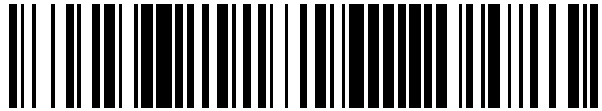


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 227**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2005 E 05749752 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 1761644**

54 Título: **Nuevos métodos y kits relacionados con la detección, la identificación y la cuantificación de levaduras en vino, cerveza y zumos**

30 Prioridad:

21.06.2004 EP 04014518

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

22.01.2014

73 Titular/es:

**ETS LABORATORIES (100.0%)
899 ADAMS STREET, SUITE A
ST. HELENA, CA 94574, US**

72 Inventor/es:

**BRODMANN, PETER D.;
FEHLMANN, MARC.;
GAFNER, JÜRG;
PORRET, NAOMI;
SCHMID, SERGIO;
SEYFARTH, RALF;
SIEVERS, MARTIN;
TERRETTAZ, ANNE y
UERMÖSI, CHRISTINA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 439 227 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

Nuevos métodos y kits relacionados con la detección, la identificación y la cuantificación de levaduras en vino, cerveza y zumos

5 La invención se refiere a nuevos métodos analíticos para detectar e identificar contaminaciones por levaduras, preferiblemente las de muestras de alimentos y bebidas descompuestas. Además, la invención describe nuevos métodos analíticos para detectar e identificar un organismo de levadura deseado que aparece en bebidas alcohólicas y no alcohólicas. La invención también incluye kits de prueba.

10 Los nuevos métodos analíticos de la invención y los kits de prueba detectan cualitativa y cuantitativamente e identifican una contaminación microbiana y microorganismos deseados utilizando secuencias de ADN específicas, que indican gérmenes vivos y muertos en 12 horas. El ADN se amplifica y se cuantifica como tal. Esos métodos, siendo inventivos reemplazarán métodos analíticos convencionales como los métodos de cultivo y de microscopía, GC-MS o las denominadas pruebas de detección rápida, descritas más adelante.

15 Es bien sabido que la fabricación de alimentos y bebidas requiere un control ambiental muy estricto de los alimentos de partida, intermedios y finales, en tanto a su calidad química, física en todos los aspectos microbiológicos. De lo contrario, se pueden presentar carencias sensoriales y podrían causar pérdidas económicas graves.

Técnica anterior

20 La determinación de gérmenes, microorganismos deseados y no deseados, a través de la microscopía tenía lugar después del cultivo en medios adecuados y mediante un recuento microscópico convencional de los gérmenes. El uso de la microscopía permite distinguir entre microorganismos y turbidez (por ejemplo, un agente de curtido), una identificación morfológica del microorganismo y una estimación aproximada de los microorganismos vivos y muertos.

Este método se conoce desde hace mucho tiempo y está muy bien descrito en la bibliografía, pero tiene algunas desventajas tales como la falta de precisión, un alto grado de procedimientos realizados manualmente que son difíciles de automatizar. Además el límite es de hasta 10.000 gérmenes/ml.

25 Un método microbiológico alternativo para la determinación específica de gérmenes se basa en el crecimiento de esos gérmenes en medios específicos y la posterior determinación de los microorganismos a través de microscopía. Los métodos de este tipo están disponibles comercialmente. Sin embargo, la aplicación del método específico tiene sustancialmente las mismas desventajas que el método descrito anteriormente para el recuento total de las células viables. Una desventaja adicional es el largo tiempo de incubación, de al menos 48 horas.

30 Otro método para determinar gérmenes se basa en reacciones bioquímicas después del cultivo en medios adecuados y el recuento total viable de microorganismos deseados y no deseados.

35 Las reacciones bioquímicas (como por ejemplo, la prueba API de Biomerieux) permiten distinguir entre diferentes microorganismos. Este método bien conocido tiene el inconveniente de que es necesaria una gran cantidad de procedimientos realizados manualmente, que son difíciles de automatizar. Además no es posible una identificación clara de un microorganismo en una mezcla de diferentes microorganismos y no se puede utilizar como un ensayo cuantitativo.

Una detección adicional de algunos microorganismos puede tener lugar mediante GC/MS o LC/MS empleando algunos metabolitos secundarios que son sintetizados por microorganismos particulares. Tales metabolitos se pueden detectar usando una separación cromatográfica y una determinación posterior usando, por ejemplo, espectrometría de masas o detección espectrofotométrica.

40 Un ejemplo importante en la industria productora de vino es, por ejemplo, la detección repetitiva de los metabolitos secundarios 4-etilfenol y 4-etil-guayacol, que sirve como un indicador de la presencia de *Dekkera bruxellensis*. Como ya se ha mencionado anteriormente, la detección empleando GC/MS o LC/MS es un método bastante costoso. La detección empleando metabolitos secundarios no se puede asignar a un único microorganismo. Además, la producción de metabolitos secundarios depende mucho de las condiciones ambientales y, por lo tanto, no es realmente adecuada para una determinación cuantitativa.

