella spp.* y *Yersinia enterocolitica*, siendo necesarios ensayos adicionales posteriores a la PCR para identificar las bacterias presentes en la muestra.

Fukushima, H. et al. ("Duplex real-time SYBR green PCR assays for detection of 17 species of food or waterborne pathogens in stools" Journal of Clinical Microbiology, vol.41, no. 11, Noviembre 2003 (2003-11), páginas 5134-5146) proporcionan una PCR múltiple en tiempo real utilizando la tecnología del Light-Cycler (LC) donde se pueden analizar simultáneamente ocho genes patógenos o específicos de patógenos contenidos en agua o en alimentos, utilizando LC-PCR. La reacción de amplificación, detección de los productos de PCR y el análisis de su Tm se pueden llevar a cabo en un único tubo capilar. Las cepas bacterianas ensayadas incluyen, entre otras, *Escherichia coli O157:H7*, *Campylobacter jejuni* y *Staphylococcus aureus*, pero el ensayo no está diseñado para detectar *Listeria spp.* Una limitación de este protocolo es que requiere una etapa de enriquecimiento durante toda la noche para adquirir una sensibilidad adecuada para procesar muestras de heces con con menos de 10⁴ bacterias patógenas, contenidas en agua o en alimentos, por gramo.

De otros métodos moleculares que se emplean actualmente, existen algunos comercializados para detectar patógenos en alimentos, unos mediante hibridación de ADN (Gene-Trak systems, Unipath), que es muy sensible pero requiere de aproximadamente 50 horas, y otros mediante amplificación de ácidos nucleicos (BAX, Dupont y FOMS Probelia, Sanofi Diagnostic Pasteur) que requieren, al menos, 24 horas. Ninguno de dichos métodos proporciona resultados en el mismo día de la producción del alimento ni realizan una cuantificación de la contaminación patógena presente.

Otros métodos moleculares basados en hibridación, útiles para detectar microorganismos, proporcionan el uso de matrices (arrays) de ácidos nucleicos con el fin de estudiar el nivel de expresión de genes presentes en ciertas bacterias. En este sentido, el documento WO 2005/014857 enseña el uso de una sonda de hibridación que es común a varias cepas de *Staphylococcus aureus*, tales como CO, N315, MOO, EMRSA-16, MSSA-476 y 8325. La sonda se denomina en el documento Secuencia 276356 y tiene la secuencia 5'AGATGAGCTACCTTCAAGACCTTC 3'.

La solicitud de patente US2006/051769-A1 enseña secuencias de ácido nucleico que están dispuestas en forma de una matriz de sondas que se puede utilizar para medir la expresión de genes de al menos 20.000 genes de *Escherichia coli* y al menos 500 regiones intragénicas. El método para detectar *Escherichia coli* requiere el uso de la técnica de PCR anidada que tiene dos rondas separadas de PCR para alcanzar suficiente sensibilidad. En el documento US2006/051769-A1, entre otras, se menciona una sonda para detectar un gen de *Escherichia coli* cuyo número de identificación de secuencia en la solicitud es: 190038, sonda que tiene la secuencia de nucleótidos 5'GATAAACTCATCGAAACAAGGCCAG3', y que tiene el número de acceso GSN:AFE63324 en la base de datos de EBI.

También es conocido el método de hibridación de ARN para la detección de eubacterias en muestras clínicas y de otros tipos, como se divulga en la solicitud de patente JP2002051799, "Sonda y método universales para ácidos nucleicos de eubacterias". Sin embargo, este método sólo permite distinguir entre bacterias gram-negativas y gram-positivas. La secuencia de la sonda 1745 en concreto, que tiene el número de acceso BD140320 en la base de datos de EMBL (5'AGCTGACGACAACCATGCACCACCTGT 3'), se puede utilizar para identificar una o más eubacterias, porque está dirigida al ARN 16S, pero no es específica de *Listeria spp.*, entre otras bacterias.

El documento US6677153 también enseña un oligonucleótido antisentido dirigido a los ARNr bacterianos 16S y 23S y una composición de ellos, así como el método para el uso de tal composición en el tratamiento de una infección bacteriana en un mamífero. En este caso, la secuencia identificada como SEQ ID NO: 28 (5'ACTTAACCCAACATCTCACGA 3'), que tiene el número de acceso AR452382 en la base de datos de EMBL, se utiliza para identificar una secuencia consenso del ARN 16S presente en varias bacterias objetivo y no específica de una sola especie.

De los métodos antes descritos, en algunos casos será necesario sólo aumentar la sensibilidad del método para detectar de forma fiable y rápida la presencia o ausencia de patógenos en particular, mientras que, en otros casos será necesario, además, cuantificar los patógenos eventualmente presentes con el fin de establecer los límites de concentración a partir de los cuales la presencia del patógeno puede presentar un problema para la salud del consumidor.

En vista de lo anterior, es de sumo interés para la industria de alimentos y de la salud contar con un método rápido, que emplee menos de 5 horas, para detectar y cuantificar simultáneamente cuatro de los más importantes agentes

5 infecciosos o patógenos, transmisibles por alimentos y/o por superficies ambientales contaminadas, como lo son *Listeria spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli O157:H7*. Esta detección y cuantificación simultánea y rápida de múltiples patógenos, mediante reacción de amplificación múltiplex empleando la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, permitirá ahorrar costes y tiempo en una industria en donde los tiempos de anaquel de los productos son extremadamente cruciales.

Sumario de la invención

10 En vista de lo anteriormente descrito y con el propósito de dar solución a las limitaciones encontradas, es el objeto de la invención ofrecer un método para la detección y cuantificación simultánea de *Listeria spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli O157:H7*, en una muestra de alimento o del medio ambiente, mediante reacción de amplificación múltiplex empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, comprendiendo el método las etapas de:

- 15 a) extraer ADN presente en dicha muestra de alimento o del medio ambiente;
 b) preparar una mezcla de reacción que incluye dicho ADN extraído, así como también
- 20 i) un par de oligonucleótidos iniciadores para la amplificación de cada secuencia diana de ácido nucleico y una sonda complementaria a dicha secuencia diana de ácido nucleico para cada uno de los patógenos a identificar, en donde el par de oligonucleótidos iniciadores y las sondas son:

25 un primer par de oligonucleótidos iniciadores identificados como SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, y una sonda identificada como SEQ ID NO: 3 para *Listeria spp.*,
 un segundo par de oligonucleótidos iniciadores identificados como SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 y una sonda identificada como SEQ ID NO: 6 para *Staphylococcus aureus*,
 un tercer par de oligonucleótidos iniciadores identificados como SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 y una sonda identificada como SEQ ID NO: 9 para *Campylobacter jejuni*,
 un cuarto par de oligonucleótidos iniciadores identificados como SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11 y una sonda identificada como SEQ ID NO: 12 para *Escherichia coli O157:H7*,

30 en donde dichas pruebas están marcadas en su extremo 5' con un fluoróforo y en su extremo 3' con un apagador o un colorante capaz de capturar la energía emitida por la excitación del fluoróforo,

y,

- 35 ii) cuatro desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) seleccionados del grupo que consiste en adenosina desoxinucleótido trifosfato (dATP), guanosina desoxinucleótido trifosfato (dGTP), timidina desoxinucleótido trifosfato (dTTP), citosina desoxinucleótido trifosfato (dCTP) y nucleótidos análogos de los mismos;
- 40 c) proporcionar una polimerasa termoestable de ADN y una sal magnésica;
 d) amplificar, mediante reacción de PCR, la primera secuencia diana de ácido nucleico de *Listeria spp.*, la segunda secuencia diana de ácido nucleico de *Staphylococcus aureus*, la tercera secuencia diana de ácido nucleico de *Campylobacter jejuni*, y la cuarta secuencia diana de ácido nucleico de *Escherichia coli O157:H7*; y
 45 e) tras la amplificación, determinar la presencia o ausencia de la primera, segunda, tercera y cuarta secuencia diana de ácido nucleico en los productos de PCR amplificados mediante una señal fluorescente o emisión de fluorescencia específica para cada ácido nucleico diana, para asimismo detectar y cuantificar simultáneamente *Listeria spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli O157:H7*, respectivamente, en la muestra de alimento o del medio ambiente.

