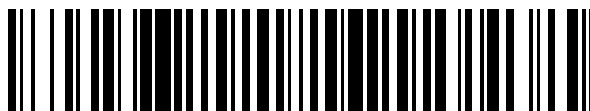


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 146**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2006 E 06712610 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2013 EP 1845158**

54 Título: **Método para analizar cuantitativamente un microorganismo eligiendo como diana un ARNr**

30 Prioridad:

31.01.2005 JP 2005023448

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

06.11.2013

73 Titular/es:

**KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA (100.0%)
1-19, HIGASHISHINBASHI 1-CHOME MINATO-KU
TOKYO 105-8660, JP**

72 Inventor/es:

**TSUJI, HIROKAZU;
MATSUDA, KAZUNORI;
ASAHARA, TAKASHI;
NOMOTO, KOJI y
KIWAKI, MAYUMI**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 428 146 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 analizar cuantitativamente un microorganismo eligiendo como diana un ARNr

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método de cuantificación o detección de un microorganismo, en estado vivo, eligiendo como diana ARNr.

10 **Técnica anterior**

Como método de cuantificación de un microorganismo, se han utilizado convencionalmente principalmente un método que implica el cultivo de un microorganismo en un medio de selección estimado preliminarmente y la medición del número de células microbianas y un método que implica el cultivo de un microorganismo en un medio de selección líquido y la medición de la densidad óptica o la absorbancia. Los métodos siguientes también se han utilizado para la operación de identificación de un microorganismo necesaria en la detección de microorganismos en un espécimen, por ejemplo, un método que implica la identificación de los mismos a través de la observación morfológica, tinción de Gram, y características microbiológicas tales como el requerimiento de oxígeno, las propiedades de asimilación de azúcar y las condiciones de crecimiento en un medio; un método que implica la determinación de los mismos mediante una prueba de homología de ADN-ADN; y un método de detección que utiliza un anticuerpo monoclonal contra un antígeno de superficie microbiano. Sin embargo, estos métodos requieren tiempo y conocimiento práctico y por lo tanto, han presentado un problema desde un punto de vista de la rapidez y la simplicidad.

En los últimos años, los métodos de amplificación de genes incluyendo un método de PCR se han utilizado en una amplia gama de campos como técnicas para la detección de vestigios de ácidos nucleicos. Estos métodos tienen ventajas capaces de conducir a la aceleración y la simplificación, incluyendo ningún requisito obligatorio para el cultivo de un microorganismo contenido en un espécimen y la capacidad de manipular directamente un espécimen como una muestra. Por lo tanto, los métodos han sido sometidos a la investigación de la aplicación a la cuantificación y la detección de un microorganismo.

Como un ejemplo en el que el método de PCR se ha aplicado al análisis de un microorganismo, se conoce un método para la cuantificación de una bacteria mediante un método de PCR que utiliza el ADN total como secuencia diana y cebadores universales (Documento de Patente 1). También se han conseguido métodos que utilizan ADNr 16S como diana. Los ejemplos conocidos de los mismos incluyen un método para el análisis cuantitativo mediante un método de PCR usando ADNr 16S como secuencia diana (Documento de Patente 2), un método para el análisis de una bacteria intestinal mediante un método de PCR usando ADNr 16S como secuencia diana (Documento de Patente 3), y un método para la detección de una cepa bacteriana del género *Lactobacillus*, una bacteria que causa turbidez de la cerveza (Documento de Patente 4). Sin embargo, estos métodos han tenido el problema de que no pueden ser utilizados como alternativas a un método convencional que se ha empleado convencionalmente debido a que no se logra la sensibilidad de detección en la medida obtenida con el método de cultivo. A modo de ejemplo, la realización del método para el análisis cuantitativo como se describe en el documento de Patente 2 requiere una gran cantidad de ADN molde que corresponde a un recuento microbiano de $10^9/\mu\text{l}$ o más, lo que hace que el método no sea práctico. La baja sensibilidad de detección se debe probablemente al bajo número de copias (cantidad de molde), del ADN total o ADNr 16S que se proporciona como molde para la PCR en el microorganismo. Puesto que se sabe que el ADN permanece incluso después de la muerte de un microorganismo, estos métodos sólo cuantifican y detectan microorganismos vivos y muertos juntos, lo que también ha planteado el problema de que es difícil de cuantificar y detectar con precisión un microorganismo en estado vivo (Documento no de patente 1).

Como ejemplos de aplicación de un método de PCR para el análisis de un microorganismo, también se han realizado intentos para llevar a cabo los métodos utilizando ARNm como secuencia diana; los ejemplos conocidos de los mismos incluyen el análisis cuantitativo de una bacteria de ácido láctico en las heces, empleando ARNm como secuencia diana (Documento no de Patente 2). También se conocen métodos para detectar células cancerosas que utilizan como secuencias diana ARNm específicos para las células cancerosas en los especímenes (Documentos de Patente 5 y 6). Sin embargo, incluso estos métodos no han proporcionado la sensibilidad de detección en la medida en que puedan reemplazar el método convencional como métodos de cuantificación. Específicamente, el límite de detección del análisis cuantitativo como se muestra en el Documento de Patente 2 es sólo $10^{3.5}$ o más células/g de heces; el método de análisis no ha sido susceptible de ser utilizado como una alternativa al método de cultivo convencional en vista de la sensibilidad de detección. Además, estos métodos eligen como diana ARNm de genes únicos a los microorganismos, y han sido inadecuados para la detección en un espécimen que se va a someter a ensayo que contiene una gran variedad de microorganismos debido a problemas tales como el complicado diseño del cebador y la reducida especificidad.

En consecuencia, se ha esperado el desarrollo de un método que proporcione la sensibilidad de detección en la misma medida que los métodos de detección convencionales, a la vez que sea un método rápido utilizando un método de PCR o similares y que adicionalmente pueda cuantificar y detectar con precisión un microorganismo en estado vivo.

Para mejorar la sensibilidad, es posible cambiar el diseño de una diana de modo que la diana pueda estar presente de manera más estable o más en abundancia en las células. Sin embargo, tal diana estable es probablemente desfavorable para el propósito de detectar sólo un microorganismo vivo, teniendo en cuenta que se sospecha que también permanece mucho tiempo en una de sus células muertas. Por lo tanto, no es fácil de conseguir de forma simultánea la detección sólo de células vivas y la sensibilidad de detección suficientemente alta.

Además, se ha sabido que el ARNr representa aproximadamente 85% del contenido de ARN en una célula y tiene múltiples copias y que el ARNr es estable en comparación con el ARNm, ya que forma un complejo con la proteína. También se informó que el ARNr es detectado en el orden de 48 horas después de la muerte microbiana (Documento no de Patente 3) y por lo tanto se ha creído comúnmente que es inadecuado para la detección de un microorganismo en estado vivo (Documento no de Patente 1).

Documento de Patente 1: Patente Japonesa Abierta a la Inspección Pública 2002-238585

Documento de Patente 2: Patente Japonesa Abierta a la Inspección Pública 2003-259879

Documento de Patente 3: Patente Japonesa Abierta a la Inspección Pública 2001-112485

Documento de Patente 4: Patente Japonesa Abierta a la Inspección Pública 10-210980

Documento de Patente 5: Patente Japonesa Abierta a la Inspección Pública 10-248600

Documento de Patente 6: Publicación Internacional WO 00/17395 folleto

Documento no de Patente 1: J Food Prot, vol. 67, Núm. 4: 823-832 (2004)

Documento no de Patente 2: FEMS Microbiology Letters, vol. 231: 125-130 (2004)

Documento no de Patente 3: Appl. Environ. Microbiol., Vol. 64, Núm. 11: 4.264-4.268 (1.998)

Van der Vliet et al (Antimicrob. Agents Chemother., 1994, vol. 38, págs. 1959-1965) describieron un método para la evaluación de la viabilidad de micobacterias en una forma semi-cuantitativa utilizando NASBA. Centurion-Lara et al (J. Clin. Microbiol., 1997, vol. 35, págs. 1348-1352) describieron la detección de Treponema mediante PCR de transcriptasa inversa, eligiendo como diana ARN 16S.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método para el análisis cuantitativo de un microorganismo, que pueda lograr la sensibilidad de detección en la medida que sea capaz de reemplazar un método de cultivo convencional y la detección más precisa del microorganismo en estado vivo.

Descripción de la invención

Como resultado de estudios exhaustivos, los autores de la presente invención han encontrado que ARNr (es decir, 5S, 16S, y 23S en las bacterias, y 5S, 18S, 26S o 28S en células eucariotas), que se creía que era inadecuado para la detección de un microorganismo vivo en términos de estabilidad, se puede utilizar inesperadamente como una diana para cuantificar y detectar con precisión el número de células microbianas en estado vivo sin la incorporación de sus células muertas y, adicionalmente que el uso de un método de PCR en la cuantificación y la detección puede lograr la sensibilidad de la detección en la medida que sea capaz de reemplazar un método convencional, y de este modo se ha completado la presente invención.

De este modo, la presente invención proporciona un método de cuantificación de un microorganismo de interés, utilizando como índice la cantidad de ARNr del microorganismo en un espécimen que se va a someter a ensayo, tal como se define en la reivindicación 1.

También se describe un método para detectar un microorganismo de interés, utilizando como índice la presencia de ARNr del microorganismo en un espécimen que se va a someter a ensayo.

La presente invención también proporciona el uso de un fragmento de ácido nucleico en el método anterior, en donde el fragmento es un fragmento de ácido nucleico que contiene una secuencia de bases descrita en una de los SEQ ID NO: 2, 3 y 5 a 28 o una secuencia de bases complementaria a la misma, o un fragmento de ácido nucleico que contiene una secuencia de bases homóloga a la misma y funcionalmente equivalente a la misma, de acuerdo con la reivindicación 8.

La presente invención proporciona adicionalmente el uso de un kit para realizar el método anterior, de acuerdo con la reivindicación 9.

El método de detección eligiendo como diana ARNr se puede utilizar para lograr una alta sensibilidad de detección en comparación con que el uso de una diana convencional, debido a la abundante presencia de la diana a la vez que también se detecta y se cuantifica un microorganismo en estado vivo con más precisión. También se puede utilizar un método de PCR en la detección para lograr la sensibilidad de detección en la medida que sea capaz de

reemplazar un método de cultivo convencional. Además, el método que utiliza un método de PCR puede lograr una notable rapidez y simplicidad en comparación con los métodos convencionales, tal como un método de cultivo. En otras palabras, el método de la presente invención se puede utilizar para lograr simultáneamente alta sensibilidad de detección, cuantificación más precisa y/o detección de un organismo vivo, y rapidez y simplicidad. Por lo tanto, el método de la presente invención se puede utilizar en situaciones prácticas cuando se requiera para detectar y/o cuantificar un microorganismo, tal como el análisis de la flora intestinal y la detección y/o cuantificación de un microorganismo vivo en un espécimen derivado de un alimento o un organismo.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un conjunto de gráficos que muestran una correlación entre el crecimiento de diversos microorganismos y la cantidad de transcripción de ARNr;

La Figura 2 es un conjunto de gráficos que muestran cada uno una curva patrón obtenida mediante un método de RT-PCR cuantitativa y la comparación del intervalo de detección entre el método y un método de PCR cuantitativa;

La Figura 3 es un gráfico que muestra el intervalo de detección de *P. aeruginosa* a partir de heces humanas;

La Figura 4 es un gráfico que muestra la comparación de los valores cuantitativos para enterobacterias fecales humanas cuando se determina mediante un método de RT-PCR cuantitativa y mediante un método de cultivo;

La Figura 5 es un conjunto de gráficos que muestran la sensibilidad de detección de *E. coli*, *S. aureus*, y *B. cereus* a partir de leche de vaca;

La Figura 6 es un conjunto de gráficos que muestran la sensibilidad de detección de *P. aeruginosa* y *S. aureus* a partir de sangre; y

La Figura 7 es un gráfico que muestra la sensibilidad de detección de *E. coli* a partir de un producto lácteo fermentado.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

El método para cuantificar o detectar un microorganismo de interés de acuerdo con la presente invención se caracteriza por utilizar como índice la abundancia o la presencia de ARNr del microorganismo en un espécimen que se va a someter a ensayo.

El ARNr de un microorganismo de interés se refiere a un ARNr que puede tener un microorganismo que vaya a ser cuantificado y detectado. Los ejemplos del ARNr incluyen ARNr procarióticos 5S, 16S y 23S y ARNr eucarióticos 5S, 5,8S, 18S, 26S y 28S; los ARNr, 16S, 23S, 18S y 26S son particularmente preferibles ya que se utilizan principalmente como índices fiables para la clasificación microbiana actual. El microorganismo de interés se refiere a un microorganismo que se va a detectar y cuantificar, y no está particularmente limitado. Los ejemplos de los mismos incluyen microorganismos de la familia Enterobacteriaceae y de los géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Veillonella*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Fusobacterium*, *Propionibacterium*, *Peptostreptococcus*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Campylobacter*, *Acinetobacter*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Helicobacter*, *Neisseria*, *Listeria*, *Haemophilus*, *Mycobacterium*, *Gardnerella*, *Legionella*, *Aeromonas*, *Moraxella* y *Candida*, y microorganismos como los descritos en las Tablas 2 y 3 que se van a mencionar. El microorganismo de interés de acuerdo con la presente invención es un concepto que incluye no sólo un microorganismo de una cepa, sino también un grupo, un género y una familia que se componen cada uno de una población de 2 o más cepas que comparten ciertas propiedades.