50 La nueva tecnología de PCR (para uso cualitativo) en si misma se basa en la presencia de ADN. El ADN ya existe en forma de cadenas sencillas o la hélice de ADN se divide en cadenas sencillas. Dos cebadores oligonucleótidos se añaden en exceso. Se fijan sobre una parte específica del ADN no muy separada una de otra y en presencia de un agente iniciador de la polimerización de nucleótidos (polimerasa), el segmento específico definido entre los cebadores, se replica. Cuando se parte de una sola hélice de ADN, es decir, de dos cadenas, después de la polimerización se forman dos nuevas hélices, es decir, cuatro cadenas de composición idéntica. A continuación, se pueden utilizar para que se repliquen en otro ciclo. Si estas etapas se repiten, conducen a un aumento exponencial de la presencia de este segmento específico de ADN.

El método de la PCR cuantitativa es una metodología mejorada basada en la creación de una sonda de

oligonucleótido que se ajusta entre los dos cebadores y se mantiene en el segmento que se va a replicar. Esta metodología se basa en la tecnología TaqMan[®], que se basa en el ensayo de PCR con nucleasa 5', publicado en 1991 por Holland et al., aprovechando la actividad nucleasa 5' de la TaqPolimerasa y la aplicación de sondas marcadas con fluorescencia, específicas de secuencias.

- 5 Estas sondas se marcan en el extremo 5'-terminal con un agente fluorescente (informador) y en el extremo 3'-terminal con un desactivador de la fluorescencia (desactivador).

10 Como el espacio entre ambos está restringido, la fluorescencia emitida por el informador se inactiva mediante el desactivador (o el desactivador oscuro) por lo que no se puede observar fluorescencia. Durante la reacción en cadena inducida por la polimerasa, tanto el informador como el desactivador o el desactivador oscuro, respectivamente, se liberan de sus posiciones y ya no están muy cerca, pero están en solución. En estas circunstancias, se puede registrar una fluorescencia resultante del informador. Cuantas más moléculas informadoras se liberen mayor será la intensidad de la señal fluorescente. La cantidad de señal fluorescente es proporcional a la cantidad de secuencias replicadas. Mediante un análisis de las cinéticas, es decir, el número de ciclos necesario para obtener una cierta señal, se puede calcular el número inicial de copias de esa secuencia.

15 Este método es extremadamente sensible ya que replica las secuencias presentes y por lo tanto intensifica la señal que se va a registrar con cada ciclo. Hay muchas moléculas que muestran fluorescencia en diferentes condiciones, lo que permite diseñar patrones internos que controlan el éxito de cada replicación. Además, es posible someter a ensayo la presencia de diferentes secuencias en paralelo, usando diferentes longitudes de onda para detectar la fluorescencia resultante de cada una.

20 La optimización de las parejas de cebador y la sonda y de las condiciones de reacción variables del método de la PCR, es esencial. La tecnología de la PCR se ejecuta de forma correspondiente a los métodos descritos en los documentos USP 4.683.195, USP 4.683.202 y USP 4.800.159.

25 El documento USP 4.683.195 se dirige a un procedimiento para amplificar y detectar cualquier ácido nucleico diana contenido en un ácido nucleico o una mezcla de los mismos. El procedimiento comprende tratar hebras complementarias distintas de ácido nucleico con un exceso molar de dos cebadores de oligonucleótidos, extender los cebadores para formar productos complementarios de la extensión del cebador que actúan como moldes para sintetizar la secuencia de ácido nucleico deseada, y detectar la secuencia así amplificada. Las etapas de la reacción pueden llevarse a cabo de forma escalonada o simultáneamente y se pueden repetir tantas veces como se desee.

30 El documento USP 4.683.202 se refiere a un procedimiento para amplificar cualquier secuencia de ácido nucleico específica deseada, contenida en el ácido nucleico o una mezcla de las mismas.

El procedimiento comprende tratar hebras complementarias distintas de ácido nucleico con un exceso molar de dos cebadores de oligonucleótidos, y extender los cebadores para formar productos complementarios de extensión del cebador que actúan como moldes para sintetizar la secuencia de ácido nucleico deseada. Las etapas de la reacción pueden llevarse a cabo de forma escalonada o simultáneamente y se pueden repetir tantas veces como se desee.