50 Finalmente es un objeto de la invención ofrecer un kit de diagnóstico para la detección y cuantificación simultánea de *Listeria spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli O157:H7* en una muestra de alimento o del medio ambiente, mediante reacción de amplificación múltiplex, empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, kit de diagnóstico que comprende:

55 un primer par de oligonucleótidos iniciadores que consiste en un iniciador "corriente arriba" de SEQ ID NO: 1 y un iniciador "corriente abajo" de SEQ ID NO: 2;
 un segundo par de oligonucleótidos iniciadores que consiste en un iniciador "corriente arriba" de SEQ ID NO: 4 y un iniciador "corriente abajo" de SEQ ID NO: 5;
 un tercer par de oligonucleótidos iniciadores que consiste en un iniciador "corriente arriba" de SEQ ID NO: 7 y un iniciador "corriente abajo" de SEQ ID NO: 8;
 60 un cuarto par de oligonucleótidos iniciadores que consiste en un iniciador "corriente arriba" de SEQ ID NO: 10 y un iniciador "corriente abajo" de SEQ ID NO: 11;
 una sonda de SEQ ID NO: 3, que está marcada en su extremo 5' con TET y en su extremo 3' con BHQ-1;
 una sonda de SEQ ID NO: 6, que está marcada en su extremo 5' con TxR y en su extremo 3' con BHQ-2;
 65 una sonda de SEQ ID NO: 9, que está marcada en su extremo 5' con Cy5 y en su extremo 3' con BHQ-3;

5 una sonda de SEQ ID NO: 12, que está marcada en su extremo 5' con FAM y en su extremo 3' con BHQ-1; cuatro desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) seleccionados del grupo que consiste en adenosina desoxinucleótido trifosfato (dATP), guanosina desoxinucleótido trifosfato (dGTP), timidina desoxinucleótido trifosfato (dTTP), citosina desoxinucleótido trifosfato (dCTP) y nucleótidos análogos de los mismos; polimerasa termoestable de ADN; y cloruro magnésico.

Descripción breve de las figuras

10 Los detalles característicos de la invención se describen en los siguientes párrafos en conjunto con las figuras que lo acompañan, las cuales están con el propósito de definir la invención pero sin limitar su alcance.

15 La Figura 1 ilustra una curva de calibración para *Listeria spp.* de acuerdo con la invención, donde A1: es una referencia de mayor concentración; A4: es una referencia de menor concentración. La lectura de una muestra se interpola en las lecturas de las referencias para conocer las UFC/ml.

20 La Figura 2 ilustra una curva de calibración para *Staphylococcus aureus* de acuerdo con la invención, donde A1: es una referencia de mayor concentración; A4: es una referencia de menor concentración. La lectura de una muestra se interpola en las lecturas de las referencias para conocer las UFC/ml.

25 La Figura 3 ilustra una curva de calibración para *Campylobacter jejuni* de acuerdo con la invención, donde A1: es una referencia de mayor concentración; A2: es una referencia de menor concentración. La lectura de una muestra se interpola en las lecturas de las referencias para conocer las UFC/ml.

30 La Figura 4 ilustra una curva de calibración para *Escherichia coli O157:H7* de acuerdo con la invención, donde A1: es una referencia de mayor concentración; A3: es una referencia de menor concentración. La lectura de una muestra se interpola en las lecturas de las referencias para conocer las UFC/ml.

Descripción detallada de la invención

35 El término “amplificación enzimática de ADN”, como es empleado en el contexto de la presente descripción, significa el empleo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para incrementar la concentración de una secuencia en particular de ADN dentro de una combinación de secuencias de ADN. A la secuencia particular de ADN que es amplificada se hace referencia como una “secuencia diana”.

40 El término “par de iniciadores” es empleado bajo el significado de un par de oligonucleótidos que son complementarios a las secuencias que lindan con la secuencia diana. El par de iniciadores consiste en un iniciador “corriente arriba” que tiene una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia “corriente arriba” de la secuencia diana, y un iniciador “corriente abajo” que tiene una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia “corriente abajo” de la secuencia diana.

El término “reacción de amplificación múltiple” significa, en el contexto de la presente descripción, amplificación, por procedimiento de PCR, de múltiples secuencias diana de ADN en una muestra de ensayo en particular.

45 En la presente invención se detectaron y cuantificaron simultáneamente cuatro bacterias utilizando la técnica de PCR en tiempo real, que en comparación con las otras técnicas, no requirió de un pre-enriquecimiento, ni de preparar una serie de tubos con una mezcla de reacción específica para cada bacteria a detectar; es necesario resaltar que representa un avance el hecho de detectar cuatro bacterias de manera simultánea y reducir el tiempo total de análisis a 2,5 hrs mínimo, representando una ventaja competitiva en la disminución del coste de análisis, utilizando una misma mezcla para la prueba de detección. Además, se logra una mejor sensibilidad, ya que la preparación de la muestra (que ya está incluida en el tiempo de 2,5 hrs) ha permitido obtener mejores resultados porque se ha adaptado de tal forma que no existen factores que puedan influir desfavorablemente en la amplificación.

55 El método proporcionado por esta invención permite detectar, identificar y cuantificar simultáneamente múltiples patógenos transmisibles por alimentos, superficies, ambientes contaminados, tales como *Listeria spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y/o *Escherichia coli O157:H7*, en una o más muestras de ensayo, mediante reacción de amplificación múltiple empleando la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. La muestra de ensayo puede ser cualquier muestra que contiene ADN en la que se desea conocer la posible contaminación por dichos patógenos. En una realización particular, dicha muestra de ensayo es una muestra de un producto alimenticio, por ejemplo, productos cárnicos y lácteos, o una muestra de superficies o ambientes contaminados.

OLIGONUCLEÓTIDOS: DISEÑO E INFORMACIÓN DE SECUENCIA

Los oligonucleótidos de la invención han sido diseñados con el propósito de identificar específicamente a *Listeria spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli O157:H7* que puedan estar presentes en una muestra de ensayo sin dar falsos positivos debido a la presencia de otros patógenos que puedan estar presentes en la misma.

Se cuenta con un par de oligonucleótidos iniciadores para cada uno de los patógenos a identificar (*Listeria spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli O157:H7*), de tal forma que cada par de iniciadores comprenden una primera secuencia nucleotídica sintética “corriente arriba” complementaria a una secuencia nucleotídica “corriente arriba” que linda con el extremo 5’ de una secuencia de ácido nucleico objetivo y una segunda secuencia nucleotídica sintética “corriente abajo”, complementaria a una secuencia “corriente abajo” que linda con el extremo 3’ de la secuencia de ácido nucleico diana. Las secuencias de nucleótidos deben tener cada par de oligonucleótidos iniciadores que son específicos del patógeno a detectar, de tal manera que no reaccionen o se crucen con otros patógenos. Así mismo, para cada uno de los patógenos a identificar, se desarrolló una secuencia sintética de sonda de prueba. Los oligonucleótidos desarrollados se muestran en la Tabla 1.