El espécimen que se va a someter a ensayo se refiere a un objeto que ha de ser examinado para detectar la presencia, abundancia o similar de un microorganismo. Los ejemplos del espécimen que se va a someter a ensayo incluyen especímenes de origen biológico como frotis conjuntival, cálculo dental, placa dental, expectoración, frotis de garganta, saliva, secreciones nasales, lavado broncoalveolar, derrame pleural, jugo gástrico, lavado gástrico, orina, moco cervical, flujo vaginal, lesión de la piel, heces, sangre, líquido ascítico, tejido, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, y lavado de lesión; y objetos que contienen potencialmente microorganismos, tales como alimentos, medicamentos, cosméticos, productos elaborados intermedios de alimentos, medicamentos y cosméticos, caldo microbiano, plantas, suelo, lodo activado, y agua de drenaje. La muestra de un espécimen que se va a someter a ensayo se refiere a una muestra tomada o preparada a partir de un espécimen que se va a someter a ensayo, y no está particularmente limitada siempre que se trate de una muestra capaz de reflejar la presencia o abundancia de un microorganismo en el espécimen. Los ejemplos de las mismas incluyen una mezcla que contiene nucleótidos y una mezcla que contiene ARN contenidos en un espécimen que se va a someter a ensayo; se prefiere la mezcla que contiene ARN contenidos en un espécimen para su análisis en vista de la utilización de un método de PCR.

La muestra de un espécimen que se va a someter a ensayo se puede obtener apropiadamente, por ejemplo, de la totalidad o parte de un espécimen que se va a someter a ensayo mediante un método conocido, si fuera necesario, después del tratamiento previo utilizando métodos de extracción, separación y purificación. A modo de ejemplo, se puede obtener la mezcla que contiene ARN, por ejemplo, mediante extracción usando un método universal tal como "un método de ultracentrifugación con guanidina-cloruro de cesio", "un método con guanidina ácida - fenol-

cloroformo (AGPC)", "un método con cuentas magnéticas", y "un método en columna de sílice", si fuera necesario, después del tratamiento previo empleando un método conocido tal como filtración, centrifugación, y cromatografía; también se puede utilizar para tal fin un kit comercial (p. ej., QIAGEN RNeasy Kit, TRIZOL).

La muestra de un espécimen utilizado que se va a someter a ensayo es preferentemente RNA en un estado estabilizado en un microorganismo en vista de la prevención de la descomposición del mismo para mantener la alta sensibilidad de detección. La estabilización se puede llevar a cabo usando, por ejemplo, un agente de estabilización comercial (por ejemplo, RNAprotect Bacterial Reagent, RNAlater). La estabilización se lleva a cabo preferiblemente inmediatamente después de recoger el espécimen con el fin de evitar un cambio en la cantidad de ARN en el microorganismo.

La cuantificación de un microorganismo de interés de acuerdo con la presente invención se utiliza como un índice de la cantidad de ARNr del microorganismo en un espécimen que se va a someter a ensayo. Aquí, la cantidad de ARNr de un microorganismo de interés en un espécimen que se va a someter a ensayo se puede determinar, por ejemplo, (1) consiguiendo la cantidad del producto amplificado mediante un método de PCR utilizando fragmentos de ácido nucleico capaces de hibridar específicamente con el ARNr del microorganismo de interés y una muestra del espécimen, (2) consiguiendo la eficacia de la hibridación entre los fragmentos de ácido nucleico capaces de hibridar específicamente con el ARNr del microorganismo de interés y una muestra del espécimen, o (3) utilizando un método cuantitativo que emplea otro método conocido.

Aquí, en el caso (1) de la utilización de un método de PCR, "los fragmentos de ácidos nucleicos capaces de hibridar específicamente con el ARNr de un microorganismo de interés" se pueden diseñar mediante la comparación de la secuencia de bases del microorganismo con las secuencias de bases de otros microorganismos para seleccionar secuencias específicas de ARNr que puede tener el microorganismo de interés. Aquí, se puede obtener la secuencia de ARNr que puede tener el microorganismo, por ejemplo, mediante la comprobación contra una base de datos (DDBJ, GenBank, etc.) Además, las secuencias de bases pueden ser alineadas utilizando soporte lógico (por ejemplo, Clustal X) para encontrar las secuencias específicas mediante un método visual o cualquier otro método. Las secuencias específicas de un microorganismo de interés se seleccionan preferiblemente teniendo en cuenta la amplitud de un campo en el que se incluyen el microorganismo o los microorganismos que se van a cuantificar. Específicamente, por ejemplo, si una cepa se va a cuantificar específicamente, se seleccionan preferiblemente secuencias específicas para la cepa; si se va a cuantificar específicamente un género, se seleccionan preferiblemente secuencias específicas para el género. La selección puede llevarse a cabo adecuadamente usando un método conocido.

Además de las secuencias diseñadas de este modo, se pueden postular apropiadamente los fragmentos de ácido nucleico capaces de hibridarse con el ARNr del microorganismo de interés si se basan en el conocimiento práctico común de la técnica conocida; también se pueden emplear una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases antes mencionada, una secuencia de bases homóloga a la misma utilizable de manera similar para la cuantificación de un microorganismo de interés, y similares. Los ejemplos de la secuencia de bases homóloga incluye un fragmento de ácido nucleico que contiene (a) la secuencia de bases antes mencionada que contiene adicionalmente, sustitución, adición o delección de una o varias, preferiblemente de 1 a 10 bases, (b) una secuencia de bases que tiene una identidad de secuencia de 90% o más, preferiblemente 95% o más, más preferiblemente 99% o más con la secuencia de bases antes mencionada, o (c) una secuencia de bases capaz de hibridar en condiciones rigurosas con un ADN que contiene una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases antes mencionada.

El fragmento de ácido nucleico también puede ser una parte del fragmento de ácido nucleico al que se añaden preferiblemente 100 bases, más preferiblemente 20 bases, aún más preferiblemente 10 bases o menos en ambos o uno de los extremos, preferiblemente al extremo 5', del mismo.

La longitud del fragmento de ácido nucleico no está particularmente limitada; sin embargo, el fragmento comprende preferiblemente de 5 a 50, más preferiblemente 12 a 35 bases.

El fragmento de ácido nucleico diseñado de este modo se puede sintetizar artificialmente, por ejemplo, en un sintetizador de ADN de acuerdo con la secuencia de bases del mismo. El fragmento es preferiblemente aquel cuya especificidad ha sido verificada. Aquí, la especificidad puede ser verificada, por ejemplo, mediante la confirmación de que el uso de ARNr de interés como molde proporciona un producto amplificado por PCR específico cuando se compara con un control adecuado.

Los ejemplos del fragmento de ácido nucleico incluyen fragmentos de ácido nucleico que contienen las secuencias de bases descritas en los SEQ ID NO: 1 a 30 o secuencias de bases complementarias a las mismas, o fragmentos de ácidos nucleicos que contienen secuencias de bases homólogas a la misma y funcionalmente equivalentes a las mismas. Aquí, los ejemplos de los fragmentos de ácidos nucleicos que contienen secuencias de bases homólogas a las mismas y funcionalmente equivalente a las mismas incluyen fragmentos de ácido nucleico como se muestra en los apartados (a) a (c) siguientes, que pueden ser utilizados para la cuantificación y detección de ARNr de un microorganismo de interés.

(a) Un fragmento de ácido nucleico que contiene la secuencia de bases representada por uno de los SEQ ID NO: 1 a 30 o una secuencia de bases complementaria a la misma, en donde el fragmento contiene delección, sustitución o adición de una o varias bases.

(b) Un fragmento de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia del 90% o más, preferiblemente 95% o más, más preferiblemente 99% o más con la secuencia de bases representada por uno de los SEQ ID NO: 1 a 30 o una secuencia de bases complementaria a la misma.

(c) Un fragmento de ácido nucleico que contiene una secuencia de bases capaz de hibridarse en condiciones rigurosas con ADN que contiene la secuencia de bases representada por uno de los SEQ ID NO: 1 a 30 o una secuencia de bases complementaria a la misma.

Aquí, la identidad de la secuencias de bases se calcula utilizando el programa de búsqueda de homología GENETYX (R).

Las "condiciones rigurosas" incluyen, por ejemplo, las condiciones de mantenimiento, para la hibridación, a 42°C durante 16 a 24 horas en una solución que contiene formamida al 50%, 5 x SSC, 5 x solución de Denhardt, y 250 mg/ml de ADN de esperma de salmón.

El fragmento de ácido nucleico utilizable para la cuantificación y detección de ARNr de un microorganismo de interés puede ser obtenido, por ejemplo, mediante la realización de un método de PCR para seleccionar un fragmento de ácido nucleico que proporciona un producto de amplificación cuando se utiliza el ARNr del microorganismo como molde si bien no se proporciona el producto cuando se emplea otra diana, por ejemplo, ARNr de un microorganismo diferente o ARNm, como molde.

A continuación, (1) se pueden utilizar un fragmento de ácido nucleico que contiene la secuencia de bases descrita en los SEQ ID NO: 1 o 2 o una secuencia de bases complementaria a la misma, o un fragmento de ácido nucleico que contiene una secuencia de bases homóloga a la misma y funcionalmente equivalente a la misma para cuantificar y detectar específicamente *Bacillus cereus*; (2) se pueden utilizar un fragmento de ácido nucleico que contiene la secuencia de bases descrita en los SEQ ID NO: 3 o 4 o una secuencia de bases complementaria a la misma, o un fragmento de ácido nucleico que contiene una secuencia de bases homóloga a la misma y funcionalmente equivalente a la misma para cuantificar y detectar específicamente *Clostridium perfringens*; (3) se pueden utilizar un fragmento de ácido nucleico que contiene la secuencia de bases descrita en los SEQ ID NO: 5 o 6 o una secuencia de bases complementaria a la misma, o un fragmento de ácido nucleico que contiene una secuencia de bases homóloga a la misma y funcionalmente equivalente a la misma para cuantificar y detectar específicamente Enterobacteriaceae; (4) se pueden utilizar un fragmento de ácido nucleico que contiene la secuencia de bases descrita en los SEQ ID NO: 7 u 8 o una secuencia de bases complementaria a la misma, o un fragmento de ácido nucleico que contiene una secuencia de bases homóloga a la misma y funcionalmente equivalente a la misma para cuantificar y detectar específicamente el género *Staphylococcus*; (5) se pueden utilizar un fragmento de ácido nucleico que contiene la secuencia de bases descrita en los SEQ ID NO: 9 o 10 o una secuencia de bases complementaria a la misma, o un fragmento de ácido nucleico que contiene una secuencia de bases homóloga a la misma y funcionalmente equivalente a la misma para cuantificar y detectar específicamente el género *Pseudomonas*; (6) se pueden utilizar un fragmento de ácido nucleico que contiene la secuencia de bases descrita en los SEQ ID NO: 11 o 12 o una secuencia de bases complementaria a la misma, o un fragmento de ácido nucleico que contiene una secuencia de bases homóloga a la misma y funcionalmente equivalente a la misma para cuantificar y detectar específicamente el género *Enterococcus*; (7) se pueden utilizar un fragmento de ácido nucleico que contiene la secuencia de bases descrita en los SEQ ID NO: 13 o 14 o una secuencia de bases complementaria a la misma, o un fragmento de ácido nucleico que contiene una secuencia de bases homóloga a la misma y funcionalmente equivalente a la misma para cuantificar y detectar específicamente el subgrupo de *Lactobacillus acidophilus*; (8) se pueden utilizar un fragmento de ácido nucleico que contiene la secuencia de bases descrita en los SEQ ID NO: 15 o 16 o una secuencia de bases complementaria de la misma, o un fragmento de ácido nucleico que contiene una secuencia de bases homóloga a la misma y funcionalmente equivalente a la misma para cuantificar y detectar específicamente el subgrupo de *Lactobacillus Ruminis*; (9) se pueden utilizar un fragmento de ácido nucleico que contiene la secuencia de bases descrita en los SEQ ID NO: 17 o 18 o una secuencia de bases complementaria a la misma, o un fragmento de ácido nucleico que contiene una secuencia de bases homóloga a la misma y funcionalmente equivalente a la misma para cuantificar y detectar específicamente el subgrupo de *Lactobacillus plantarum*; (10) se pueden utilizar un fragmento de ácido nucleico que contiene la secuencia de bases descrita en los SEQ ID NO: 19 o 20 o una secuencia de bases complementaria a la misma, o un fragmento de ácido nucleico que contiene una secuencia de bases homóloga a la misma y funcionalmente equivalente a la misma para cuantificar y detectar específicamente el subgrupo de *Lactobacillus reuteri*; (11) se pueden utilizar un fragmento de ácido nucleico que contiene la secuencia de bases descrita en los SEQ ID NO: 21 o 22 o una secuencia de bases complementaria a la misma, o un fragmento de ácido nucleico que contiene una secuencia de bases homóloga a la misma y funcionalmente equivalente a la misma para cuantificar y detectar específicamente el subgrupo de *Lactobacillus sakei*; (12) se pueden utilizar un fragmento de ácido nucleico que contiene la secuencia de bases descrita en los SEQ ID NO: 23 o 24 o una secuencia de bases complementaria a la misma, o un fragmento de ácido nucleico que contiene una secuencia de bases homóloga a la misma y funcionalmente equivalente a la misma para cuantificar y detectar específicamente el subgrupo de *Lactobacillus casei*; (13) se pueden utilizar un fragmento de