35 El documento USP 4.800.159 reivindica un procedimiento para amplificar y detectar cualquier secuencia de ácido nucleico diana contenida en un ácido nucleico o en una mezcla de los mismos. El procedimiento comprende tratar hebras complementarias distintas del ácido nucleico con un exceso molar de dos cebadores de oligonucleótidos de la misma forma que se ha descrito anteriormente. Además, una secuencia de ácido nucleico específica se puede clonar en un vector mediante el uso de cebadores para amplificar la secuencia, la cual contiene sitios de restricción no complementarios en sus extremos, y un fragmento de ácido nucleico se puede preparar a partir de un fragmento más corto existente, empleando el proceso de amplificación.

45 El documento USP 5.210.015 que se refiere a las tres patentes de EE.UU. mencionadas anteriormente, se dirige a un procedimiento para detectar un ácido nucleico diana utilizando oligonucleótidos marcados. Este procedimiento utiliza la actividad nucleasa 5' a 3' de una polimerasa de ácido nucleico para escindir un oligonucleótido marcado reasociado de dúplex hibridados y liberar fragmentos oligonucleotídicos marcados para la detección. Esto se puede incorporar fácilmente en un ensayo de amplificación por PCR.

50 G. Zapparoli et al. informan en Letters in Applied Microbiology/1998, 27, 243 - 245 sobre la rápida identificación y detección de *Oenococcus oeni* en vino, conseguida mediante PCR específica. Se diseñaron dos cebadores que flanqueaban una región de 1025 pb del gen de *O. oeni* que codifica la enzima maloláctica. Se obtuvo el ADN amplificado esperado solo cuando se utilizó ADN purificado de *O. oeni*.

La rapidez y la fiabilidad del procedimiento PCR establecido sugieren que el método se puede aplicar de manera rentable en laboratorios de bodegas para el control de calidad. Se ha sugerido que el uso del procedimiento de amplificación con PCR mencionado anteriormente también podría resultar útil para una identificación/detección rápida y fiable de *O. oeni* en laboratorios de bodegas para el control de calidad.

55 G. Bleve et al. publicaron en Applied and Environmental Microbiology, julio, 2003, pág. 4116 - 4122 que ensayos de PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) y de RT-PCR en tiempo real se han utilizado para detectar y cuantificar