Identificador	Tipo	Patógeno	Secuencia nucleotídica
SEQ ID NO: 1	Iniciador “corriente arriba” F	<i>Listeria spp.</i>	CTTGACATCCTTTGACCACTCTG
SEQ ID NO: 2	Iniciador “corriente abajo” R	<i>Listeria spp.</i>	GACTTAACCCAACATCTCACGAC
SEQ ID NO: 3	Prueba P	<i>Listeria spp.</i>	AGCTGACGACAACCATGCACCACC
SEQ ID NO: 4	Iniciador “corriente arriba” F	<i>Staphylococcus aureus</i>	AACAAAACAGACCATCTTTAAGCG
SEQ ID NO: 5	Iniciador “corriente abajo” R	<i>Staphylococcus aureus</i>	AGATGAGCTACCTTCAAGACCTTC
SEQ ID NO: 6	Prueba P	<i>Staphylococcus aureus</i>	ACTCAACCGACGACACCGAACCCCT
SEQ ID NO: 7	Iniciador “corriente arriba” F	<i>Campylobacter jejuni</i>	GCAGCAGTAGGGAATATTGCG
SEQ ID NO: 8	Iniciador “corriente abajo” R	<i>Campylobacter jejuni</i>	TACGCTCCGAAAAGTGTCATCC
SEQ ID NO: 9	Prueba P	<i>Campylobacter jejuni</i>	AACCCTGACGCAGCAACGCCGC
SEQ ID NO: 10	Iniciador “corriente arriba” F	<i>Escherichia coli O157:H7</i>	GCAGATAAACTCATCGAAACAAGG
SEQ ID NO: 11	Iniciador “corriente abajo” R	<i>Escherichia coli O157:H7</i>	TAAATTAATTCCACGCCAACCAAG
SEQ ID NO: 12	Prueba P	<i>Escherichia coli O157:H7</i>	ACCCTGTCCACACGATGCCAATGT

Tabla 1

En la invención las secuencias SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO:12, empleadas como sondas de prueba son marcadas en su extremo 5’ con un fluoróforo o un colorante capaz de emitir energía, y en su extremo 3’ con un apagador o un colorante capaz de capturar la energía emitida por la excitación del fluoróforo. Los fluoróforos y colorantes, empleados como marcadores preferidos para poder detectar e identificar *Listeria spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli O157:H7* sin producir reacciones cruzadas entre ellos y los demás componentes, son mostrados en la Tabla 2.

Identificador	Patógeno	Secuencia nucleotídica	Fluoróforo para marcaje en extremo 5’	Colorante para marcaje en extremo 3’
SEQ ID NO: 3	<i>Listeria spp</i>	AGCTGACGACAACCATGCACCACC	TET	BHQ-1
SEQ ID NO: 6	<i>Staphylococcus aureus</i>	ACTCAACCGACGACACCGAACCCCT	TxR	BHQ-2
SEQ ID NO: 9	<i>Campylobacter jejuni</i>	AACCCTGACGCAGCAACGCCGC	Cy5	BHQ-3
SEQ ID NO: 12	<i>Escherichia coli O157:H7</i>	ACCCTGTCCACACGATGCCAATGT	FAM	BHQ-1

Tabla 2

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA O MUESTRAS DE ENSAYO DE ADN

5 Para el desarrollo de la metodología de la invención se consideraron los siguientes pasos para la preparación de una muestra de ensayo:

10 Primero, se procede a una etapa de lavado, donde una muestra de alimento, medioambiental o de un área superficial se somete a una solución salina formando una suspensión que posteriormente es centrifugada para obtener un primer sedimento obtenido por la eliminación de sustancias hidrosolubles presentes en la suspensión.

15 Una vez obtenido el sedimento de la muestra, éste se incuba con lisozima para romper la pared celular de las bacterias presentes en la muestra, para posteriormente proceder a una incubación con proteinasa K para provocar la hidrólisis de las proteínas y de la lisozima previamente adicionada.

20 La extracción de las proteínas y demás compuestos liposolubles ahí presentes se hace por medio de la aplicación de fenol-cloroformo-álcohol, a fin de que una vez extraídas, por medio de una precipitación con etanol, se proceda a una precipitación selectiva del ADN presente, formando una concentración de ADN que es secada.

25 Finalmente, con la concentración de ADN obtenida, se forma una suspensión que es calentada a aproximadamente 65 °C, lo que origina una rápida disolución de la muestra de ADN.

30 En cada uno de los elementos ensayados, se hicieron pruebas de cantidad de reactivo adicionado, tiempos de centrifugación-incubación, repetición de los lavados, hasta encontrar las condiciones óptimas. La preparación de la muestra se realizó tomando en cuenta que todos los reactivos y muestras deben mantenerse en temperatura de refrigeración durante su proceso.

Ejemplos del proceso de preparación de la muestra o muestras de ensayo de ADN son descritos a continuación:

Ejemplo 1: Preparación de muestra de ADN a partir de una muestra de alimento de productos cárnicos o quesos.

- 30 1. Colocar 25 g de la muestra de alimento en un tubo cónico estéril de 50 ml, y aforar a 40 ml con solución salina estéril a temperatura ambiente.
2. Dejar reposar el tubo con la muestra de alimento durante 10 minutos en posición vertical.
- 35 3. Retirar el alimento, centrifugar a 3.500 min⁻¹ (rpm) durante 15 minutos y extraer cuidadosamente el sobrenadante para no perder el sedimento.
4. Agitar en vórtex el sedimento durante 10 segundos.
5. Transferir la totalidad del sedimento a un tubo Eppendorf de 2 ml, enjuagar el tubo cónico con 1 ml de solución salina estéril y reunir el lavado con el obtenido previamente.
- 40 6. Centrifugar a 14.000 min⁻¹ (rpm) durante 8 minutos.
7. Retirar todo el sobrenadante con pipeta automática.
8. Añadir 100 µl de Tris-HCl de 100 mmol y pH=8, y 30 µl de lisozima, y mezclar en vórtex durante 10 segundos.
9. Incubar a 37 °C durante 30 minutos en baño de agua.
- 45 10. Añadir 100 µl de TE 1X con SDS al 1% y 3 µl de Proteinasa K (20 mg/ml).
11. Mezclar e incubar a 55 °C durante 30 minutos.
12. Agregar 500 µl de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (24:24:1) y 100 µl de TE 1X y agitar 5 minutos por inversión.
13. Centrifugar durante 8 minutos a 13.500 min⁻¹ (rpm) y transferir 250 µl de la fase superior a otro tubo.
- 50 14. Añadir 582.5 µl de etanol absoluto y mantener en el congelador por 10 minutos.
15. Centrifugar durante 8 minutos a 13.500 min⁻¹ (rpm).
16. Decantar y secar.
17. Redisolver en 25 µl de TE 1X y asegurarse de que el botón de ADN se disuelve.
18. Calentar a 65 °C durante 15 minutos.
19. Dejar a temperatura ambiente durante 30 minutos y procesar.

Ejemplo 2: Preparación de muestra de ADN a partir de una muestra del medio ambiente o de una superficie.

- 60 1. Pasar una esponja estéril por una superficie de 20 cm x 20 cm a analizar para obtener una muestra.
2. Exprimir la esponja en una bolsa para proceder a decantar el líquido en un tubo cónico de 50 ml, y aforar a 40 ml con solución salina estéril.
3. Centrifugar a 3.500 min⁻¹ (rpm) durante 15 minutos y extraer cuidadosamente el sobrenadante para no perder el sedimento.
4. Agitar en vórtex el sedimento durante 10 segundos.