ácido nucleico que contiene la secuencia de bases descrita en los SEQ ID NO: 25 o 26 o una secuencia de bases complementaria a la misma, o un fragmento de ácido nucleico que contiene una secuencia de bases homóloga a la misma y funcionalmente equivalente a la misma para cuantificar y detectar específicamente *Lactobacillus brevis*; (14) se pueden utilizar un fragmento de ácido nucleico que contiene la secuencia de bases descrita en los SEQ ID NO: 27 o 28 o una secuencia de bases complementaria a la misma, o un fragmento de ácido nucleico que contiene una secuencia de bases homóloga a la misma y funcionalmente equivalente a la misma para cuantificar y detectar específicamente *Lactobacillus Fructivorans*; y (15) se pueden utilizar un fragmento de ácido nucleico que contiene la secuencia de bases descrita en los SEQ ID NO: 29 o 30 o una secuencia de bases complementaria a la misma, o un fragmento de ácido nucleico que contiene una secuencia de bases homóloga a la misma y funcionalmente equivalente a la misma para cuantificar y detectar específicamente *Lactobacillus fermentum*.

Aquí, el fragmento de ácido nucleico que contiene la secuencia de bases en el SEQ ID NO: 1 es un fragmento de ácido nucleico conocido como se describe en FEMS Microbiology Letters, vol. 202: 209-213 (2001). El fragmento de ácido nucleico que contiene la secuencia de bases en el SEQ ID NO: 4 es un fragmento de ácido nucleico conocido como se describe en Microbiol. Immunol., Vol. 46, Núm. 5: 353-358 (2002). El fragmento de ácido nucleico que contiene la secuencia de bases en el SEQ ID NO: 29 o 30 es un fragmento de ácido nucleico conocido como se describe en la Patente Japonesa Abierta a la Inspección Pública Núm. 11-151097. En contraste, los fragmentos de ácido nucleico que contienen las secuencias de bases descritas en los SEQ ID NO: 2, 3 y 5 a 28 son fragmentos de ácidos nucleicos encontrados por los autores de la presente invención.

El método de PCR que utiliza los fragmentos de ácido nucleico preparados de este modo y una muestra de un espécimen que se va a someter a ensayo se puede realizar mediante "PCR en un sistema de reacción que contiene la muestra, usando los fragmentos de ácido nucleico como cebadores y el ARNr de un microorganismo de interés como molde". El método de la PCR no está particularmente limitado siempre que la reacción amplifique específicamente un fragmento de nucleótidos derivado de ARNr de un microorganismo de interés. Se prefiere un método que incluye la etapa de utilización del ARNr del microorganismo de interés como molde para preparar ADNc empleando una enzima, preferiblemente una transcriptasa inversa, o similares. Es más preferido un método que incluye, además de la anterior etapa, la etapa de utilización del ADNc preparado de este modo como molde para amplificar el fragmento de nucleótidos. El método de PCR se puede llevar a cabo usando, por ejemplo, una RT-PCR conocida. Aquí, la RT-PCR puede llevarse a cabo utilizando un método conocido tal como RT-PCR de dos etapas y RT-PCR de una sola etapa, sin embargo, es preferible la RT-PCR de una sola etapa ya que es particularmente sencilla y evita la contaminación cruzada.

El método de RT-PCR de una sola etapa se puede llevar a cabo usando, por ejemplo, un kit comercial (por ejemplo, el kit QIAGEN One-Step RT-PCR). La enzima que tiene una actividad de transcripción que se puede utilizar en la reacción de RT puede ser cualquiera de varias transcriptasas inversas, tales como transcriptasa inversa M-MHV. La ADN polimerasa utilizada en la amplificación de ADN por PCR tiene preferiblemente una resistencia al calor a una temperatura de 90°C o más.

La PCR puede llevarse a cabo mediante la realización de uno a varios ciclos de una reacción de desnaturalización térmica para la conversión de ADN de doble cadena en el ADN de cadena sencilla, una reacción de recocido para la hibridación de cebadores al molde de ADNc y una reacción de extensión para permitir que la ADN polimerasa actúe, bajo condiciones de temperatura de 90 a 98°C, 37 a 72°C y 50 a 75°C, respectivamente. Un ejemplo preferido de condiciones de reacción es la desnaturalización térmica a 95°C durante 30 segundos, recocido a 60°C durante 30 segundos, y extensión a 72°C durante 60 segundos.

Para la PCR, se utilizan preferiblemente dos tipos de cebadores como un conjunto. Aquí, se necesita elaborar los dos cebadores para formar una combinación de una cadena principal y una cadena retardada. Los fragmentos de ácido nucleico proporcionados por la presente invención se ajustan para tener una temperatura de recocido aproximadamente constante en la RT-PCR, lo que permite someter a ensayo fragmentos de ácido nucleico de una pluralidad de microorganismos al mismo tiempo. El fragmento de ácido nucleico de la presente invención también puede ser utilizado como sonda, y se puede emplear también combinado con un cebador universal diferente conocido, oligonucleótido o similares.

La muestra de un espécimen que se va a someter a ensayo que contiene ARNr que proporciona un molde para la RT-PCR tiene preferiblemente un contenido total de ARN de 1 pg a 1 µg, más preferiblemente de 10 pg a 0,1 µg.

Cuando la PCR se lleva a cabo adecuadamente, por lo general existe una correlación entre "la cantidad de producto amplificado por PCR", "el número de ciclos de PCR", y "la cantidad de molde para la PCR". Por lo tanto, la cantidad de ARNr de un microorganismo de interés se puede determinar si el cálculo se lleva a cabo adecuadamente teniendo en cuenta la cantidad de producto amplificado formado por la PCR llevada a cabo de este modo y el número de ciclos de PCR.

Como se muestra en la Figura 1 del ejemplo que se va a describir, se ha demostrado que también existe una buena correlación entre "la cantidad de ARNr del microorganismo de interés" determinada de este modo y "el número de células del microorganismo de interés". Por consiguiente, el número de células del microorganismo de interés se puede determinar si el cálculo se lleva a cabo teniendo en cuenta "la cantidad de ARNr del microorganismo de interés" determinada de este modo. Sin someterse al proceso de cálculo de "la cantidad de ARNr del microorganismo de interés", el número de células del microorganismo de interés se puede determinar incluso mediante el cálculo apropiado teniendo en cuenta "la cantidad del producto amplificado formado por la PCR" y "el número de ciclos de PCR" obtenidos como se describió anteriormente.

La cantidad de producto amplificado por PCR y el número de ciclos de PCR se pueden averiguar mediante cualquier procedimiento sin limitación particular, por ejemplo, mediante la identificación del número de ciclos de PCR cuando el ADN alcanza una cierta cantidad elegida arbitrariamente. La identificación se puede realizar, por ejemplo, mediante el uso de "un método de PCR que incluye etiquetado de un producto de PCR en combinación con un método de PCR que incluye la medición de la marca a lo largo del tiempo" para identificar el número de ciclos de PCR cuando se alcanza una cierta intensidad de fluorescencia seleccionada. Aquí, la cierta intensidad de fluorescencia se selecciona preferiblemente "dentro del intervalo que puede alcanzar la intensidad cuando el producto de amplificación se incrementa logarítmicamente" en términos de lo que refleja una correlación entre los mismos adecuada. El intervalo puede entenderse adecuadamente usando un método conocido. Aquí, los ejemplos del marcaje incluyen marcaje con un tinte fluorescente; los ejemplos de la medición de la marca incluyen la medición de la intensidad de fluorescencia. Aquí, los ejemplos del marcaje con el colorante fluorescente incluyen el marcaje con un colorante fluorescente intercalante. Los ejemplos del colorante fluorescente intercalante incluyen SYBR (R) Green I. El colorante intercalante tiene la propiedad de que la intensidad de fluorescencia se ve reforzada por la intercalación del mismo en un ácido nucleico de doble hebra, lo que da como resultado la emisión de una fluorescencia de una que tiene una intensidad que refleja la cantidad de un producto de PCR amplificado. El marcaje con un colorante fluorescente también se puede realizar mediante el uso de una sonda TaqMan, Molecular Beacon o similar marcada con el colorante fluorescente. La sonda TaqMan o Molecular Beacon es una sonda en la que un colorante fluorescente y un extintor se unen a un oligonucleótido homólogo a una secuencia interna de una región amplificada por PCR, y se utiliza permitiendo que coexista en un sistema de PCR. La interacción del colorante fluorescente y el extintor unido a la sonda permite la emisión de fluorescencia en respuesta a una reacción de amplificación por PCR, permitiendo de este modo que se observe a lo largo del tiempo un producto de PCR amplificado mediante la medición de la intensidad de fluorescencia en cada etapa de PCR. Sin embargo, la sonda TaqMan, Molecular Beacon, o similar hace que sea necesario seleccionar una secuencia complementaria específica del microbio adecuada para la sonda, lo que puede ser difícil dependiendo del objeto.

La cantidad de ARNr puede determinarse considerando "la cantidad de producto amplificado por PCR y el número de ciclos de PCR" averiguados de este modo y los resultados de un experimento comparativo adecuado. Específicamente, la cantidad de ARNr del microorganismo de interés se puede calcular utilizando un método conocido, por ejemplo, teniendo en cuenta "los resultados del experimento comparativo realizado empleando un ARNr cuya cantidad se conoce" para contrastar adecuadamente con los mismos "la cantidad de producto amplificado mediante PCR y el número de ciclos de PCR" averiguados como se describió anteriormente.

A continuación, se puede determinar el número de células de un microorganismo de interés considerando "la cantidad de ARNr del microorganismo" calculada de este modo y los resultados de un experimento comparativo adecuado. En concreto, el número de células del microorganismo de interés se puede calcular utilizando un método conocido, por ejemplo, teniendo en cuenta "los resultados del experimento comparativo realizado empleando una muestra de un espécimen que se va a someter a ensayo en el que se conoce el número de células del microorganismo correspondiente" para contrastar adecuadamente con los mismos "la cantidad de ARNr del microorganismo de interés" calculada de este modo. En el contraste, en vista de la simplicidad, se utiliza preferiblemente una curva patrón que muestra una correlación entre "el número de células del microorganismo de interés" utilizado como molde para la PCR y "el número de ciclos de PCR" cuando se alcanza la cierta cantidad de producto amplificado mediante PCR (en lo sucesivo referido a veces como valor C_T). La curva patrón se prepara típicamente trazando el valor de C_T con respecto al número de células de un microorganismo elegido como diana (véase la Figura 2). El microorganismo utilizado para la preparación de la curva patrón puede ser una cepa conocida tal como la cepa tipo del mismo.

Sin someterse al proceso de calcular específicamente la cantidad de ARNr, el número de células del microorganismo de interés también se puede calcular directamente contrastando apropiadamente "los resultados de un experimento comparativo realizado utilizando una muestra de un espécimen que se va a someter a ensayo, en la que se conoce el número de células del microorganismo correspondiente" con "la cantidad de producto amplificado mediante PCR y el número de ciclos de PCR" averiguados como se ha descrito anteriormente. Específicamente, el valor de C_T derivado de la muestra del espécimen que se va a someter a ensayo se puede aplicar a la curva patrón descrita anteriormente.

Como se describió anteriormente, la cantidad de ARNr de un microorganismo de interés en un espécimen que se va a someter a ensayo también se puede determinar, por ejemplo, (2) averiguando la eficacia de la hibridación entre un fragmento de ácido nucleico capaz de hibridar específicamente con el ARNr del microorganismo de interés y una muestra del espécimen que se va a someter a ensayo.

Aquí, los fragmentos de ácido nucleico capaces de hibridar específicamente con el ARNr del microorganismo de interés, que pueden ser utilizados son, por ejemplo, los diseñados y preparados como se ha descrito anteriormente. El fragmento de ácido nucleico es preferiblemente un fragmento de ácido nucleico marcado. Aquí, ejemplos de la marca incluyen una enzima, un ión paramagnético, biotina, un colorante fluorescente, un cromóforo, un metal pesado, y un radioisótopo; los ejemplos más preferidos del marcador incluyen una enzima. Aquí, los ejemplos de la enzima incluyen peroxidasa de rábano picante y fosfatasa alcalina. El marcaje puede llevarse a cabo mediante un método conocido.