- ARNm activo procedente de levadura y mohos. Se diseñaron cebadores universales basándose en secuencias disponibles de actina fúngica, y mediante RT-PCR se amplificó un fragmento específico de 353 pb procedente de especies que participaban en la descomposición de alimentos, por ejemplo, se desarrolló una detección rápida y una cuantificación de levaduras viables y mohos que contaminan yogures y productos alimenticios pasteurizados, mientras que una detección rápida y una cuantificación de bacterias como microorganismo usando ARNm de actina todavía no se han utilizado y no se han descrito.
- 5
- Maria I. Castellanus et al. han descrito en *Current Microbiology* vol. 33 (1996), págs. 100-103 que tres bacterias de ácido láctico seleccionadas previamente como bacterias probióticas para la alimentación de cerdos, se identificaron por secuenciación de la región variable V1 del ADNr 16S, después de una amplificación con PCR cebada en la región constante flanqueante. Una región VR que mostraba fuertes diferencias nucleotídicas entre las tres bacterias probióticas y las cepas de referencia, se delimitó. Los oligonucleótidos específicos de cada cepa fueron diseñados, ya que este método no es realmente adecuado para la diferenciación entre microorganismos vivos y muertos y por lo tanto no es adecuado para la cuantificación.
- 10
- Trevor G. Pfister y David A. Mills publicaron en *Applied and Environmental Microbiology*, diciembre de 2003, págs. 7430 - 7434, un ensayo con PCR en tiempo real para la detección y el registro de la contaminación con la levadura *Dekkera bruxellensis* en el vino, sin usar ni describir ARNm de actina como gen diana, pues es bien conocido que el ARNm de genes ribosómicos tiene un período de vida media largo.
- 15
- Casey, Garrett D. et al. dan a conocer en *International Journal of Food Microbiology* 91, 15 de marzo de 2004, 327 - 335, un método de PCR en tiempo real para la detección y la identificación de descomposición por levaduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, en zumos de frutas basándose en el ADNr 5.8S y la región ITS 2 adyacente de estas levaduras sin usar ni describir el ARNm como gen diana. Además, el método descrito no es realmente adecuado para diferenciar entre microorganismos vivos y muertos, porque como ya se dijo anteriormente, se conoce comúnmente que el ARNm de genes ribosómicos tiene un período de vida media largo.
- 20
- En el documento US-B1 6 248 519, Morenzoni Richard A. et al. describen un método de PCR para detectar e identificar un microorganismo relacionado con la fermentación, tal como *Saccharomyces cerevisiae*, en una muestra de bebida que comprende las etapas de obtener ADN de la muestra y detectar *S. bayanus* o *S. cerevisiae* mediante PCR con cebadores específicos de secuencias ITS de *S. bayanus* o *S. cerevisiae*. También este método no es realmente adecuado para la diferenciación entre microorganismos vivos y muertos y por lo tanto no es adecuado para la cuantificación, porque se sabe por la bibliografía que los genes ribosómicos de ARNm tienen como promedio un período de vida media largo.
- 25
- En la base de datos EMBL del 13 de julio de 1992 (13/07/1992) XP002304942, así como en la base de datos EMBL del 31 de julio de 1991 (31/07/1991) XP002304943, se han descrito las secuencias de *Saccharomyces bayanus* y *Saccharomyces cerevisiae*, pero no el uso de las mismas.
- 30
- La publicación de D. Kosse et al. "Identification of yoghurt-spoiling yeast with 18S rRNA targeted oligonucleotide probes" en *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 20, 1997, páginas 468-480 se debe concebir principalmente como estado de la técnica puro, no siendo relevante para la invención.
- 35
- Un ensayo específico para la detección probiótica fue desarrollado, basado en una reacción de PCR con tres cebadores para identificar y detectar las tres cepas probióticas entre otras LAB, a partir de una pequeña cantidad de bacterias, cada una como una sola colonia. Esto no se ha descrito en bebidas alcohólicas y no alcohólicas, por ejemplo, vinos, mostos y otros zumos.
- 40
- Ninguno de los métodos mencionados anteriormente o de los métodos derivados de los mismos son adecuados para detectar un ADN genómico restante en la metodología de detección, así como para identificar un organismo vivo, basándose en el nivel de ADN.
- 45
- Sorprendentemente, se observó que en ninguna de las citas anteriormente mencionadas, se había descrito la combinación especial de parejas de cebador/sonda definida, la extracción de ADN optimizada para detectar el microorganismo con sensibilidad y especificidad muy seleccionadas y suficientes.
- En particular, el objeto de la invención era desarrollar un procedimiento seleccionado especial para identificar y cuantificar un organismo vivo, basándose en los niveles de ADN mediante el uso de una combinación muy especial de parejas de cebadores/sondas definida y la extracción de ADN optimizada como se ha mencionado anteriormente. Este es el asunto de la invención con rasgos muy característicos.
- 50
- Además, se desarrolló la metodología especial seleccionada de la invención.
- En particular, la invención permite una rápida detección y recuento en 12 horas o menos de un microorganismo deseado y no deseado en alimentos y bebidas alcohólicas y no alcohólicas, p. ej., vino, mosto y otros zumos de frutas. Además, la selección de genes diana adecuados como marcadores moleculares tiene la opción de poderse aplicar con respecto a la detección de un microorganismo vivo y muerto, siendo este método superior a todos los métodos conocidos de la técnica anterior.
- 55

Partes especiales de la invención, por ejemplo, el procedimiento reivindicado o el kit de prueba, son una realización especial seleccionada de la tecnología PCR fluorescente (TaqMan[®]) para el organismo diana antes mencionado.

5 La invención reivindica reactivos, métodos, procedimientos y la aplicación de sustancias como una selección especial que permite la detección, identificación y cuantificación rápida del microorganismo mencionado anteriormente, tal como *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*), *Hanseniaspora uvarum* y otros que son potenciales contaminantes del vino y otras bebidas como microorganismos no deseados y *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* y otros que son microorganismos deseados. La invención también abarca kits de prueba, tal y como se han mencionado anteriormente, que consisten en cebadores y sondas homólogos a la secuencia de actina. Estos kits de la invención permiten la correcta identificación y cuantificación de levadura y bacterias relevantes en alimentos con la aplicación de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), respectivamente con PCR en tiempo real.

10 La aplicabilidad de las secuencias diana se ha demostrado con éxito tal y como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, para *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, *Hanseniaspora uvarum*, *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*), en bebidas alcohólicas y no alcohólicas, por ejemplo en vino, mostos y otros zumos. Los kits listos para el uso se preparan, por ejemplo, empleando tres o más partes diferentes:

El procedimiento y el kit de prueba de acuerdo con la invención son superiores en muchos puntos a los mencionados anteriormente como técnica anterior, por ejemplo, tales como la microscopía o los llamados kits de detección rápida y serán capaces de reemplazar completamente a estos métodos después de la validación del procedimiento con el producto de la prueba particular.

20 El método de la invención tiene las siguientes ventajas:

El nuevo procedimiento (métodos) dispone de una considerable carga inventiva en comparación con los métodos conocidos para la detección de un microorganismo vivo y muerto. Sobre todo el procedimiento de la invención (métodos) o los kits de prueba disponibles están reaccionando más rápido con una especificidad o sensibilidad superiores y son útiles para la detección de la cantidad total de un microorganismo vivo y muerto.