5. Transferir la totalidad del sedimento a un tubo Eppendorf de 2 ml. Enjuagar el tubo cónico con 1 ml de salina estéril y reunir el lavado con el obtenido previamente.
6. Centrifugar a 14.000 min^{-1} (rpm) durante 8 minutos.
7. Lavar 2 veces más con 1,5 ml de solución salina estéril.
- 5 8. Retirar todo el sobrenadante con pipeta automática.
9. Añadir 100 μl de Tris-HCl de 100 mmol y pH=8, y 30 μl de lisozima, y mezclar en vórtex durante 10 segundos.
- 10 10. Incubar a 37 °C durante 30 minutos en baño de agua.
11. Añadir 100 μl de TE 1X con SDS al 1% y 3 μl de Proteinasa K (20 mg/ml).
12. Mezclar e incubar a 55 °C durante 30 minutos.
13. Agregar 500 μl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24:24:1) y 100 μl de TE 1X y agitar 5 minutos por inversión.
14. Centrifugar durante 8 minutos a 13.500 min^{-1} (rpm) y transferir 250 μl de la fase superior a otro tubo.
- 15 15. Añadir 582,5 μl de etanol absoluto y mantener en el congelador durante 10 minutos.
16. Centrifugar durante 8 minutos a 13.500 min^{-1} (rpm).
17. Decantar y secar.
18. Redisolver en 25 ml de TE 1X. Asegurarse de que el botón de ADN se disuelve.
19. Calentar a 65 °C durante 15 minutos.
- 20 20. Dejar a temperatura ambiente durante 30 minutos y procesar.

PREPARACIÓN DE LA MEZCLA DE REACCIÓN

Una vez obtenida la muestra o muestras de ensayo de ADN, se prepara una mezcla de reacción utilizando los componentes descritos en la Tabla 3.

25

Componente de la Mezcla de Reacción		Concentración inicial	Cantidad a añadir (μl)	Concentración final
MgCl ₂		50 mmol	1,75	3,5
DNTPs		10 mmol	0,5	200 μmol
Buffer		10X	3,75	1,5X
<i>Listeria spp.</i>	SEQ ID NO: 1	5 nmol	1	200 pmol
	SEQ ID NO: 2	5 nmol	1	200 pmol
	SEQ ID NO: 3	5 nmol	0.25	50 pmol
<i>Staphylococcus aureus</i>	SEQ ID NO: 4	5 nmol	1	200 pmol
	SEQ ID NO: 5	5 nmol	1	200 pmol
	SEQ ID NO: 6	5 nmol	0.25	50 pmol
<i>Campylobacter jejuni</i>	SEQ ID NO: 7	5 nmol	1.5	300 pmol
	SEQ ID NO: 8	5 nmol	1.5	200 pmol
	SEQ ID NO: 9	5 nmol	1.75	350 pmol
<i>Escherichia coli O157:H7</i>	SEQ ID NO: 10	5 nmol	1	200 pmol
	SEQ ID NO: 11	5 nmol	1	200 pmol
	SEQ ID NO: 12	5 nmol	0.25	50 pmol
ADN polimerasa Taq		5 U/ μl	0,25	
Agua			2,25	
Muestra de ensayo de ADN			5	
Volumen Total			25	

Tabla 3

30 Posteriormente, se preparó un cóctel de reacción para 100 reacciones mezclando los ingredientes descritos en la Tabla 4.

Componente de la Mezcla de Reacción		Cantidad a añadir (µl) para una reacción	Cantidad a añadir (µl) para 100 reacciones
MgCl ₂		1,75	175
DNTPs		0,5	50
Tampón		3,75	375
<i>Listeria spp.</i>	SEQ ID NO: 1	1	100
	SEQ ID NO: 2	1	100
	SEQ ID NO: 3	0,25	25
<i>Staphylococcus aureus</i>	SEQ ID NO: 4	1	100
	SEQ ID NO: 5	1	100
	SEQ ID NO: 6	0,25	25
<i>Campylobacter jejuni</i>	SEQ ID NO: 7	1,5	150
	SEQ ID NO: 8	1,5	150
	SEQ ID NO: 9	1,75	175
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	SEQ ID NO: 10	1	100
	SEQ ID NO: 11	1	100
	SEQ ID NO: 12	0,25	25
Agua		2,25	225
Muestra de ensayo de ADN		5	

Tabla 4

5 El cóctel preparado se mezcla perfectamente por inversión y se dispensan 19,75 µl en viales Eppendorf de 0,5 ml para ser almacenados en congelación protegidos de la luz.

10 REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN MÚLTIPLEX EMPLEANDO PCR EN TIEMPO REAL Y DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PATÓGENOS

10 En una realización preferente de la invención, la reacción de amplificación múltiplex empleando PCR en tiempo real proporciona muchas ventajas sobre el método de PCR convencional para detectar una única diana. La reacción de amplificación múltiplex empleando PCR requiere del desarrollo de oligonucleótidos iniciadores y sondas, específicos para la secuencia diana del patógeno a detectar, de tal manera que dichos oligonucleótidos iniciadores y sondas sean compatibles entre sí dentro de una misma temperatura óptima de entre 40 °C a 65 °C y sometidos a las mismas condiciones de reacción química a fin de permitir el apareamiento por hibridación de dos segmentos de ácido nucleico complementarios. Aunado a esto, los juegos de oligonucleótidos iniciadores y sondas no deben reaccionar cruzadamente ni aparearse, durante la amplificación, con otras secuencias de ácido nucleico para las cuales no fueron diseñados.

20 Teniendo en cuenta lo anterior, los siguientes pares de oligonucleótidos iniciadores son usados para amplificar cada una de las secuencias de ácido nucleico diana de cada patógeno a detectar. Un par de oligonucleótidos iniciadores de *Listeria spp.* identificados como SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, que se aparean con una secuencia diana del genoma de *Listeria spp.* Un par de oligonucleótidos iniciadores de *Staphylococcus aureus* identificados como SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, que se aparean con una secuencia diana del genoma de *Staphylococcus aureus*. Un par de oligonucleótidos iniciadores de *Campylobacter jejuni* identificados como SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, que se aparean con una secuencia diana del genoma de *Campylobacter jejuni*. Y un par de oligonucleótidos iniciadores de *Escherichia coli* O157:H7 identificados como SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11, que se aparean con una secuencia diana del genoma de *Escherichia coli* O157:H7.

30 Cada sonda identificada como SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 12, que es empleada en la reacción de amplificación múltiplex empleando PCR en tiempo real, es una secuencia oligonucleotídica doblemente marcada que es complementaria a cada una de las secuencias intermedias en los productos amplificados obtenidos. Cada una de las sondas está marcada en su extremo 5' con un fluoróforo o un colorante capaz de emitir energía, y en su extremo 3' con un apagador o un colorante capaz de capturar la energía emitida por la excitación de dicho fluoróforo, tal como lo describen Nazarenko *et al.* en la patente de EE.UU. US 5,866,336 donde se hace mención a fluoróforos que transfieren energía y cómo estos son aplicados en los oligonucleótidos iniciadores en los métodos de amplificación nucleica.

En una realización preferente de la invención, los fluoróforos empleados son TET, TxR, Cy5, FAM, mientras que los apagadores empleados son BHQ-1, BHQ-2 y BHQ-3. De tal forma que las secuencias de oligonucleótidos empleadas como sondas (SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 12) están marcadas en sus extremos 5' y 3' conforme a la combinación indicada en la Tabla 2 antes mencionada.

5 En un ejemplo particular de realización, la muestra de ADN es preparada para su amplificación en las siguientes condiciones:

10 Muestra de lácteos o del medio ambiente: Se descongela un vial con 19,75 µl de cóctel preparado y se añaden 0,25 µl de ADN polimerasa Taq, 4 µl de agua y 1 µl de la muestra de ADN a analizar.

Muestra de productos cárnicos o quesos: Se descongela un vial con 19,75 µl de cóctel preparado y se añaden 0.25 µl de ADN polimerasa Taq y 5 µl de la muestra de ADN a analizar.