La cantidad de ARNr de un microorganismo de interés en una muestra que se va a someter a ensayo y/o el número de células del microorganismo se puede averiguar utilizando un método de conversión conocido por la medición de la extensión de la hibridación entre una muestra del espécimen que se va a someter a ensayo y el fragmento de ácido nucleico. El método de medición de la extensión de la hibridación no está particularmente limitado y puede llevarse a cabo de acuerdo con un método conocido; por ejemplo, se puede llevar a cabo mediante la medición de la marca añadida al fragmento de ácido nucleico. Específicamente, por ejemplo, el método puede llevarse a cabo mediante la medición de la intensidad de fluorescencia cuando se utiliza el fragmento de ácido nucleico marcado con un colorante fluorescente. La medición se lleva a cabo preferiblemente en paralelo con la medición mediante el uso de un control adecuado. Aquí, ejemplos del control adecuado incluyen "una muestra conocida por no hibridar específicamente con el fragmento de ácido nucleico utilizado", "una muestra derivada de un espécimen que se va a someter a ensayo en donde la muestra contiene un número ya conocido de células de un microorganismo de interés", y "una muestra tomada o preparada a partir de un espécimen que se va a someter a ensayo, donde el espécimen contiene una cantidad ya conocida de ARNr de un microorganismo de interés". Al verificar contra el control, se puede averiguar la cantidad de ARNr o el número de células del microorganismo de interés utilizando un método de conversión conocido. El número de células del microorganismo de interés también se puede averiguar mediante el uso de un método conocido teniendo en cuenta la cantidad de ARNr del microorganismo de interés calculado de este modo y los resultados de un experimento comparativo adecuado.

Un método de detección de un microorganismo de interés utiliza como índice la presencia de ARNr del microorganismo en una muestra de un espécimen que se va a someter a ensayo. Aquí, el término "la detección de un microorganismo" incluye la identificación del microorganismo. El término también incluye la determinación de la presencia de un microorganismo que se va a detectar en una muestra o la ausencia de un microorganismo que se va a detectar en una muestra.

Para determinar la presencia de ARNr de un microorganismo de interés en un espécimen que se va a someter a ensayo usando el método de detección de la presente invención, puede llevarse a cabo la detección descrita en los apartados (1), (2), o (3) de más abajo, por ejemplo.

(1) Detectando un producto amplificado mediante PCR usando un fragmento de ácido nucleico capaz de hibridar específicamente con el ARNr del microorganismo de interés y una muestra del espécimen que se va a someter a ensayo.

(2) Detectando la hibridación entre el fragmento de ácido nucleico y de la muestra.

(3) Detectando el ARNr del microorganismo mediante la utilización de un método conocido diferente.

Los métodos (1) a (3) se pueden realizar fácilmente teniendo en cuenta los métodos descritos anteriormente. La presencia de ARNr del microorganismo de interés indica que el microorganismo está presente en la muestra que se va a someter a ensayo, lo que permite la detección del microorganismo. Sin embargo, la detección se lleva a cabo preferiblemente mediante la comparación con un control adecuado porque se puede producir la amplificación no específica del producto de la PCR y la hibridación no específica.

Como se muestra en los Ejemplos descritos más adelante, se ha demostrado que se puede lograr una alta sensibilidad de detección mediante el método cuantitativo que utiliza la cantidad de ARNr como índice y el método de detección que utiliza la presencia de ARNr como índice en comparación con la de los métodos convencionales que utilizan la cantidad de ADN como índice. Como se muestra en los Ejemplos que se van a describir, también se ha demostrado que el método que utiliza la cantidad de ARNr como índice puede cuantificar y detectar con precisión un microorganismo en estado vivo sin cuantificar ni detectar la células muertas junto con el mismo.

Por lo tanto, el uso del método de cuantificación de la presente invención (en adelante, también referido como "el método de la presente invención") permite cuantificar específicamente un microorganismo a una sensibilidad de detección mayor que la de los métodos convencionales e incluso en estado vivo de los mismos. Por consiguiente, el método de la presente invención se puede utilizar, por ejemplo, en aplicaciones descritas en los apartados (1) a (4) de más abajo.

(1) Una aplicación en la que un microorganismo de interés contenido en un espécimen que se va a someter a ensayo se cuantifica en un estado en vivo a una sensibilidad de detección mayor que la de los métodos convencionales.

(2) Una aplicación en la que se cuantifica y se detecta el número de células muertas de un microorganismo contenido en un espécimen que se va a someter a ensayo a una sensibilidad de detección mayor que la de los métodos convencionales.

(3) Una aplicación en la que se mide la razón de los números de células muertas y vivas de un microorganismo a una sensibilidad de detección mayor que la de los métodos convencionales.

(4) Una aplicación en la que se "determina" la abundancia de un microorganismo vivo a una sensibilidad de detección mayor que la de los métodos convencionales.

Aquí, la determinación incluye, por ejemplo, (a) cuantificación para la determinación de la abundancia de un microorganismo vivo cuando se necesita comprobar el número de células del microorganismo de manera más exacta y precisa y (b) cuando "el número de células de un microorganismo vivo" se ha calculado en otro sistema experimental, la determinación para examinar la exactitud del experimento y la precisión de los valores numéricos calculados. A este respecto, cuando se cuantifica el número de células muertas, la medición del número total de células muertas y células vivas se realiza preferiblemente junto con la misma, por ejemplo, mediante un método conocido por detectar las células muertas junto con las células vivas. El número de las células muertas se puede determinar restando el número de las células vivas calculado mediante el método de la presente invención del número total.

El método de la presente invención también se puede utilizar como método para cuantificar un microorganismo difícil de medir por métodos convencionales, tal como un microorganismo incapaz de formar colonias y un microorganismo no susceptible de cultivo líquido.

Como se muestra en los Ejemplos descritos más adelante, se ha demostrado que el uso de un método de PCR en el método de cuantificación y detección puede lograr la sensibilidad de detección en la misma medida que un método de cultivo. Por lo tanto, el método también se puede utilizar como método de cuantificación o detección de un microorganismo a la sensibilidad de detección en la misma medida o más que el método de cultivo, es decir, en una sensibilidad de detección de 10^6 células o más/g de espécimen o 10^6 células o más/ml de espécimen.

Un microorganismo puede ser también cuantificado o detectado muy rápidamente y simplemente cuando se utiliza el método de PCR, en comparación con el método de cultivo. Además, de acuerdo con el método que utiliza el método de PCR, el proceso de extracción de ARN a partir de un espécimen para la cuantificación o la detección del microorganismo puede ser completado en el plazo de alrededor de 6 horas. Por lo tanto, el método también se puede utilizar como método capaz de detectar un microorganismo en un corto período de tiempo (en el plazo de 6 horas).

El uso del método que utiliza un método de PCR de acuerdo con la presente descripción puede lograr simultáneamente alta sensibilidad de detección, cuantificación más precisa y la detección de un microorganismo vivo, y rapidez y simplicidad. Por lo tanto, el método de la presente descripción se puede utilizar, por ejemplo, en la aplicación de "el examen de bacterias contaminantes y peligrosas, microorganismos patógenos, o similares" en la instalación médica y la industria alimentaria donde es especialmente requerida la cuantificación o detección rápida y sensible.

El método de la presente invención también puede llevarse a cabo utilizando un kit para realizar el método. Aquí, los ejemplos del kit para realizar el método incluyen un kit que contiene (1) fragmentos de ácido nucleico capaces de hibridar específicamente con ARNr de un microorganismo de interés, (2) un protocolo en el que se describe un método de aplicación, y/o (3) un reactivo utilizado para la extracción de ARN, la estabilización de ARN, y/o una PCR. Sin embargo, el kit de la presente invención no se limita a ello, y se refiere a una colección de todos o parte de los requisitos para la realización de todas o parte de las etapas del método. Aquí, "requisitos para la realización de las etapas" pueden entenderse adecuadamente teniendo en cuenta la descripción expuesta en esta memoria descriptiva.

Ejemplos

El contenido de la presente invención se describe a continuación con más detalle por medio de Ejemplos. Sin embargo, no se pretende que la invención está limitada a los mismos.

Ejemplo 1: Preparación de cebadores

Para diversas cepas bacterianas, se obtuvieron secuencias de ADN para ARNr 16S y 23S del Banco de Datos de ADN de Japón (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcom-j.html>). Estas secuencias fueron alineadas utilizando el programa Clustal W, seguido por la preparación de un árbol filogenético. Las cepas fueron clasificadas por familia, género y

5

subgrupo sobre la base del árbol filogenético; los cebadores se diseñaron para cada clasificación. Las secuencias de los cebadores preparados y de las especies de ARNr de interés se muestran en la Tabla 1. Las referencias en las que se describen las secuencias se muestran en la columna de "referencias" en la Tabla 1. Si la columna está en blanco, esto indica que la secuencia es una secuencia novedosa encontrada por la presente invención. A este respecto, el Documento no de Patente 4 representa Microbiol. Immunol., Vol. 46, Núm. 5: 353-358 (2002); el Documento no de Patente 5, FEMS Microbiology Letters, vol. 202, 209-213 (2001), y el Documento de Patente 7, la Patente Japonesa Abierta a la Inspección Pública Núm. 11-151097.

[Tabla 1-1]

SEQ ID NO:	Dianas		Nombres de los cebadores	Secuencias	Tamaños de los productos de amplificación (pb)	Referencias
1	Bacillus cereus	ARN 16S	SS-Bc-200-a-S-18	TCGAAATTGAAAGGCGGC	285	Documento no de Patente 5
2			Bc2R	CCAGCTTATTCAACTAGCACTT		
3	Clostridium perfringens	ARN 16S	s-CIPER-F	GGGGGTTTCAACACCTCC	170	Documento no de Patente 4
4			CIPER-R	GCAAGGATGTCAAGTGT		
5	Enterobacteriaceae	23S ARNr	En-1SU 3F	TGCCGTAAGTTCGGGAGAAGGCA	428	
6			En-1SU 3'R	TCAAGGACCAGTGTTTCAGTGTC		
7	Staphylococcus	ARN 16S	g-Staph-F	TTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAA	79	
8			g-Staph-R	AACAACCTTTATGGGATTTGCWTGA		
9	Pseudomonas	ARN 16S	PSD7F	CAAACTACTGAGCTAGAGTACG	215	
10			PSD7R	TAAGATCTCAAGGATCCCAACGGCT		
11	Enterococcus	ARN 16S	g-Encoc-F	ATCAGAGGGGGATAAACTT	336	
12			g-Encoc-R	ACTCTCATCCTTGTTCTTCTC		
13	Subgrupo de Lactobacillus acidophilus	ARN 16S	sg-Laci-F	GATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGAT	197	
14			sg-Laci-R	TAAAGGCCAGTTACTACCTCTATCC		
15	Subgrupo de Lactobacillus ruminis	ARN 16S	sg-Lrum-F	CACCGAATGCTTGCAITCA	182	
16			sg-Lrum-R	GCCGCGGGTCCATCCAAAA		
17	Subgrupo de Lactobacillus plantarum	ARN 16S	sg-Lpla-F	CTCTGGTATTGATTGGTGCTTGTCAT	54	
18			sg-Lpla-R	GTTCGCCACTCACTCAAATGTAAA		
19	Subgrupo de Lactobacillus reuteri	ARN 16S	sg-Lreu-F	GAACGCAYTGCCCAA	290	
20			sg-Lreu-R	TCCATTGTGGCCGATCAGT		

10

[Tabla 1-2]

SEQ ID NO:	Dianas		Nombres de los cebadores	Secuencias	Tamaños de los productos de amplificación (pb)	Referencias
21	Subgrupo de Lactobacillus sakei	ARN 16S	sg-Lsak-F	CATAAAACCTAMCACCGCATGG	303	
22			sg-Lsak-R	TCAGTTACTATCAGATACRTTCTTCTC		
23	Subgrupo de Lactobacillus casei	ARN 16S	sg-Lcas-F	ACCGCATGGTTCTTGGC	296	
24			sg-Lcas-R	CCGACAACAGTTACTCTGCC		

SEQ ID NO:	Dianas		Nombres de los cebadores	Secuencias	Tamaños de los productos de amplificación (pb)	Referencias
25	Lactobacillus brevis	ARN 16S	s-Lbre-F	ATTTTGTGGTAAAGGTGGCTTCGG	289	
26			s-Lbre-R	ACCCTTGAACAGTTACTCTCAAAGG		
27	Fructivorans Lactobacillus	ARN 16S	s-Lfru-F	TGCGCCTAATGATAGTTGA	452	
28			s-Lfru-R	GATACCGTCGCGACGTGAG		
29	Lactobacillus fermentum	ARN 16S	Lfer-1	CCTGATTGATTTTGGTCGCCAAC	414	Documento de Patente 7
30			Lfer-2	ACGTATGAACAGTTACTCTCATACGT		Documento de Patente 7