25 Por primera vez es posible detectar los microorganismos deseados o contaminantes, *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*), *Hanseniaspora uvarum* y otros sin usar un microscopio o un cultivo anterior, con genes de expresión.

30 De este modo, solo *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*), *Hanseniaspora uvarum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* que expresan genes (lo que significa un organismo vivo en comparación con un organismo vivo y muerto que se podía detectar aplicando los métodos anteriores) se registran de forma cuantitativa y precisa con una sensibilidad de 1 - 100 hongos, en el producto investigado.

35 La consecuencia de la aplicación de la nueva metodología de la invención significa una mayor seguridad durante la maduración del vino, ya que *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*), *Hanseniaspora uvarum*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus* que son difíciles de cultivar, se pueden detectar fácilmente. Además, los resultados están disponibles en un período de tiempo mucho más corto en comparación con el método de detección más rápido conocido hasta la fecha. Todos estos factores conducen a productos de calidad superior y más económicos. Además de todo esto, no se necesitan requisitos especiales de seguridad ya que ningún componente del kit utilizado tiene una normativa de seguridad.

40 Se ha mostrado anteriormente, cuando se ha descrito la técnica anterior, que el recuento de células mediante PCR en tiempo real tiene una correlación muy alta con el recuento de células realizado con métodos microbiológicos clásicos. Con el fin de satisfacer estos requisitos se seleccionaron genes, que se expresan constitutivamente y que tienen características fundamentales en el ciclo vital de los microorganismos.

Organismo detectado	Gen diana
<i>Dekkera bruxellensis</i>	Gen de actina
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Gen de actina
<i>Saccharomyces bayanus</i>	Gen de actina
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gen de actina

Las definiciones de algunas expresiones empleadas en la parte descriptiva de esta solicitud son:

45 Un cebador es una molécula que tiene en una matriz de polímero una serie de nucleótidos. La secuencia de los nucleótidos se selecciona de forma que no tenga más de 90% de homología con la secuencia del amplicón que se va a amplificar. La molécula tiene al menos un extremo prolongable. El término prolongación significa la

adición de nucleótidos con la ayuda de enzimas. Como enzima, se utiliza preferentemente una ADN polimerasa.

El ácido nucleico que se va a amplificar sirve como matriz para la integración específica de nucleótidos.

5 La secuencia de la matriz determina la secuencia de los nucleótidos que se añaden al cebador. Se utilizan generalmente cebadores que tienen una longitud de entre 15 y 30 bases. El extremo 3' del cebador es óptimo para la prolongación y, por lo tanto, preferido.

Una sonda es una molécula que tiene como cebador una matriz de polímero con una cantidad de nucleótidos. Para el diseño de una sonda se utilizan las enseñanzas descritas en el documento USP 5.210.015.

10 Las secuencias específicas se obtienen mediante la búsqueda de una secuencia de al menos 13 bases de la matriz. Esta secuencia tiene que estar entre los dos cebadores. La sonda debe mostrar al menos 90% de homología con la matriz particular. Es mucho más conveniente si las sondas muestran un mayor grado de homología.

Las cepas de levadura mencionadas anteriormente en el presente documento son comunes en la fabricación de alimentos y bebidas, especialmente son bien conocidas en la industria de fabricación del vino y están bien descritas en la bibliografía y no se tienen que describir adicionalmente en detalle.

15 Los reactivos de la PCR son sustancias que son importantes para que una PCR tenga un máximo de sensibilidad y especificidad. Además de todo esto, por ejemplo, son sustancias tales como ADN polimerasa, iones de Mg^{2+} , sales de potasio, aditivos (glicerina, DMSO o formamida), cebadores, sondas, desoxinucleótido, tampones (base tri) y colorantes fluorescentes.

20 La invención en última instancia permite reemplazar de manera muy eficaz el método convencional para someter a ensayo el recuento viable total y la ausencia o presencia de *Dekkera bruxellensis* (*Bretannomyces*), *Hanseniaspora uvarum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*.

La tarea se resuelve mediante la aplicación de un método para la detección del microorganismo mencionado anteriormente, por ejemplo en alimentos, vino, mosto u otras bebidas alcohólicas y no alcohólicas que contienen al menos un fragmento de ADN. Las dianas de ADN seleccionadas se expresan en microorganismos vivos.

Por lo tanto, son convenientes para la detección de microorganismos vivos.