15 La reacción de amplificación múltiple empleando PCR se realiza en un aparato para el control simultáneo de múltiples amplificaciones de ácido nucleico, como el aparato descrito por Russell G. Higuchi y Robert M. Watson en la publicación de patente europea EP-640828, el cual generalmente consiste en un termociclador con una pluralidad de orificios en los que se introducen tubos que contienen la mezcla de reacción para la amplificación enzimática de ADN de los patógenos a detectar e identificar; una fuente de luz acoplada al termociclador y adaptada para distribuir la luz sobre la pluralidad de orificios; y un sensor o detector de fluorescencia adaptado para detectar simultáneamente la luz emitida.

25 Con el objeto de cuantificar los microorganismo presentes en la muestra, se elaboran curvas de calibración preparando suspensiones de cada uno de los patógenos a detectar (*Listeria spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli O157:H7*), ajustando la turbidez en el tubo de Mc Farland de 0,5 para preparar diluciones al 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} para posteriormente contaminar 25 gramos de alimento con cada una de estas suspensiones (un alimento por cada dilución). Después se procede a la extracción de ADN como si fuera una muestra y se prepara una cuenta en una placa de cada una de las diluciones preparadas para ser sometidas al termociclador, asignando la concentración de patógenos correspondiente. Finalmente se construye la curva de cT contra log ug/g, obteniéndose así una curva de calibración para *Listeria spp.* (ver Figura 1), *Staphylococcus aureus* (ver Figura 2), *Campylobacter jejuni* (ver Figura 3) y *Escherichia coli O157:H7* (ver Figura 4).

35 En una realización particular, el aparato utilizado comprende un termociclador rápido en tiempo real unido a un sistema de detección por fluorescencia, lo que permite el seguimiento en tiempo real del proceso de amplificación tras cada ciclo. Un ejemplo de termociclador empleado en el método de la invención es el SMART CYCLER® II de CEPHEID®.

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PATÓGENOS PRESENTES EN LA MUESTRA DE ADN

40 La presencia o ausencia y cuantificación de patógenos en cualquier combinación de *Listeria spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y/o *Escherichia coli O157:H7* en una muestra o muestras de ensayo se determina por una señal fluorescente o emisión de fluorescencia específica de cada producto o muestra de ADN amplificada. Para esto se hace incidir una longitud de onda específica para la excitación de cada fluoróforo y se detecta su emisión a longitudes de onda específicas.

RESULTADOS

50 En un ejemplo de realización, la Tabla 5 indica las condiciones en las que se llevó a cabo la reacción de amplificación múltiple, la Tabla 6 presenta los límites de detección alcanzados y la Tabla 7 muestra las lecturas de las concentraciones que se obtuvieron como resultado de la detección y cuantificación de los cuatro patógenos (*Listeria spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y/o *Escherichia coli O157:H7*) de forma simultánea en muestras de carnes frías, lácteos y atmosféricas, mediante la utilización de un solo dispositivo con una sola mezcla de reactivos y cuatro oligonucleótidos específicos para diferentes patógenos a una condición única de temperaturas y mezcla para su amplificación. También las Figuras 1, 2, 3 y 4 muestran gráficamente su detección y cuantificación.

	Temperatura (°C)	Tiempo (segundos)	Ciclos
Proceso inicial	94	120	1
Amplificación	94	15	40
	63	25	

Tabla 5

Tipo de muestra	<i>Listeria spp.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Escherichia coli</i> O157:H7
ALIMENTOS				
Cárnicos y Quesos (unidades genómicas/gramos).	1	3	160	16
MEDIO AMBIENTE				
Drenaje (unidades genómicas/muestra)	1	3	160	16
Pisos (unidades genómicas/muestra)	1	3	160	16
Superficie en contacto (unidades genómicas/muestra)	1	3	160	16
Paredes (unidades genómicas/muestra)	1	3	160	16
Operadores (unidades genómicas/muestra)	1	3	160	16

Tabla 6

Referencia de la prueba	<i>Listeria spp.</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Campylobacter jejuni</i>		<i>Escherichia coli</i> O157:H7	
	(UFC/ml)	Lectura	(UFC/ml)	Lectura	(UFC/ml)	Lectura	(UFC/ml)	Lectura
A1	10000000	12,72	10000000	14,98	1000000	15,50	1000000	13,8
A2	1000000	15,5	1000000	18,48	100000	17,50	100000	17,2
A3	100000	18,86	100000	22,34	0	0	10000	20,4
A4	10000	22,69	10000	28,51	0	0	0	0

5

Tabla 7

El método de la presente invención no requiere un pre-enriquecimiento, por lo cual el tiempo de proceso es mucho más corto, aproximadamente 2,5 horas, y se tiene la capacidad de detectar y cuantificar posibles patógenos cultivables además de posibles patógenos no cultivables de forma simultánea.

10

JUEGO DE DIAGNÓSTICO

15

En general, los juegos de diagnóstico de la invención contienen cada una de los pares de oligonucleótidos iniciadores correspondientes a cada uno de las patógenos a detectar (*Listeria spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y/o *Escherichia coli* O157:H7), al igual que cada una de las sondas marcadas para cada uno de dichos patógenos, con el fin de poder elegir entre realizar la detección de un solo patógeno (usando sólo el par de oligonucleótidos iniciadores y su sonda marcada), o bien para la detección combinada o simultánea de los cuatro patógenos mencionados, dependiendo de las necesidades.

20

Los juegos de diagnóstico proporcionados por esta invención pueden presentarse en forma de estuche conteniendo, además de unos recipientes con los pares de oligonucleótidos iniciadores y/o sondas marcadas mencionados previamente, unos recipientes con la totalidad o parte del resto de los reactivos necesarios para la realización de dicho método, por ejemplo, agua ultrapura, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, y dTTP), un tampón adecuado para la reacción de amplificación enzimática, una ADN polimerasa termoestable (por ejemplo, ADN polimerasa Taq), una sal magnésica (por ejemplo, MgCl₂), entre otros. Adicional y opcionalmente, los juegos de diagnóstico proporcionados por esta invención pueden incluir unos recipientes con ADN de *Listeria spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y/o *Escherichia coli* O157:H7 para su empleo como controles positivos.

25

30

Basándose en las realizaciones descritas anteriormente, se contempla que las modificaciones de los ambientes de realización descritos, así como los ambientes de realizaciones alternativas serán considerados evidentes para una persona experta en la técnica bajo la presente descripción. Por lo tanto, se considera que las reivindicaciones abarcan aquellas modificaciones y alternativas que estén dentro del alcance de la presente invención o sus equivalentes.

Lista de secuencias

<110> SIGMA ALIMENTOS, S. A. DE C. V.
 GARZA GONZÁLEZ, ELVIRA
 BOSQUES PADILLA, FRANCISCO JAVIER
 MORENO CAMPAÑA, VICTOR MANUEL

<120> MÉTODO PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN MÚLTIPLE Y SIMULTÁNEA
 DE PATÓGENOS MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN
 TIEMPO REAL

<130> PCT003SIGMA

<140> PCT/MX2007/000052
 <141> 2007-04-19

<150> MXNL/a/2006/000028
 <151> 2006-04-24

<160> 12

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido "corriente arriba" F de Listeria sp

<400> 1
 cttgacatcc ttgaccact ctg 23

<210> 2
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido "corriente abajo" R de Listeria sp

<400> 2
 gacttaaccc aacatctcac gac 23

<210> 3
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido de prueba P de Listeria sp

<400> 3
 agctgacgac aaccatgcac cacc 24

<210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido "corriente arriba" F de Staphylococcus aureus

ES 2 396 453 T3

<400> 4
 aacaaaacag accatcttta agcg 24

<210> 5
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido "corriente abajo" R de Staphylococcus aureus