W = A, T: Y = C, T: M = A, C: R = A, G

Ejemplo 2: Determinación de la especificidad de los cebadores

5 Para determinar si los cebadores del Ejemplo 1 tienen especificidad o no, se examinaron para determinar la especificidad para diversas bacterias. Específicamente, se añadieron 50 µl de cada uno de los diversos cultivos bacterianos mostrados en la Tabla 2 (57 especies en 28 géneros) y la Tabla 3 (60 especies en 18 géneros) en el doble del volumen de RNAprotect Bacterial Reagent (QIAGEN) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. La suspensión se centrifugó a continuación a 5.000 g durante 10 minutos y se sometió a la eliminación del sobrenadante. A esto se le añadieron 450 µl de tampón bacteriolítico (346,5 µl de tampón RLT (QIAGEN), 3,5 µl de β-mercaptoetanol, 100 µl de tampón TE) y 300 mg de cuentas de vidrio (0,1 mm de diámetro), que a continuación se mezcló vigorosamente mediante FastPrep FP120 (Bio 101) a 5.000 rpm durante un minuto para triturar las células bacterianas. A la solución triturada se le añadieron 500 µl de fenol saturado en agua, que a continuación se incubó a 60°C durante 10 minutos. A esto se le añadieron 100 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (CIA), que se mezcló y a continuación se sometió a centrifugación a 12.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Al sobrenadante recuperado se le añadió un volumen igual de fenol saturado en agua/cloroformo, que a continuación se mezcló y se sometió de nuevo a centrifugación en las mismas condiciones. Al sobrenadante recuperado se le añadió un volumen igual de CIA, que después se sacudió y se sometió de nuevo a centrifugación en las mismas condiciones. A 400 µl del sobrenadante recuperado se les añadieron un volumen igual de alcohol isopropílico y 1/10 partes de volumen de acetato de sodio 3M, que se mezcló mediante inversión y a continuación se sometió a centrifugación a 15.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El resultante se sometió a la eliminación del sobrenadante, a lo que se añadieron 500 µl de etanol del 75% antes de mezclar mediante inversión, sometiendo a continuación la mezcla a una centrifugación a 15.000 rpm durante 2 minutos a 4°C. Después de eliminar el sobrenadante y secar con aire el interior del tubo, el precipitado se disolvió en 50 µl de agua sin ARNasa para elaborar un extracto de ARN total. Se realizó una RT-PCR cuantitativa utilizando QIAGEN One-Step RT-PCR Kit (QIAGEN). La composición de la solución de reacción (volumen total: 25 µl) fue: 2 µl de la solución de ARN total (equivalente a 2×10⁵ CFU); y 1 × Tampón QIAGEN One-Step RT-PCR, Mezcla de dNTP 0,5 mM, un volumen de 1/25 veces de Mezcla Enzimática QIAGEN One-Step RT-PCR, un volumen de 1/100.000 veces de SYBR(R) Green I (de Molecular Probes) y cebadores 0,75 µM (de cada) (descritos en la Tabla 1) que se ajustaron de manera que las cantidades respectivas formen concentraciones finales. Se utilizó ARN equivalente a 2×10⁵ UFC como molde en la RT-PCR. La solución de reacción se sometió en primer lugar a una reacción de transcripción inversa a 50°C durante 30 minutos, y a continuación se calentó a 95°C durante 15 minutos para inactivar la transcriptasa inversa. Con posterioridad, se realizaron de 40 a 45 ciclos de 94°C durante 20 segundos, 55°C o 60°C durante 20 segundos y 72°C durante 50 segundos para medir la cantidad de un producto de amplificación como una intensidad de fluorescencia de SYBR(R) Green I para cada ciclo. Esta serie de reacciones se realizaron utilizando el sistema ABI PRISM(R) 7900HT (de Applied Biosystems).

35 Como resultado, como se muestra en la Tabla 2, se demostró que solo se puede detectar específicamente un género o cepa de bacteria de interés mediante el cebador En-lsu 3F/3R (Enterobacteriaceae), g-Staph-F/R (el género *Staphylococcus*), PSD7F/R (el género *Pseudomonas*), s-Ciper-F/CIPER-R (*Clostridium perfringens*), S-S-Bc-200-a-S-18/Bc2R (*Bacillus cereus*) o g-Encoc F/R (el género *Enterococcus*). Además, como se expone en la Tabla 3, se demostró que solo se puede detectar específicamente un subgrupo o cepa de interés mediante el cebador sg-Laci-F/R (subgrupo de *Lactobacillus acidophilus*), sg-Lsak-F/R (subgrupo de *Lactobacillus sakei*), sg-Lcas-F/R (subgrupo de *Lactobacillus casei*), sg-Lrum-F/R (subgrupo de *Lactobacillus ruminis*), sg-Lreu-F/R (subgrupo de *Lactobacillus reuteri*), sg-Lpla-F/R (subgrupo de *Lactobacillus plantarum*), s-Lbre-F/R (*Lactobacillus brevis*), s-Lfru-F/R (*Lactobacillus fructivorans*) o LFer-1/2 (*Lactobacillus fermentum*). En las Tablas 2 y 3, + indica que se pudo lograr la detección específica (valor C_T: 1 a 30); - indica que el valor C_T fue 31 o mayor o que no se obtuvo producto de amplificación.

45

ES 2 428 146 T3

[Tabla 2-1]

Diana	Reacciones con los siguientes cebadores					
	En-Isu 3F/3'R	g-Encoc- F/R	g-Staph- F/R	s-CIper- F/CIPER-R	S-S-Bc-200-a-S- 18/BC2R	PSD7F/R
<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter koseri</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter sakazakii</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter amnigenus</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Proteus penneri</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Hafnia alvei</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Edwardsiella tarda</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Providencia alcalifaciens</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Providencia rettgerii</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Morganella morganii</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Salmonella choleraesuis</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	-	-	-	+
<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	-	-	-	+
<i>Acinatebacter calcoaceticus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Bacteroides ovatus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Bacteroides vulgatus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Prevotella melaninogenica</i>	-	-	-	-	-	-

[Tabla 2-2]

Diana	Reacciones con los siguientes cebadores					
	En-Isu 3F/3'R	g-Encoc- F/R	g-Staph- F/R	s-CIper- F/CIPER-R	S-S-Bc-200-a-S- 18/BC2R	PSD7F/R
<i>Collinsella aerofaciens</i>	-	-	-	-	-	-

ES 2 428 146 T3

Diana	Reacciones con los siguientes cebadores					
	En-Isu 3F/3'R	g-Encoc- F/R	g-Staph- F/R	s-Ciper- F/CIPER-R	S-S-Bc-200-a-S- 18/BC2R	PSD7F/R
Eggerthella lenta	-	-	-		-	-
Bifidobacterium catenulatum	-	-	-	-	-	-
Bifidobacterium longum	-	-	-	-	-	-
Ruminococcus productus	-	-	-	-	-	-
Ruminococcus obeum	-	-	-	-	-	-
Clostridium orbiscindens	-	-	-	-	-	-
Clostridium perfringens	-	-	-	+	-	-
Streptococcus intermedius	-	-	-	-	-	-
Streptococcus bovis	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus aureus	-	-	+	-	-	-
Staphylococcus epidermidis	-	-	+	-	-	-
Staphylococcus haemolyticus	-	-	+	-	-	-
Staphylococcus lugdunensis	-	-	+	-	-	-
Staphylococcus saprophyticus	-	-	+	-	-	-
Staphylococcus schleiferi ss. coagulans	-	-	+	-	-	-
Bacillus cereus	-	-	-	-	+	-
Bacillus subtilis	-	-	-	-	-	-
Enterococcus faecalis	-	+	-	-	-	-
Enterococcus faecium	-	+	-	-	-	-
Enterococcus hirae	-	+	-	-	-	-
Enterococcus gallinarum	-	+	-	-	-	-
Enterococcus flavescens	-	+	-	-	-	-
Enterococcus durans	-	+	-	-	-	-
Lactobacillus acidophilus	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus casei	-	-	-	-	-	-
Campylobacter jejuni	-	-	-	-	-	-
Candida albicans	-	-	-	-	-	-

[Tabla 3-1]

Diana	Reacciones con los siguientes cebadores								
	sg-Laci- F/R	sg-Lsak- F/R	sg-Lcas- F/R	sg-Lrum- F/R	sg-Lreu- F/R	sg-Lpla- F/R	s-Lbre- F/R	s-Lfru- F/R	Lfer- 1/2
Lactobacillus acidophilus	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus gasseri	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus crispatus	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus jensenii	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus helveticus	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus johnsonii	+	-	-	-	-	-	-	-	-

ES 2 428 146 T3

Diana	Reacciones con los siguientes cebadores								
	sg-Laci-F/R	sg-Lsak-F/R	sg-Lcas-F/R	sg-Lrum-F/R	sg-Lreu-F/R	sg-Lpla-F/R	s-Lbre-F/R	s-Lfru-F/R	Lfer-1/2
Lactobacillus delburueckii ss. delburueckii	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus delburueckii ss. lactis	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus delburueckii ss. bulgaricus	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus amylovorus	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus gallinarum	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus intestinalis	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus hamsteri	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus sakei	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus curvatus	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus vitulinus	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus graminis	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus casei	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus rhamnosus	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus zeae	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus ruminis	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Lactobacillus murinus	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Lactobacillus salivarius ss. salivarius	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Lactobacillus salivarius ss. salicinius	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Lactobacillus animalis	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Lactobacillus mali	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Lactobacillus reuteri	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Lactobacillus vaginalis	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Lactobacillus oris	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Lactobacillus panis	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Lactobacillus plantarum	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Lactobacillus pentosus	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Lactobacillus brevis	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Lactobacillus fructivorans	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus fermentum	-	-	-	-	-	-	-	-	+

[Tabla 3-2]

Diana	Reacciones con los siguientes cebadores								
	sg-Laci-F/R	sg-Lsak-F/R	sg-Lcas-F/R	sg-Lrum-F/R	sg-Lreu-F/R	sg-Lpla-F/R	s-Lbre-F/R	s-Lfru-F/R	Lfer-1/2
Escherichia coli	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Diana	Reacciones con los siguientes cebadores								
	sg-Laci-F/R	sg-Lsak-F/R	sg-Lcas-F/R	sg-Lrum-F/R	sg-Lreu-F/R	sg-Lpla-F/R	s-Lbre-F/R	s-Lfru-F/R	Lfer-1/2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acinatebacter calcoaceticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacteroides ovatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacteroides vulgatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Prevotella melaninogenica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Collinsella aerofaciens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Eggerthella lenta</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium longum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ruminococcus productus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ruminococcus obeum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium orbiscindens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus intermedius</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus bovis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis lactis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ejemplo 3: Examen de una relación entre el estado de crecimiento de diversos microorganismos y la cantidad de transcripción de ARNr

- 5 Utilizando células de *Escherichia coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* de diferentes fases de cultivo, se examinó una relación entre el número de células bacterianas vivas medido usando un método de cultivo y el número de células bacterianas que tienen la capacidad de formar colonias, derivada de la cantidad de transcripción de ARNr medida mediante un método de RT-PCR cuantitativa. Específicamente, después del comienzo del cultivo aeróbico de cada bacteria con sacudimiento a 37°C en medio BHI, los cultivos bacterianos se recogieron a lo largo del tiempo, seguido del uso de los cultivos para medir el número de células bacterianas mediante un método de cultivo que emplea un medio de agar BHI (37°C, 24 horas). Por otro lado, se extrajo ARN a partir de muestras recogidas de manera similar

10

y se sometió a análisis cuantitativo de RT-PCR. El número de células bacterianas en cada muestra se calculó sobre la base de la curva patrón preparada en la forma descrita en el Ejemplo 4, usando el ARN extraído de una cepa bacteriana en la fase de crecimiento logarítmico tardío, cuyo número de células se conoce. A este respecto, la extracción de RNA total y la RT-PCR cuantitativa se realizaron como se describe en el Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la Figura 1. En la Figura 1, el círculo negro (*) indica el número de células bacterianas calculado a partir de la cantidad de la transcripción de ARNr, y el círculo blanco (□), el número de células bacterianas determinadas mediante el método de cultivo. Para todas las cepas bacterianas sometidas a análisis, desde la fase logarítmica de crecimiento a la fase de muerte, se observó una fuerte relación entre las curvas de variación del número de células bacterianas vivas determinada mediante el método de cultivo en la solución bacteriana y el número de células bacterianas calculadas a partir de la cantidad de transcripción de ARNr. Esto demostró que el número de células de un microorganismo vivo se pudo determinar en cualquier condición mediante la medición de la cantidad de la transcripción de ARNr.