25 El ADN se detecta mediante la aplicación de las siguientes SEQ ID y espaciadores que contienen:

(a) el amplicón completo (SEQ ID del amplicón completo)

(b) un cebador directo (SEQ ID del cebador directo)

(c) una sonda (SEQ ID de la sonda)

(d) un cebador inverso (SEQ ID del cebador inverso)

30 (e) si es necesario un espaciador entre el cebador directo y la sonda

(f) si es necesario un espaciador entre la sonda y el cebador inverso

(g) si es necesario un espaciador aguas arriba del cebador directo (h) si es necesario un espaciador aguas abajo del cebador inverso

35 - considerando que SEQ ID (SEQ ID del cebador directo, SEQ ID de la sonda y SEQ ID del cebador inverso) puede incluir variantes, en donde uno, dos o más nucleótidos están sustituidos, eliminados y/o insertados y todas las variantes se establecen sobre el mismo gen diana:

- al hacer esto, la variante tiene en general la misma función que la secuencia de SEQ ID (SEQ ID del cebador directo, SEQ ID de la sonda y SEQ ID del cebador inverso), lo que significa la función de unión al ADN de la sonda y el ADN y la entrega de un extremo 3' prolongable para la ADN polimerasa de los cebadores.

40 El fragmento tomado de este grupo:

Sistema específico:

(i) para *Dekkera bruxellensis*

- SEQ ID NO: 1 como amplicón completo

- SEQ ID NO: 2 como cebador directo

45 - SEQ ID NO: 3 como sonda MGB

- SEQ ID NO: 4 como cebador inverso
- (ii) para *Dekkera bruxellensis*
- SEQ ID NO: 5 como amplicón completo
- SEQ ID NO: 6 como cebador directo
- 5 - SEQ ID NO: 7 como sonda TaqMan®
- SEQ ID NO: 8 como cebador inverso
- (iii) para *Hanseniaspora uvarum*
- SEQ ID NO: 9 como amplicón completo
- SEQ ID NO: 10 como cebador directo
- 10 - SEQ ID NO: 11 como sonda MGB
- SEQ ID NO: 12 como cebador inverso
- (iv) para *Hanseniaspora uvarum*
- SEQ ID NO: 13 como amplicón completo
- SEQ ID NO: 14 como cebador directo
- 15 - SEQ ID NO: 15 como sonda TaqMan®
- SEQ ID NO: 16 como cebador inverso
- (x) para *Saccharomyces bayanus*
- SEQ ID NO: 37 como amplicón completo
- SEQ ID NO: 38 como cebador directo
- 20 - SEQ ID NO: 39 como sonda TaqMan®
- SEQ ID NO: 40 como cebador inverso
- (xi) para *Saccharomyces bayanus*
- SEQ ID NO: 41 como amplicón completo
- SEQ ID NO: 42 como cebador directo
- 25 - SEQ ID NO: 43 como sonda MGB
- SEQ ID NO: 44 como cebador inverso

Se prefiere la aplicación de un kit con reactivos de la PCR. Incluso más preferida es la aplicación de un kit con reactivos de la PCR y tecnología TaqMan®.

- 30 Las secuencias mencionadas se muestran en el listado de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 44. Para una PCR TaqMan® competente, los fragmentos de ADN se tienen que seleccionar para que sean lo más corto posible. Esto mejora y amplía las posibilidades de selección de cebadores y sondas en el fragmento diana. La amplificación de fragmentos pequeños permite una determinación más fácil de sistemas específicos. Además de las sondas normales de TaqMan®, la invención incluye también el enlazante al surco menor (MGB) con desactivador oscuro.

Las siguientes exigencias son:

- 35 - el cebador tiene que tener de 15 a 30 pares de bases de longitud
- la secuencia de la sonda tiene que estar entre las secuencias de los cebadores sobre el ADN amplificable
- las sondas TaqMan® tienen que tener entre 15 y 30 bases de longitud
- las sondas enlazantes al surco menor tienen que tener de 14 a 20 pares de bases de longitud
- la sonda debe tener un contenido en GC de 40 a 60%

- la temperatura de fusión de la sonda tiene que ser de 8 a 12°C superior a la del cebador
- no tiene que haber una G en el extremo 5' de la sonda
- la secuencia de la sonda no tiene que contener más de 3 veces las mismas bases en una fila
- no tiene que haber complementariedad entre la secuencia del cebador y de la sonda o entre los cebadores y no tiene que haber una estructura secundaria visible en los cebadores y la sonda.

A pesar de las directrices generales para el diseño de un cebador y una sonda (Livak et al. 1995), la combinación óptima de un cebador y una sonda de cada aplicación de PCR TaqMan® tiene que ser determinada experimentalmente.