<400> 5
 agatgagcta ccttcaagac cttc 24

<210> 6
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido de prueba P de Staphylococcus aureus

<400> 6
 actcaaccga cgacaccgaa ccct 24

<210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido "corriente arriba" F de Campylobacter jejuni

<400> 7
 gcagcagtag ggaatattgc g 21

<210> 8
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido "corriente abajo" R de Campylobacter jejuni

<400> 8
 tacgctccga aaagtgtcat cc 22

<210> 9
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido de prueba P de Campylobacter jejuni

<400> 9
 aacctgacg cagcaacgcc gc 22

<210> 10

ES 2 396 453 T3

<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido "corriente arriba" F de Escherichia coli

<400> 10
gcagataaac tcatcgaaac aag 24

<210> 11
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido "corriente abajo" R de Escherichia coli

<400> 11
taaattaatt ccacgccaac caag 24

<210> 12
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de prueba P de Escherichia coli

<400> 12
accctgtcca cacgatgcca atgt 24

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección y cuantificación simultánea de *Listeria spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli O157:H7*, en una muestra de alimento o del medio ambiente, mediante reacción de amplificación múltiplex, empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, comprendiendo el método las etapas de:
- a) extraer ADN presente en dicha muestra de alimento o del medio ambiente;
- b) preparar una mezcla de reacción que incluye dicho ADN extraído, así como también
- i) un par de oligonucleótidos iniciadores para la amplificación de cada secuencia diana de ácido nucleico y una sonda complementaria a dicha secuencia diana de ácido nucleico para cada uno de los patógenos a identificar, en donde el par de oligonucleótidos iniciadores y las sondas son:
- un primer par de oligonucleótidos iniciadores identificados como SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, y una sonda identificada como SEQ ID NO: 3 para *Listeria spp.*,
- un segundo par de oligonucleótidos iniciadores identificados como SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 y una sonda identificada como SEQ ID NO: 6 para *Staphylococcus aureus*,
- un tercer par de oligonucleótidos iniciadores identificados como SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 y una sonda identificada como SEQ ID NO: 9 para *Campylobacter jejuni*,
- un cuarto par de oligonucleótidos iniciadores identificados como SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11 y una sonda identificada como SEQ ID NO: 12 para *Escherichia coli O157:H7*,
- en donde dichas pruebas están marcadas en su extremo 5' con un fluoróforo y en su extremo 3' con un apagador o un colorante capaz de capturar la energía emitida por la excitación del fluoróforo,
- y,
- ii) cuatro desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) seleccionados del grupo que consiste en adenosina desoxinucleótido trifosfato (dATP), guanosina desoxinucleótido trifosfato (dGTP), timidina desoxinucleótido trifosfato (dTTP), citosina desoxinucleótido trifosfato (dCTP) y nucleótidos análogos de los mismos;
- c) proporcionar una polimerasa termoestable de ADN y una sal magnésica;
- d) amplificar, mediante reacción de PCR, la primera secuencia diana de ácido nucleico de *Listeria spp*, la segunda secuencia diana de ácido nucleico de *Staphylococcus aureus*, la tercera secuencia diana de ácido nucleico de *Campylobacter jejuni*, y la cuarta secuencia diana de ácido nucleico de *Escherichia coli O157:H7*; y
- e) tras la amplificación, determinar la presencia o ausencia de la primera, segunda, tercera y cuarta secuencia diana de ácido nucleico en los productos de PCR amplificados mediante una señal fluorescente o emisión de fluorescencia específica para cada ácido nucleico diana, para asimismo detectar y cuantificar simultáneamente *Listeria spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli O157:H7*, respectivamente, en la muestra de alimento o del medio ambiente.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha mezcla de reacción comprende:
- 200 pmol del iniciador de SEQ ID NO: 1;
- 200 pmol del iniciador de SEQ ID NO: 2;
- 50 pmol de la sonda de SEQ ID NO: 3;
- 200 pmol del iniciador de SEQ ID NO: 4;
- 200 pmol del iniciador de SEQ ID NO: 5;
- 50 pmol de la sonda de SEQ ID NO: 6;
- 300 pmol del iniciador de SEQ ID NO: 7;
- 200 pmol del iniciador de SEQ ID NO: 8;
- 350 pmol de la sonda de SEQ ID NO: 9;
- 200 pmol del iniciador "corriente arriba" de SEQ ID NO: 10;
- 200 pmol del iniciador "corriente abajo" de SEQ ID NO: 11;
- 50 pmol de la sonda de SEQ ID NO: 12;
- 200 μ mol de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs);
- 3,5 μ l de sal magnésica; y
- 5 μ l de ADN extraído de dicha muestra de alimento o del medio ambiente.
3. El método de la reivindicación 1, en el que, para la sonda de SEQ ID NO: 3, el fluoróforo para su extremo 5' es TET y el colorante para su extremo 3' es BHQ-1.
4. El método de la reivindicación 1, en el que, para la sonda de SEQ ID NO: 6, el fluoróforo para su extremo 5' es TxR y el colorante para su extremo 3' es BHQ-2.

5. El método de la reivindicación 1, en el que, para la sonda de SEQ ID NO: 9, el fluoróforo para su extremo 5' es Cy5 y el colorante para su extremo 3' es BHQ-3.
- 5 6. El método de la reivindicación 1, en el que, para la sonda de SEQ ID NO: 12, el fluoróforo para su extremo 5' es FAM y el colorante para su extremo 3' es BHQ-1.
7. El método de la reivindicación 1, en el que la polimerasa termostable de ADN es Taq.
- 10 8. El método de la reivindicación 1, en el que la sal magnésica es cloruro magnésico.
9. Un kit de diagnóstico para la detección y cuantificación simultánea de *Listeria spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli* O157:H7, en una muestra de alimento o del medio ambiente, mediante reacción de amplificación múltiplex, empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, kit de diagnóstico que comprende:
- 15 un primer par de oligonucleótidos iniciadores que consiste en un iniciador "corriente arriba" de SEQ ID NO: 1 y un iniciador "corriente abajo" de SEQ ID NO: 2;
- 20 un segundo par de oligonucleótidos iniciadores que consiste en un iniciador "corriente arriba" de SEQ ID NO: 4 y un iniciador "corriente abajo" de SEQ ID NO: 5;
- un tercer par de oligonucleótidos iniciadores que consiste en un iniciador "corriente arriba" de SEQ ID NO: 7 y un iniciador "corriente abajo" de SEQ ID NO: 8;
- un cuarto par de oligonucleótidos iniciadores que consiste en un iniciador "corriente arriba" de SEQ ID NO: 10 y un iniciador "corriente abajo" de SEQ ID NO: 11;
- 25 una sonda de SEQ ID NO: 3, que está marcada en su extremo 5' con TET y en su extremo 3' con BHQ-1;
- una sonda de SEQ ID NO: 6, que está marcada en su extremo 5' con TxR y en su extremo 3' con BHQ-2;
- una sonda de SEQ ID NO: 9, que está marcada en su extremo 5' con Cy5 y en su extremo 3' con BHQ-3;
- una sonda de SEQ ID NO: 12, que está marcada en su extremo 5' con FAM y en su extremo 3' con BHQ-1;
- 30 cuatro desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) seleccionados del grupo que consiste en adenosina desoxinucleótido trifosfato (dATP), guanosina desoxinucleótido trifosfato (dGTP), timidina desoxinucleótido trifosfato (dTTP), citosina desoxinucleótido trifosfato (dCTP) y nucleótidos análogos de los mismos;
- polimerasa termoestable de ADN; y
- cloruro magnésico.