Ejemplo 4: Preparación de las curvas de calibración y comparación con un método de PCR cuantitativa

Las curvas patrón se prepararon mediante el método de la presente invención (método de RT-PCR cuantitativa) utilizando células cultivadas, en la fase tardía de crecimiento logarítmico, de *P. aeruginosa* YIT6108^T (cepa tipo) y *S. aureus* YIT6075^T (cepa tipo). Las curvas de calibración también se prepararon mediante un método de PCR cuantitativa para comparar con las preparadas mediante el método de la presente invención. Células axénicas de cada cepa cultivadas en medio BHI se separaron con el fin de proporcionar un número de células de 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 y 10^0 , y se sometieron a extracción del ARN como se ha descrito en el Ejemplo 2. Los extractos se sometieron cada uno a RT-PCR cuantitativa de acuerdo con el Ejemplo 2 usando los cebadores como se describe en la Tabla 1. Se examinó una correlación entre el valor C_T resultante y el número de células determinado mediante el método de cultivo descrito en el Ejemplo 3. Utilizando un método descrito a continuación, los ADN obtenidos a partir de las mismas muestras también se examinaron cada uno para su cuantificación mediante un método de PCR, empleando ADNr como una secuencia diana. Específicamente, se añadió 1 mL de PBS a cada una de las soluciones bacterianas separadas con el fin de proporcionar un número de células de 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 y 10^0 , que se agitó y después se centrifugó a 15.000 rpm durante 5 minutos a 4°C, seguido de la eliminación del sobrenadante. Se repitió dos veces una operación en la que se añadió 1 ml de PBS al precipitado, que después se agitó y se centrifugó antes de retirar el sobrenadante. Al sedimento resultante se le añadieron 300 µl de tampón bacteriolítico (Tris-HCl 100 mM, EDTA 40 mM, SDS al 1%, pH: 9,0), 500 µl de fenol saturado con TE, y 300 mg de cuentas de vidrio (0,1 mm de diámetro), que luego se agitó vigorosamente en el FastPrep FP120 a 5.000 rpm durante 30 segundos para triturar las células bacterianas. La solución de trituración se centrifugó en condiciones de 15.000 rpm, 4°C y 5 minutos, seguido de la recuperación del sobrenadante. El fenol (saturado con TE)/cloroformo/alcohol isoamílico se añadió al sobrenadante, que se agitó vigorosamente en el FastPrep FP120 a 4000 rpm durante 45 segundos y después se sometió a una operación de centrifugación en condiciones de 15.000 rpm, 4°C y 5 minutos. La precipitación con alcohol se realizó usando el sobrenadante separado y recuperado, seguido de la disolución del precipitado en 50 µl de tampón TE para preparar una solución de ADN. Posteriormente, se llevó a cabo una PCR utilizando la solución de ADN resultante como molde. La PCR se realizó en un total de 25 µl de una solución de reacción que contenía 2 µl de la solución de ADN y Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 2,5 mM, Triton X-100 al 0,45%, mezcla de dNTP 200 µM, un volumen de 1/100.000 veces de SYBR (R) Green I, 11 ng/µl de anticuerpo TaqStart (R) (de Clontech), 0,05 U/µl de ADN polimerasa Taq (de Takara) y cebadores 0,25 µM (de cada uno) (PSD7F/R o g-Staph-F/R) como concentraciones finales. La solución de reacción se calentó a 94°C durante 5 minutos, después se sometió a 40 ciclos de 94°C durante 20 segundos, 60°C durante 20 segundos y 72°C durante 50 segundos, y posteriormente se hizo reaccionar a 72°C durante 10 minutos. La cantidad del producto de amplificación se midió para cada ciclo como una intensidad de fluorescencia de SYBR (R) Green I. Esta serie de reacciones se llevaron a cabo usando ABI PRISM (R) 7900HT. A este respecto, se sometió a la reacción 1/25 de la cantidad de extracción de cada uno de ARN y ADN.

Como resultado, como se muestra en la Figura 2, ambos métodos mostraron una muy buena correlación entre el número logarítmico de las células bacterianas y el valor C_T . En la Figura 2, el valor C_T se representa en función del número de células/extracto medido mediante el método de cultivo para cada cepa bacteriana que sirve como muestra. El círculo negro (*) indica el caso de la RT-PCR cuantitativa, y el círculo blanco (□), el caso de la PCR cuantitativa. En la curva aproximada obtenida a través del método de RT-PCR cuantitativa, el coeficiente de correlación (valor de R^2) fue de 0,9955 para *P. aeruginosa* y 0,9961 para *S. aureus*. Esto demostró que las curvas patrón permiten el cálculo del número de células bacterianas a partir de los valores C_T . Además, el método de RT-PCR cuantitativa fue capaz de detectar 10^0 células bacterianas en las muestras, lo que indica que el método tiene una sensibilidad de detección comparable con un método de cultivo utilizado convencionalmente. Esto demostró que el método podría ser utilizado para la cuantificación o la detección de un microorganismo como una alternativa al método de cultivo. El método de la presente invención tenía una sensibilidad de detección aproximadamente 1000 veces mayor que la del método de PCR que utiliza ADNr como una secuencia diana, lo que demuestra que tenía una sensibilidad de detección marcada en comparación con un medio previamente estudiado para la cuantificación de un microorganismo utilizando un método de amplificación de genes.

Ejemplo 5: Detección cuantitativa de una bacteria en las heces

Varias concentraciones de *P. aeruginosa* fueron añadidas cada una a heces humanas para comparar el intervalo de detección de un método de PCR cuantitativa con el del método de la presente invención. Se prepararon las muestras fecales a las que se había añadido *P. aeruginosa* en cada una de las cuales se añadieron células de *P. aeruginosa* equivalentes 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 o 10^9 células por 20 mg de heces humanas. El ARN total se extrajo a partir de cada una de las muestras fecales a las que se había añadido *P. aeruginosa* y se utilizó como molde para llevar a cabo la RT-PCR cuantitativa de la presente invención. También se extrajo ADN de cada una de las mismas muestras y se utilizó como molde para llevar a cabo la PCR cuantitativa. Además, las mismas muestras se someten a la medición del número de células bacterianas utilizando un método de cultivo. La extracción del ARN total y el método de RT-PCR cuantitativa se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 2; el método de cultivo, como en el Ejemplo 3; y la extracción de ADN y el método de PCR cuantitativa, como en el Ejemplo 4. A este respecto, 1/2500 las cantidades del ARN total y el ADN total obtenidos se sometieron a la RT-PCR cuantitativa y la PCR cuantitativa, respectivamente.

Como resultado, como se muestra en la Figura 3, el método de la presente invención mostró linealidad en una curva aproximada obtenida a partir de mediciones en el intervalo de $10^{2,9}$ a 10^{10} células/g de heces en las muestras fecales a las que se había añadido *P. aeruginosa*. En la Figura 3, el valor C_T se representa en función del número de células/g de heces medido mediante el método de cultivo para los *P. aeruginosa* que sirve como muestra. El círculo negro (*) indica el caso de la RT-PCR cuantitativa, y el círculo blanco (\square), el caso de la PCR cuantitativa. En las heces humanas, el límite cuantitativo del método de la presente invención era $10^{2,9}$ o más células/g de heces, y fue casi comparable al del método de cultivo, que era 10^2 o más células/g de heces. El método de cultivo llevó un día, mientras que el método de la presente invención se completó desde la estabilización de ARN de la muestra para la cuantificación en aproximadamente 6 horas. Por otro lado, en el análisis mediante el método de PCR cuantitativa, se observó linealidad en una curva aproximada obtenida a partir de mediciones en el intervalo de $10^{5,8}$ a 10^{10} células/g de heces, y el límite de detección fue de alrededor de 1.000 veces menor que la del método de RT-PCR cuantitativa.

Ejemplo 6: Análisis de enterobacterias fecales humanas mediante RT-PCR cuantitativa y un método de cultivo

Se analizó flora fecal humana mediante una RT-PCR cuantitativa utilizando los cebadores específicos de enterobacterias En-lsu 3F/3'R. Las heces excretadas frescas se obtuvieron de 38 adultos y diluyeron 1/10 en condiciones anaerobias con un medio de transporte (glicerina al 10%, cisteína al 5%, polvo Lab Lemco al 1%, NaCl al 0,045%, KH_2PO_4 al 0,0225%, K_2HPO_4 al 0,0225%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 0,0225%, CaCl_2 al 0,00225%, MgSO_4 al 0,00225%). Se tomó una alícuota de 200 μl (20 mg en forma de heces) del diluyente y se sometió a la extracción de ARN total usando un método de RT-PCR cuantitativa. La RT-PCR cuantitativa se llevó a cabo utilizando 1/2.500 la cantidad del ARN total como molde. Una alícuota del mismo diluyente también se sometió a la cuantificación de UFC mediante un método de cultivo (medio de selección DHL). La estabilización de ARN, la extracción de los ARN total, y la RT-PCR cuantitativa fueron de acuerdo con el Ejemplo 2, y el método de cultivo fue de acuerdo con un método convencional. El ARN total extraído de *E. coli* YIT 6044^T (cepa tipo) se utilizó para preparar una curva patrón para calcular el número de células bacterianas mediante la RT-PCR cuantitativa.

Como resultado, como se muestra en la Figura 4, se demostró que el método de RT-PCR cuantitativa eligiendo como diana ARNr de acuerdo con la presente invención y el método de cultivo mostraron una correlación muy fuerte (coeficiente de correlación: 0,9255). En la Figura 4, el eje de ordenadas representa los resultados de la cuantificación mediante el método de cultivo, y la abscisa representa los resultados de la cuantificación mediante el método de la presente invención. Para el método de cultivo, se consumieron 2 días para llevar a cabo todas las operaciones, mientras que para el método de la presente invención, todas las operaciones se completaron en aproximadamente 6 horas.

Ejemplo 7: Análisis de los microorganismos en la leche de vaca

Varias concentraciones de *E. coli*, *S. aureus*, y *B. cereus* se añadieron cada una a leche de vaca comercial para comparar el valor cuantitativo de un método de cultivo de vertido en placa con el del método de la presente invención. Se añadieron a la leche de vaca comercial *E. coli* o *S. aureus* con el fin de proporcionar un número de microbios de 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , y 10^6 por ml para elaborar las muestras. De cada muestra, 1 ml se sometió a la extracción de ARN total, y 1 ml al método de cultivo de vertido en placa (*E. coli*: medio de agar desoxicolato, *S. aureus* y *B. cereus*: medio convencional de agar, 37°C, 20 \pm 2 horas). El ARN total extraído se analizó mediante un método de RT-PCR cuantitativa usando los cebadores descritos en la Tabla 1 para determinar una correlación entre el valor C_T resultante y el número de células microbianas obtenidas mediante el método de cultivo de vertido en placa. A este respecto, la extracción del ARN total y el método de RT-PCR cuantitativa se realizaron mediante el método descrito en el Ejemplo 2; 1/25 de la cantidad del ARN total extraído se sometió a RT-PCR cuantitativa.

Como resultado, como se muestra en la Figura 5, el valor C_T se correlaciona con el número de células microbianas en el intervalo de 10^0 a 10^6 células por ml de leche para cualquiera de las cepas. En la Figura 5, el valor C_T se representa en función del número de células/ml de leche medido mediante el método de cultivo de vertido en placa para cuantificar *E. coli* (parte superior izquierda de la Figura 5), *S. aureus* (parte superior derecha de la Figura 5) y *B. cereus* (parte inferior izquierda de la Figura 5) que sirve como muestra. El límite cuantitativo del método de la presente invención fue 10^0 células o más/ml de leche y era comparable al del método de cultivo de vertido en placa. Esto demostró que el método de la presente invención puede proporcionar una alternativa a un método de cultivo de

vertido en placa utilizando el medio de cultivo oficial (medio de agar desoxicolato o medio de agar convencional) como se describe en la ordenanza Ministerial relativa a norma de composición, etc. para la leche y los productos lácteos. Además, el método de cultivo en placa de vertido llevó un día, mientras que el método de la presente invención se completó desde la estabilización de ARN de la muestra a la cuantificación en aproximadamente 6 horas.

Ejemplo 8: Examen de las bacterias en la sangre

Varias concentraciones de *S. aureus* o *P. aeruginosa* se añadieron cada una a sangre humana para comparar el valor cuantitativo de un método de cultivo de vertido en placa (método de cultivo de sangre) con el del método de la presente invención. Se añadieron *S. aureus* o *P. aeruginosa*, con el fin de proporcionar un número de bacterias de 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , y 10^5 por mL, a la sangre humana a la que se añadió un volumen de 1/10 de una solución de citrato de sodio al 3,8% como anticoagulante para elaborar las muestras. De cada muestra, 0,5 mL se sometieron a la extracción del ARN total, y 0,5 ml para el método de cultivo de vertido en placa (medio de agar BHI). El ARN total extraído se analizó mediante un método de RT-PCR cuantitativa para determinar una correlación entre el valor C_T resultante y el número de células bacterianas obtenidas mediante el método de cultivo de vertido en placa. La extracción del ARN total y el método de RT-PCR cuantitativa se realizaron mediante el método descrito en el Ejemplo 2. A este respecto, 1/25 de la cantidad del ARN total extraído se sometió a la RT-PCR cuantitativa.