- En primer lugar se pudo mostrar en una serie de experimentos que el desarrollo de un sistema de PCR TaqMan® óptimo no era posible, aunque se habían seguido todas las pautas mencionadas anteriormente. En segundo lugar, a veces es necesario debido a las características de la secuencia diana de los organismos correspondientes (por ejemplo, alto contenido en GC, elementos altamente repetitivos o regiones conservadas de las secuencias) seleccionar secuencias del cebador y de la sonda que no cumplan las pautas mencionadas anteriormente para el diseño de los sistemas. Una consecuencia de la limitación a las pautas es que para el logro de la especificidad y la sensibilidad necesarias de una prueba de PCR TaqMan®, seleccionar la secuencia diana de diagnóstico en el genoma del microorganismo que se va a determinar y determinar experimentalmente las secuencias del cebador y de la sonda óptimas, son condiciones esenciales incluyendo el tampón TaqMan:

La especificidad y la sensibilidad de una prueba de PCR TaqMan® se determinarán junto con la secuencia del cebador y la sonda, con los siguientes parámetros:

- temperatura de desnaturalización del primer ciclo de la PCR
- temperatura de reasociación durante la fase de amplificación
- número de ciclos de la PCR
- uso de aditivos de la PCR como, por ejemplo, glicerina y/o formamida
- uso de 7-desaza-2-desoxi-GTP además de GTP en genes con un alto contenido en G/C
- concentración de iones Mg²⁺ en el tampón de la PCR
- concentración de cebadores y sondas
- unidades de la ADN polimerasa Taq
- distancia de los cebadores orientados en cis hasta la sonda.

Todos estos parámetros se consideraron durante el desarrollo de las pruebas PCR TaqMan® descritas.

- Los ácidos nucleicos que se utilizan como dianas de diagnóstico son: bajo la expresión ácido nucleico, que se ha utilizado aplicando la etapa de transcripción inversa seguida por el procedimiento de amplificación y la detección de los organismos diana mencionados anteriormente, se entiende ADN genómico. La secuencia de ADN genómico incluye además otros fragmentos con secuencias, que son característicos de una especie, género, familia o clase de microorganismos. Las secuencias de ADN se pueden utilizar en una prueba PCR TaqMan® como secuencia diana de diagnóstico para una especie, género, familia o clase.

No existen requisitos de seguridad especiales ya que ningún componente del kit tiene que seguir una normativa de seguridad.

Ejemplos

Identificación de la presencia de contaminantes microbianos

- Los siguientes ejemplos describen los kits de detección rápida en PCR, desarrollados para la detección de las dianas *Dekkera bruxellensis*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus hilgardii*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Oenococcus oeni*. Incluyendo todas las variaciones de secuencias y secuencias diana:

45

ES 2 439 227 T3

Condiciones de la PCR	Ejemplo 1
Perfil de la PCR en tiempo real	Ejemplo 2
Gen de actina	Ejemplo 3
<i>Dekkera bruxellensis</i>	Ejemplo 5-7
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Ejemplo 8-10
<i>Saccharomyces bayanus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Saccharomyces uvarum</i>	Ejemplo 29-31

Ejemplo 1

Los microorganismos se pueden detectar según la tabla con las siguientes condiciones de PCR (se ha utilizado sin AmpErase UNG):

Componente	<i>Dekkera bruxellensis</i>	<i>Dekkera bruxellensis</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
Mezcla TaqMan® 2x Universal Master	1x	1x	1x
Cebador directo	400 nM	400 nM	400 nM
Cebador inverso	400 nM	400 nM	400 nM
Sonda	100 nM	100 nM (sonda MGB)	100 nM
Muestra de ADN	5 µl	5 µl	5 µl
	Añadir H ₂ O hasta tener 25 µl de volumen total	Añadir H ₂ O hasta tener 25 µl de volumen total	Añadir H ₂ O hasta tener 25 µl de volumen total

5

Componente	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
Mezcla TaqMan® 2x Universal Master	1x
Cebador directo	400 nM
Cebador inverso	400 nM
Sonda	100 nM (sonda MGB)
Muestra de ADN	5 µl
	Añadir H ₂ O hasta tener 25 µl de volumen total

Componente	<i>S. bayanus</i> , <i>S. uvarum</i> , <i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Mezcla TaqMan® 2x Universal Master	1x	1x
Cebador directo	900 nM	900 nM
Cebador inverso	900 nM	900 nM
Sonda	100 nM	100 nM
Muestra de ADN	5 µl	5 µl
	Añadir H ₂ O hasta tener 25 µl de volumen total	Añadir H ₂ O hasta tener 25 µl de volumen total

Las sondas fueron fabricadas por la empresa Applied Biosystems, Weiterstadt, Alemania. La sonda es un oligonucleótido monocatenario que se marcó en el extremo 5' con un derivado fluorescente (FAM = 6-carboxifluoresceína) y en el extremo 3' con un colorante fluorescente o una molécula enlazante al surco menor (MGB).