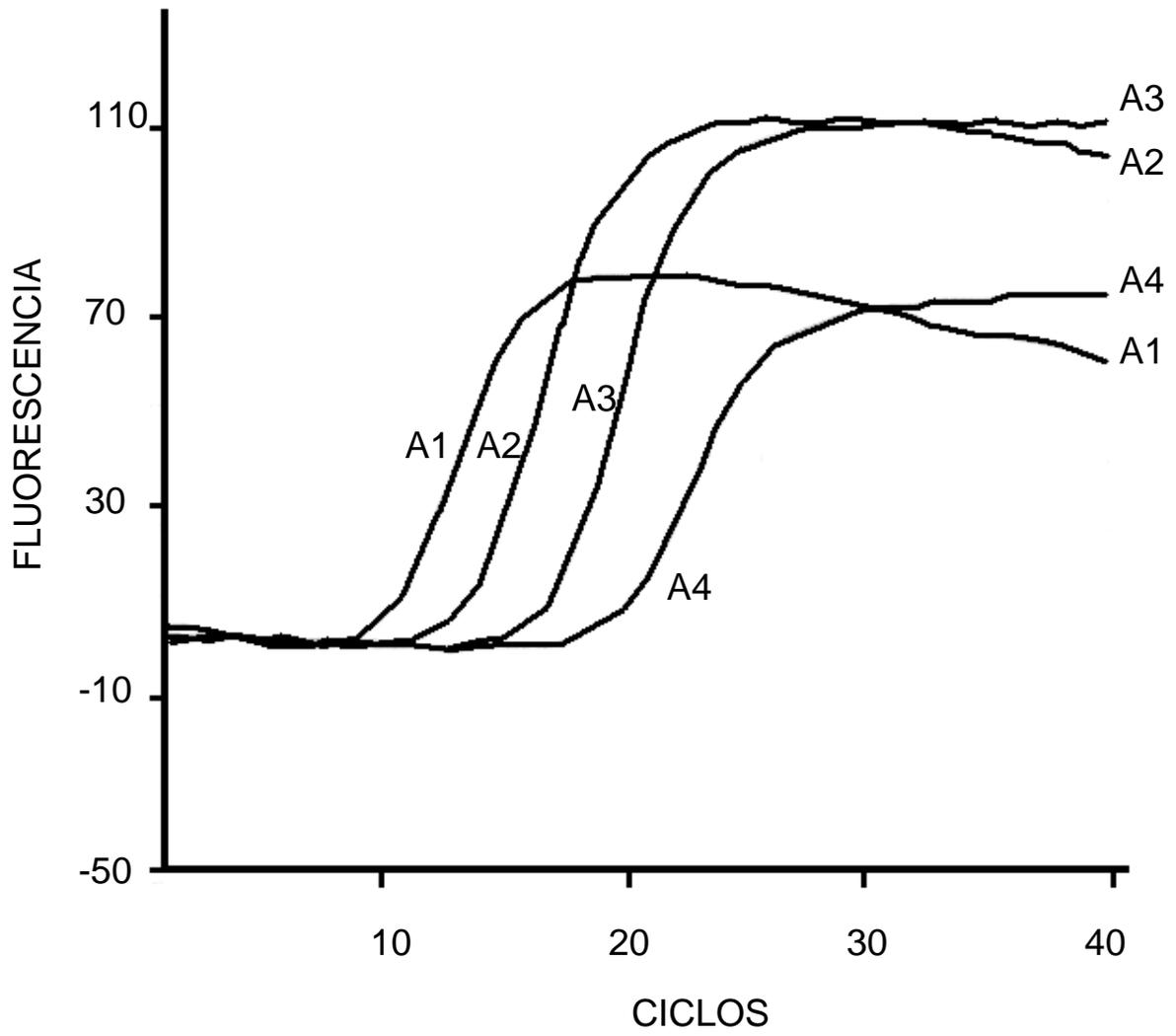


FIG. 1

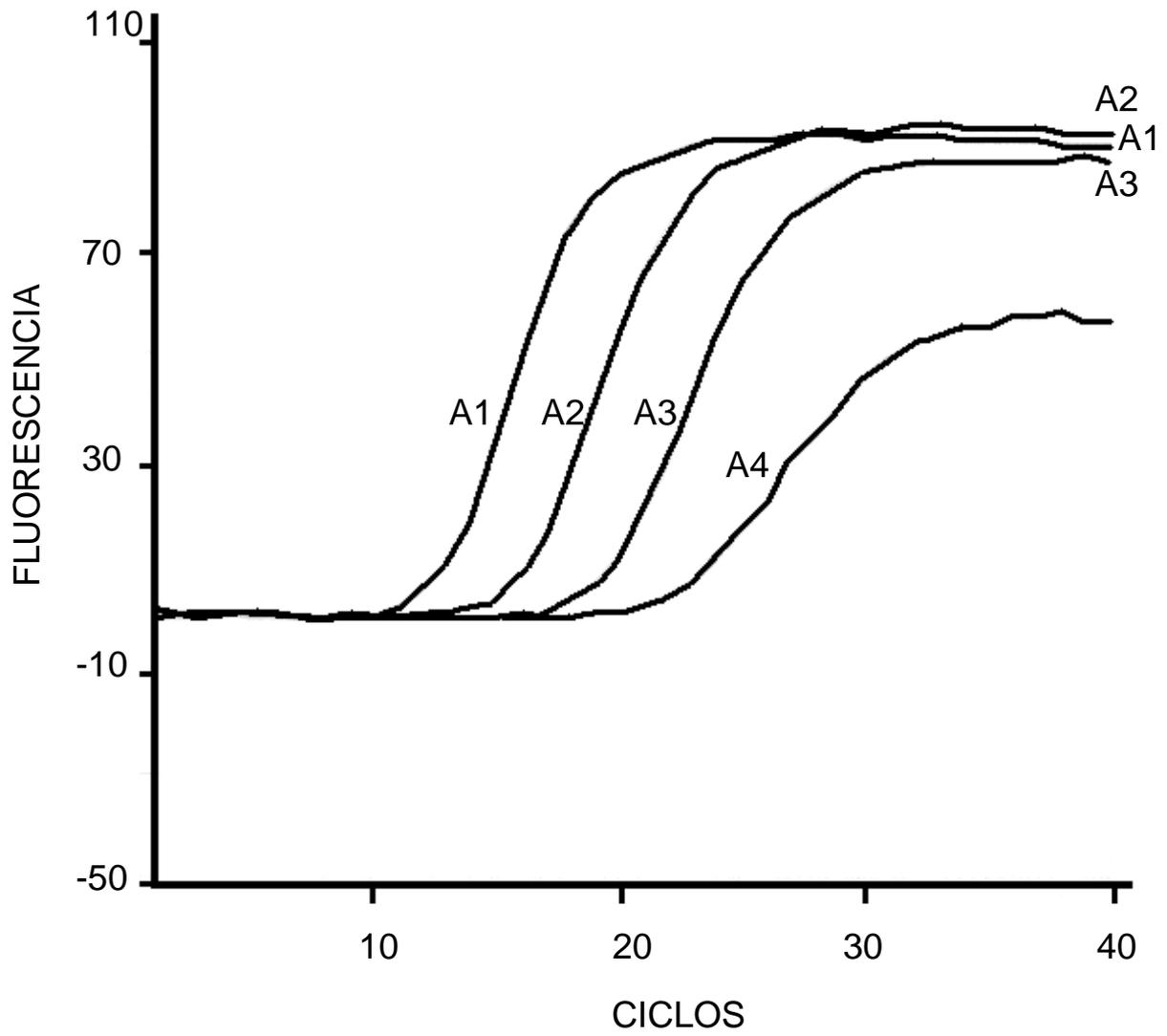


FIG. 2