Como resultado, como se muestra en la Figura 6, el número de células bacterianas se correlacionó con el valor C_T en el intervalo de 10^0 a 10^5 células/0,5 mL para cada una de las cepas. En la Figura 6, el valor C_T se representa en función del número de células/0,5 mL de sangre medido mediante el método de cultivo de vertido en placa para cuantificar *P. aeruginosa* (a la izquierda de la Figura 6) o *S. aureus* (a la derecha de la Figura 6) que sirve como muestra. El límite cuantitativo del método de la presente invención fue 10^0 células o más/0,5 ml de sangre y fue comparable con el del método de cultivo de vertido en placa. Esto demostró que el método de la presente invención podría proporcionar una alternativa al método de cultivo de vertido en placa. Además, el método de cultivo de vertido en placa llevó un día, mientras que el método de la presente invención se completó desde la estabilización de ARN de la muestra a la cuantificación en aproximadamente 6 horas.

Ejemplo 9: Análisis de *E. coli* en un producto de leche fermentada

Se añadió *E. coli* a Yakult comercial (de Yakult Honsha Co., Ltd.) con el fin de proporcionar un número de bacterias de 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 y 10^5 por ml para elaborar las muestras. De cada muestra, 1 ml se sometió a la extracción de ARN total, y 1 ml a un método de cultivo de vertido en placa utilizando un medio de agar desoxicolato (37°C , 20 ± 2 horas). El ARN total extraído se analizó mediante un método de RT-PCR cuantitativa usando los cebadores específicos de enterobacterias En-LSU 3F/3'R para examinar una correlación entre el valor C_T resultante y el número de células microbianas obtenidas mediante el método de cultivo de vertido en placa. La extracción del ARN total se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 2 excepto para la trituración de las células bacterianas mediante la adición de cuentas de vidrio y el método de RT-PCR cuantitativa se realizó como se describe en el Ejemplo 2. A este respecto, 1/25 de la cantidad del ARN total extraído se sometió a la RT-PCR cuantitativa.

Como resultado, como se muestra en la Figura 7, el valor C_T se correlacionó fuertemente con el número de células microbianas en el intervalo de 10^0 a 10^5 células por ml. En la Figura 7, el valor C_T se representa en función del número de \log_{10} células/ml de Yakult medido mediante el método de cultivo de vertido en placa para cuantificar *E. coli* que sirve como muestra. El límite cuantitativo del método de la presente invención fue de 10^0 células o más/ml de Yakult y era comparable al del método de cultivo de vertido en placa. Esto demostró que el método de la presente invención podría proporcionar una alternativa a un método de cultivo de vertido en placa utilizando el medio de cultivo oficial (medio de agar desoxicolato) como se describe en la ordenanza Ministerial relativa a norma de composición, etc. para la leche y los productos lácteos. Además, el método de cultivo de vertido en placa llevó un día, mientras que el método de la presente invención se completó desde la estabilización de ARN de la muestra a la cuantificación en aproximadamente 6 horas.

Ejemplo 10: Análisis de lactobacilos y enterococos en las heces humanas mediante RT-PCR cuantitativa y un método de cultivo

El número de células bacterianas de los géneros *Lactobacillus* y *Enterococcus* en las heces humanas se comparó mediante un método de RT-PCR cuantitativa utilizando cebadores como se describe en la Tabla 1 y mediante un método de cultivo. Se obtuvieron heces recién excretadas de 48 adultos sanos, tratados utilizando el método descrito en el Ejemplo 6, y se sometieron a la estabilización del ARN, la extracción del ARN total y la RT-PCR cuantitativa mediante los métodos descritos en el Ejemplo 2. A este respecto, de 1/2.000 a 1/200.000 de la cantidad del RNA total obtenido se sometió a la RT-PCR cuantitativa. Una alícuota del mismo diluyente fecal también se sometió a la cuantificación de UFC mediante un método de cultivo (del género *Lactobacillus*: medio LBS, del género *Enterococcus*: medio COBA, 37°C durante 48 horas en ambos casos). El método de cultivo fue de acuerdo con un método convencional; las colonias que aparecen se sometieron a la identificación de especies bacterianas mediante una prueba de propiedades bioquímica (tinción de Gram, prueba de catalasa, API Strep). El número de células de bacterias del género *Lactobacillus* mediante el método de RT-PCR cuantitativa se calculó mediante la combinación

del número de células de bacterias obtenidas mediante métodos de RT-PCR cuantitativa utilizando los cebadores sg-Laci-F/R (subgrupo de *Lactobacillus acidophilus*), sg-Lsak-F/R (subgrupo de *Lactobacillus sakei*), sg-ACV-F/R (subgrupo de *Lactobacillus casei*), sg-Lrum-F/R (subgrupo de *Lactobacillus Ruminis*), sg-Lreu-F/R (subgrupo de *Lactobacillus reuteri*), sg-LPLA-F/R (subgrupo de *Lactobacillus plantarum*), s-LBRE-F/R (*Lactobacillus brevis*), s-Lfru-F/R (*Lactobacillus fructivorans*) y LFer-media (*Lactobacillus fermentum*).

Como resultado, como se muestra en la Tabla 4, el número de células de bacterias del género *Lactobacillus* y del género *Enterococcus* en las heces humanas fue casi comparable entre el método de la presente invención y el método de cultivo. En contraste, la frecuencia de detección fue alta para ambos géneros en el método de la presente invención en comparación con el método de cultivo. Esto parece ser debido a las siguientes razones: (a) estaban presentes bacterias que pertenecían al género *Lactobacillus* o *Enterococcus* elegidos ahora como diana, pero no pudieron crecer debido a que el medio de selección tuvo una selectividad más fuerte de la necesaria, o (b) la selectividad débil de los medios de selección utilizados llevó al crecimiento, en los medios, de los géneros bacterianos presentes abundantemente distintos de la diana, lo que no permitía la detección de los géneros bacterianos elegidos como diana. Los resultados anteriormente descritos sugirieron que el método de la presente invención no sólo permite que se obtenga un número de células de bacterias comparable al de un método de cultivo, sino también puede detectar o cuantificar las bacterias que no han sido previamente susceptibles de ser detectadas por el método de cultivo. Además, para el método de cultivo, éste consumió 7 días para llevar a cabo todas las operaciones incluyendo la identificación de especies bacterianas, mientras que para el método de la presente invención, todas las operaciones se completaron en aproximadamente 20 horas.

[Tabla 4]

Género	Método de RT-PCR cuantitativa		Método de Cultivo	
	log ₁₀ células/g•heces	Frecuencia (%)	log ₁₀ UFC/g•heces	Frecuencia (%)
<i>Lactobacillus</i>	5,2 ± 1,2	44/46 (96)	5,5 ± 1,4	37/46 (80)
<i>Enterococcus</i>	6,2 ± 1,0	46/46 (100)	6,2 ± 1,9	23/46 (50)

Lista de secuencias

25 <110> KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA
 <120> Método para analizar cuantitativamente microorganismos eligiendo como diana ARNr
 <130> YK0035
 <150> JP 2005-023448 <151> 2005.01.31
 <160> 30
 30 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> secuencia del cebador específico de *B. cereus* (S-S-Bc-200-a-S-18)
 <400> 1
 tcgaaattga aaggcggc18
 <210> 2
 40 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia del cebador específico de *B. cereus* (Bc2R)
 45 <400> 2
 ccagcttatt caactagcac tt 22
 <210> 3
 <211> 18
 <212> ADN
 50 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia del cebador específico de *C. perfringens* (s-CIper-F)
 gggggttca acacctcc 18
 <210> 4
 55 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>

ES 2 428 146 T3

<223> secuencia del cebador específico de *C. perfringens* (CIPER-R)
<400> 4
gcaagggatg tcaagtgt 18
<210> 5
5 <211> 23
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> secuencia del cebador específico de Enterobacteriaceae (En-Isu 3F)
10 <400> 5
tgccgtaact tcgggagaag gca 23
<210> 6
<211> 22
<212> ADN
15 <213> Artificial
<220>
<223> secuencia del cebador específico de Enterobacteriaceae (En-Isu 3'R)
<400> 6
20 tcaaggacca gtgttcagtg tc 22
<210> 7
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
25 <223> secuencia del cebador específico de Staphylococcus (g-Staph-F)
<400> 7
tttgggctac acacgtgcta caatggacaa 30
<210> 8
<211> 24
30 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> secuencia del cebador específico de Staphylococcus (g-Staph-R)
<400> 8
35 aacaacttta tgggatttgc wtga 24
<210> 9
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial
40 <220>
<223> secuencia del cebador específico de Pseudomonas (PSD7F)
<400> 9
caaaactact gagctagagt acg 23
<210> 10
45 <211> 25
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
50 <223> secuencia del cebador específico de Pseudomonas (PSD7R)
<400> 10
taagatctca aggatcccaa cggct 25
<210> 11
<211> 20
<212> ADN
55 <213> Artificial
<220>
<223> secuencia del cebador específico de Enterococcus (g-Encoc-F)
<400> 11
60 atcagagggg gataaacactt 20
<210> 12
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial
<220>

ES 2 428 146 T3

<223> secuencia del cebador específico de Enterococcus(g-Encoc-R)
<400> 12
actctcatcc ttgtctct c 21
5 <210> 13
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
10 <223> secuencia del cebador específico de subgrupo de Lactobacillus acidophilus (sg-Laci-F)
<400> 13
gatgcatagc cgagtgaga gactgat 27
<210> 14
<211> 25
<212> ADN
15 <213> Artificial
<220>
<223> secuencia del cebador específico de subgrupo de Lactobacillus acidophilus (sg-Laci-R)
<400> 14
20 taaaggccag ttactacctc tatcc 25
<210> 15
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
25 <223> secuencia del cebador específico de subgrupo de Lactobacillus ruminis (sg-Lrum-F)
<400> 15
caccgaatgc ttgcaytca 19
<210> 16
<211> 19
30 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> secuencia del cebador específico de subgrupo de Lactobacillus ruminis (sg-Lrum-R)
<400> 16
35 gccgcgggtc catcaaaa 19
<210> 17
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial
40 <220>
<223> secuencia del cebador específico de subgrupo de Lactobacillus plantarum (sg-Lpla-F)
<400> 17
ctctgtatt gattgtgct tgcatt 25
45 <210> 18
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
50 <223> secuencia del cebador específico de subgrupo de Lactobacillus plantarum (sg-Lpla-R)
<400> 18
gttcgccact cactcaaatg taaa 24
<210> 19
<211> 16
<212> ADN
55 <213> Artificial
<220>
<223> secuencia del cebador específico de subgrupo de Lactobacillus reuteri (sg-Lreu-F)
<400> 19
60 gaacgcaytg gcccaa 16
<210> 20
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial
<220>

ES 2 428 146 T3

5 <223> secuencia del cebador específico de subgrupo de Lactobacillus reuteri (sg-Lreu-R)
<400> 20
tccattgtgg ccgatcagt 19
<210> 21
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial
<220>

10 <223> secuencia del cebador específico de subgrupo de Lactobacillus sakei (sg-Lsak-F)
<400> 21
cataaaacct amcaccgcat gg 22
<210> 22
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial
<220>

15 <223> secuencia del cebador específico de subgrupo de Lactobacillus sakei (sg-Lsak-R)
<400> 22
tcagttacta tcagatacrt tcttctc 27
<210> 23
<211> 17
<212> ADN
<213> Artificial
<220>

20 <223> secuencia del cebador específico de subgrupo de Lactobacillus casei (sg-Lcas-F)
<400> 23
accgatggt tcttggc 17
<210> 24
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
<220>

25 <223> secuencia del cebador específico de subgrupo de Lactobacillus casei (sg-Lcas-R)
<400> 24
ccgacaacag ttactctgcc 20
<210> 25
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial
<220>

30 <223> secuencia del cebador específico de Lactobacillus brevis(s-Lbre-F)
<400> 25
atthgttg aaagtggtc tcgg 24
<210> 26
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial
<220>

35 <223> secuencia del cebador específico de Lactobacillus brevis(s-Lbre-R)
<400> 26
accctgaac agttactctc aaagg 25
<210> 27
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial
<220>

40 <223> secuencia del cebador específico de Lactobacillus fructivorans(s-Lfru-F)
<400> 27
tgccctaata gatagttga 19
<210> 28
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial
<220>

45

50

55

60

ES 2 428 146 T3

<223> secuencia del cebador específico de Lactobacillus fructivoransls-Lfru-R)
<400> 28
gataccgctcg cgacgtgag 19
5 <210> 29
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
10 <223> secuencia del cebador específico de Lactobacillus fermentum(Lfer-1)
<400> 29
cctgattgat tttggcgcgcc aac 23
<210> 30
<211> 26
<212> ADN
15 <213> Artificial
<220>
<223> secuencia del cebador específico de Lactobacillus fermentum(Lfer-2)
<400> 30
20 acgtatgaac agttactctc atacgt 26