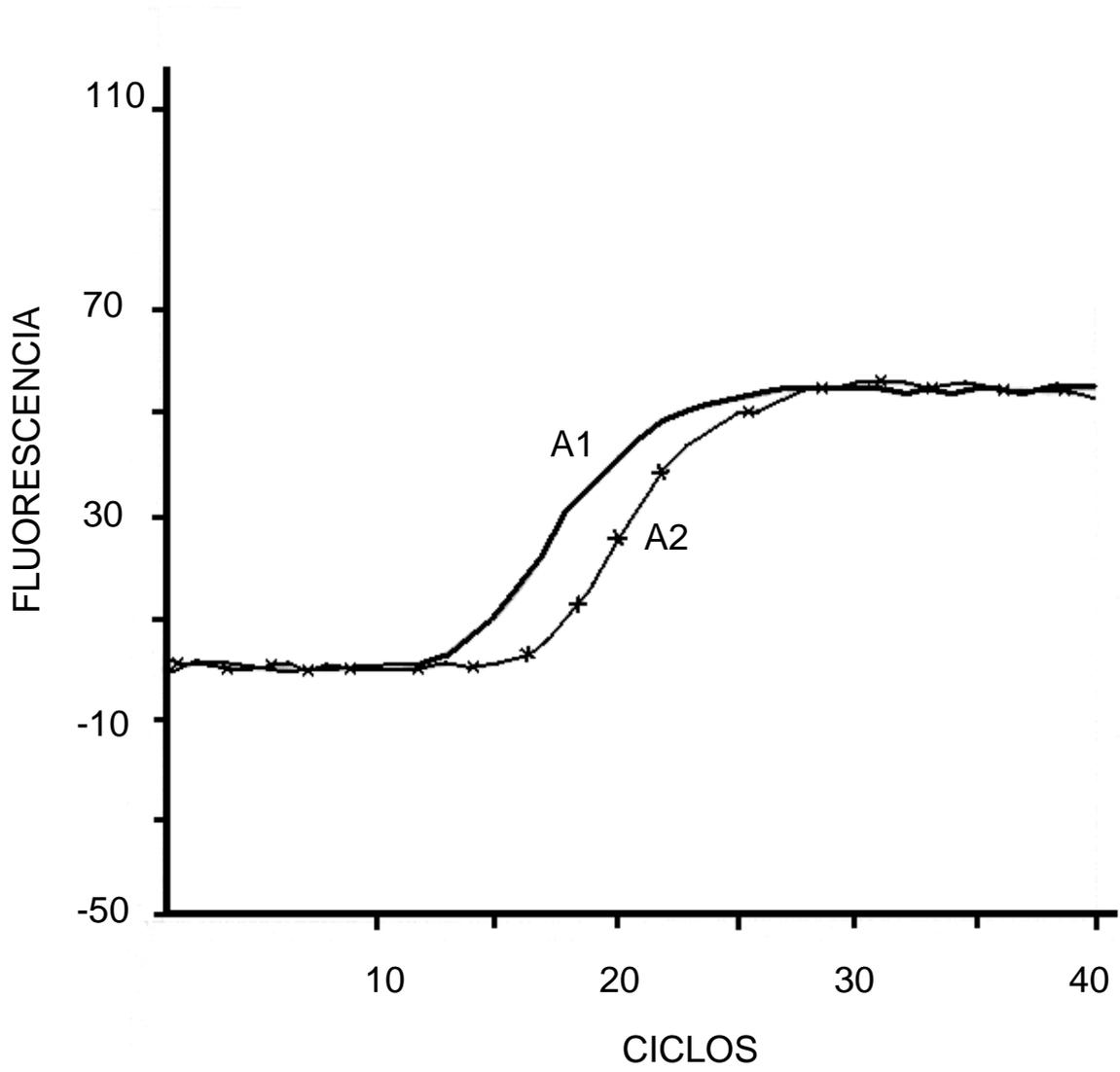


FIG. 3

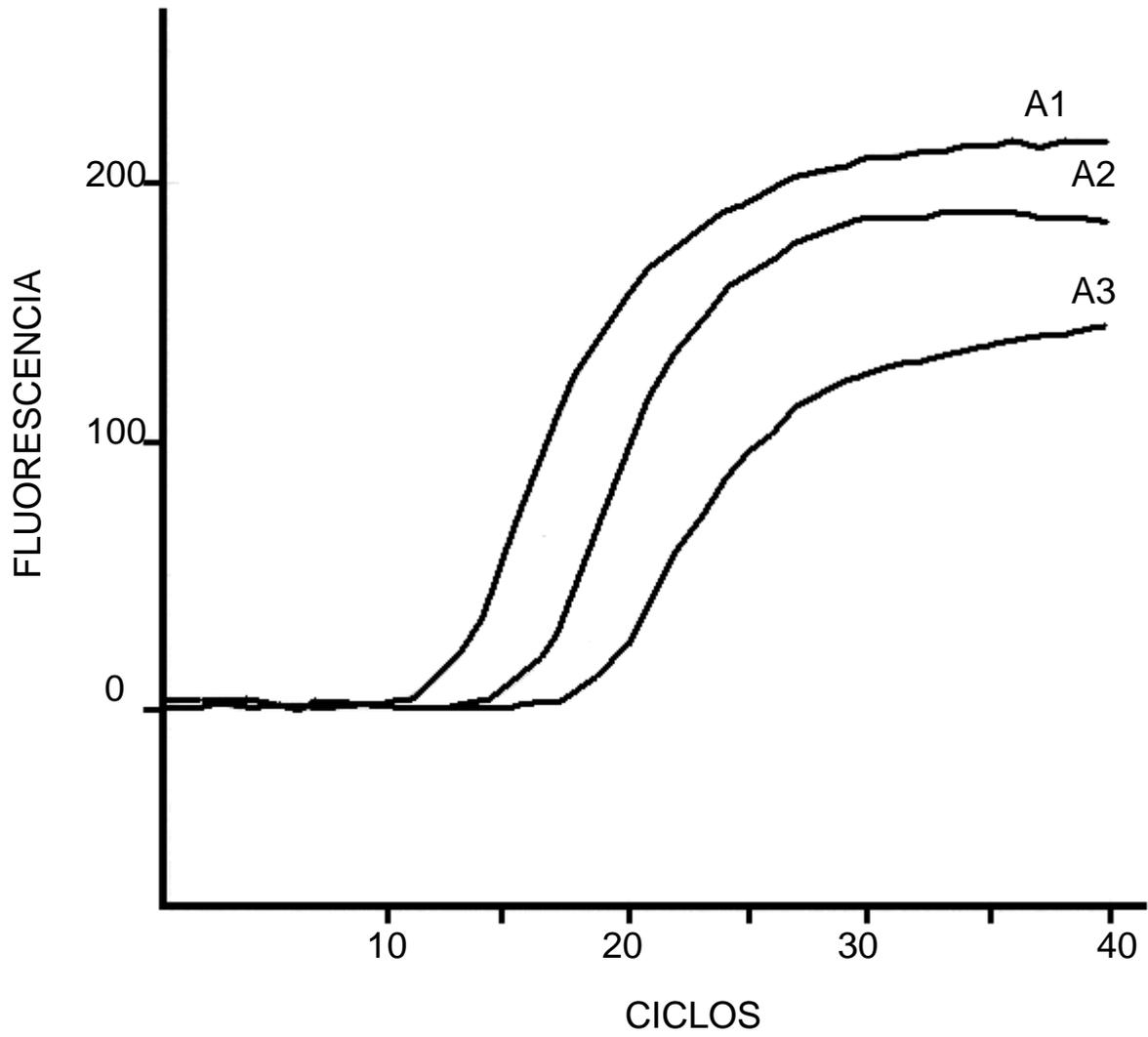


FIG. 4