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para cuantificar un microorganismo de interés en estado vivo, utilizando como índice una cantidad de ARNr de un microorganismo de interés en un espécimen que se va a someter a ensayo, en donde el método comprende
 medir un producto amplificado mediante una RT-PCR realizada utilizando fragmentos de ácido nucleico capaces de hibridar específicamente con el ARNr del microorganismo de interés y una muestra del espécimen que se va a someter a ensayo.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la medición del producto amplificado comprende identificar el número de ciclos de PCR cuando el producto amplificado alcanza una cierta cantidad.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el método comprende la medición del producto amplificado a lo largo del tiempo.
- 15 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el espécimen que se va a someter a ensayo es un espécimen derivado de heces, un alimento, o un organismo.
- 20 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el ARNr del microorganismo de interés en la muestra del espécimen que se va a someter a ensayo se estabiliza en el microorganismo.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde se cuantifica el número de células del microorganismo de interés.
- 25 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde los fragmentos de ácido nucleico capaces de hibridar específicamente con el ARNr del microorganismo de interés son cada uno un fragmento de ácido nucleico que comprende una secuencia de bases descrita en uno de los SEQ ID NO: 2, 3 y 5 a 28 o una secuencia de bases complementaria a la misma, o un fragmento de ácido nucleico que comprende una secuencia de bases homóloga a la misma y funcionalmente equivalente a la misma.
- 30 8. El uso de un fragmento de ácido nucleico para cuantificar un microorganismo de interés en un estado vivo mediante el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde
 el fragmento de ácido nucleico es un fragmento de ácido nucleico que comprende una secuencia de bases descrita en uno de los SEQ ID NO: 2, 3 y 5 a 28 o una secuencia de bases complementaria a la misma;
 35 el fragmento de ácido nucleico contiene la secuencia de bases representada por uno de los SEQ ID NOS: 2, 3 y 5 a 28 o una secuencia de bases complementaria a la misma, en donde el fragmento tiene una delección, sustitución o adición de una o varias bases,
 el fragmento de ácido nucleico tiene una identidad de secuencia de 90% o más con la secuencia de bases representada por uno de los SEQ ID NOS: 2, 3 y 5 a 28 o una secuencia de bases complementaria a la misma; o
 40 el fragmento de ácido nucleico contiene una secuencia de bases capaz de hibridar en condiciones rigurosas con el ADN que contiene la secuencia de bases representada por uno de los SEQ ID NOS: 2, 3 y 5 a 28 o una secuencia de bases complementaria a la misma.
- 45 9. El uso de un kit para cuantificar un microorganismo de interés en estado vivo mediante el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, comprendiendo dicho kit
 (1) fragmento de ácido nucleico capaz de hibridar específicamente con ARNr de un microorganismo de interés, y/o
 (2) un reactivo utilizado para la extracción de ARN, la estabilización de ARN, y/o una PCR.

Fig. 1

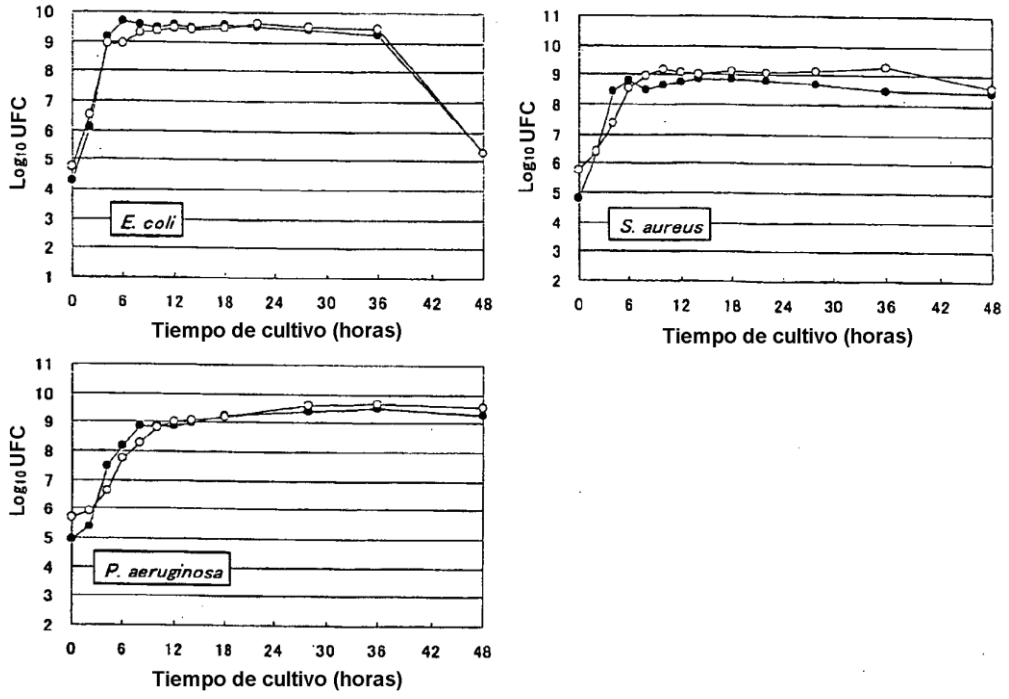


Fig. 2

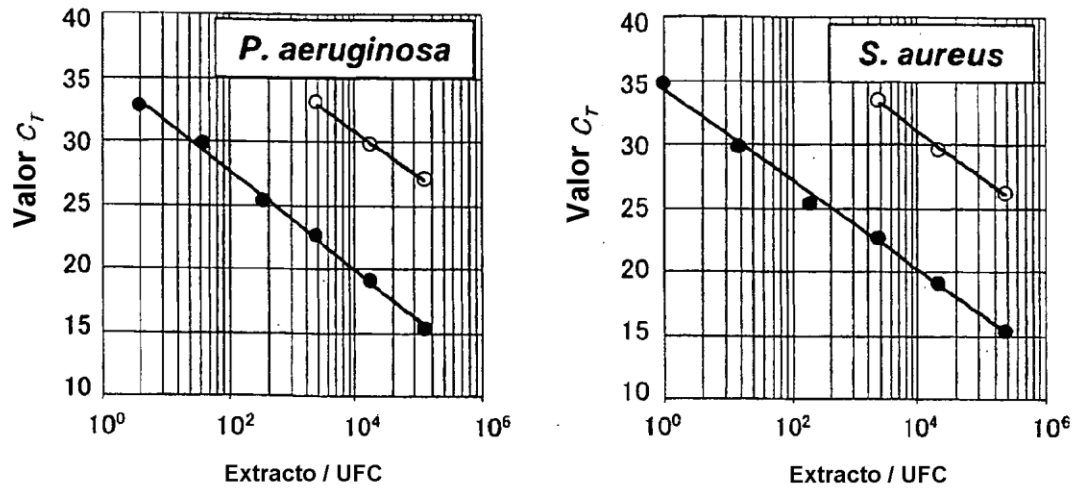


Fig. 3

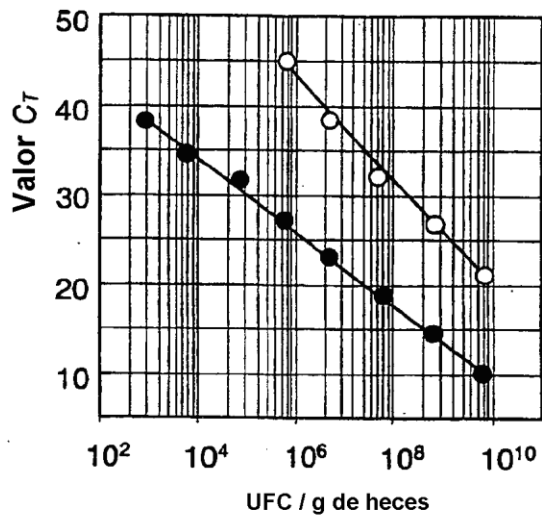


Fig. 4

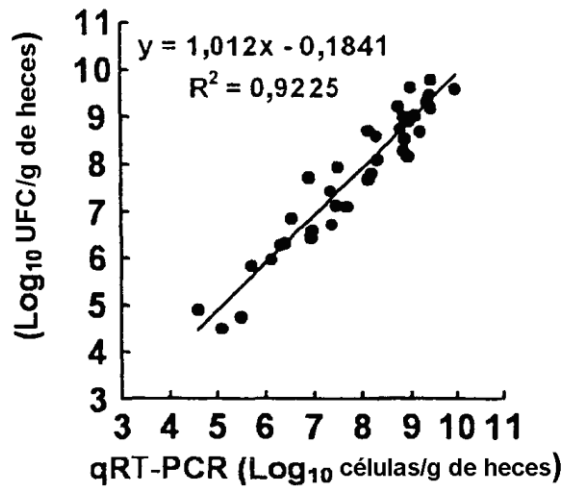


Fig. 5

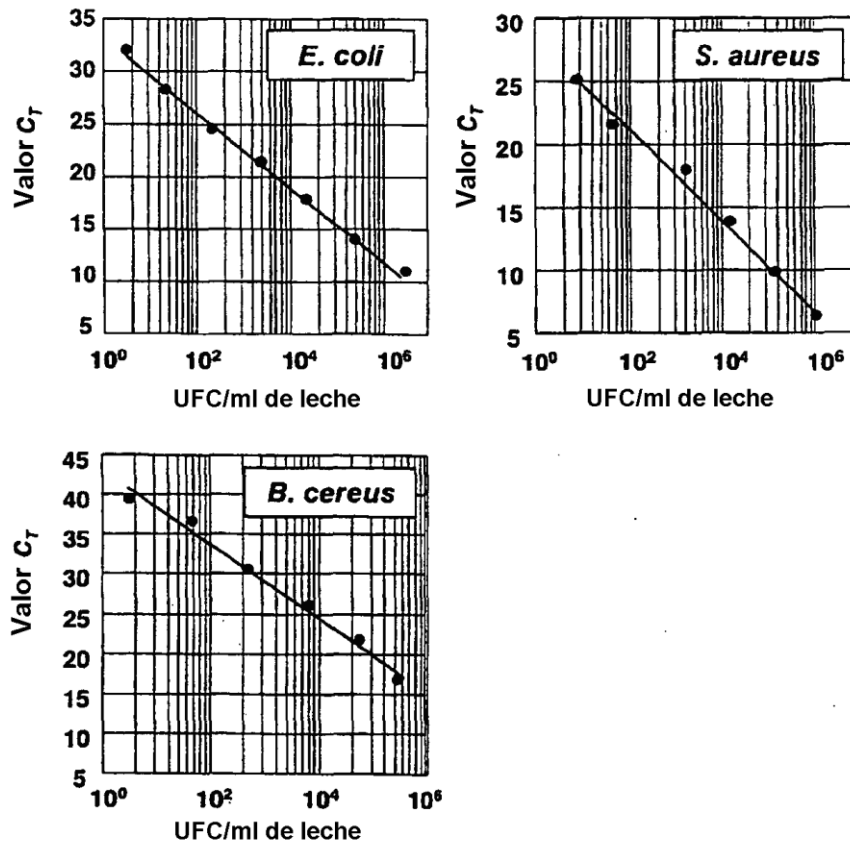


Fig. 6

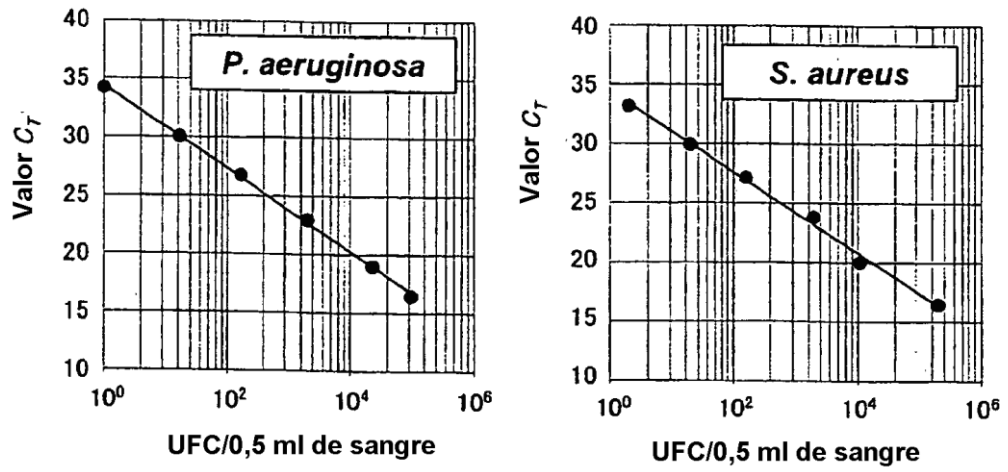


Fig. 7