- 5 La fabricación y la purificación se realizaron de acuerdo con las instrucciones de Applied Biosystems. Los cebadores fueron fabricados por la compañía MWG Biotech, Ebersberg, Alemania. Los cebadores son oligonucleótidos de cadena sencilla, que no se modifican. La fabricación y la purificación se realizaron de acuerdo a las instrucciones de MWG Biotech.

Ejemplo 2

- 10 Perfil de la PCR en tiempo real

Perfil de la PCR en tiempo real para sistemas específicos para la detección de *Dekkera bruxellensis*, *Hanseniaspora uvarum*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae* y otros microorganismos.

Incubación de la placa de PCR (placa de reacción de 96 pocillos de Microamp® Optical) en la TaqMan® utilizando el siguiente programa de temperatura-tiempo:

etapas	
actividad UNG*	2 min/50°C
activación de AmpliTaq Gold	10 min/95°C
amplificación (45 ciclos)	15 s/95°C 60 s/60°C
* Sistemas para evitar la contaminación "por arrastre". Los amplicones contaminantes se digieren antes de la PCR con la enzima uracil-N-glicosilasa (UNG).	

- 15

Ejemplo 3

Dekkera bruxellensis, *Hanseniaspora uvarum*, *Saccharomyces bayanus* y *Saccharomocycles cerevisiae* se pueden detectar en el vino, la cerveza y el licor con la secuencia del gen diana de actina, que es parte de esta solicitud. Áreas específicas del gen de actina sirvieron como diana diagnóstica para el desarrollo de un kit de detección rápida para la detección de *Dekkera bruxellensis*, *Hanseniaspora uvarum*, *Saccharomyces bayanus* y *Saccharomyces cerevisiae*. ¿Por qué se seleccionó este gen como diana diagnóstica? En contraste con los eucariotas superiores, la levadura produce una molécula de actina única codificada por un solo gen. La secuencia está altamente conservada no solo entre especies de levadura, si no en comparación con otras secuencias conocidas. El gen de la actina es un gen de mantenimiento, que desempeña un papel muy importante en el ciclo vital de los organismos *Dekkera bruxellensis*, *Hanseniaspora uvarum*, *Saccharomyces bayanus* y *Saccharomyces cerevisiae*.

- 20

- 25

Por lo tanto, se seleccionó para servir como un marcador genético para detectar las especies de levadura *Dekkera bruxellensis*, *Hanseniaspora uvarum*, *Saccharomyces bayanus* y *Saccharomyces cerevisiae*.

Ejemplo 5

Debido a la comparación de secuencias de ADN, a un trabajo de optimización práctico y al uso de diferentes combinaciones de cebadores y sondas, se determinaron las siguientes secuencias de ADN de actina como la mejor combinación de cebador y sonda para *Dekkera bruxellensis*:

- 30

Secuencia del cebador directo:

5' TGTCAGAGACATCAAGGAGAAGCT 3' (SEQ ID NO: 2)

Sonda:

- 35 5'- FAM TGTTACGTTGCTTTGGAC - MGB - 3' (SEQ ID NO: 3)

Secuencia del cebador inverso:

5' CGTCTGCATTTCTGGTCAA 3' (SEQ ID NO: 4)

Ejemplo 6

Selectividad de la prueba de detección con PCR de *Dekkera bruxellensis* para evaluar la selectividad de la prueba con PCR específica para *Dekkera bruxellensis*. Se extrajo ADN a partir de diferentes organismos. El ADN se utilizó

- 40

ES 2 439 227 T3

para realizar una prueba de PCR fluorescente. La cantidad de productos amplificados de la PCR se presentó como el valor Ct (valor umbral de ciclo) en la siguiente tabla:

Lista de las muestras de ADNc analizadas:

Organismo	Registro	Resultado (como valor Ct)
Levadura		
<i>Dekkera bruxellensis</i>	DSM 70739	24,2
	Jodat95	24m9
	Buess a	24,4
	Vallellina	23,9
	Malanser	23,5
	Cor94-41	23,5
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	DSM 2768	45,0
	FAW98/10-4	45,0
	FAW75 403H	45,0
	FAW Rbst-9/00-4	45,0
	FAW74	45,0
	Rst9/10	45,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Lalvin W15	45,0
	Lalvin W27	45,0
	Ceppo 20	45,0
	DSM 4266	45,0
	Lalvin EC 1118	45,0
<i>Saccharomyces bayanus</i>	FAW43	45,0
<i>Saccharomyces uvarum</i>	S6U	45,0
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Rst6	45,0
	DSM 70321	45,0
<i>Pichia anomala</i>	FAW10	45,0
<i>Candida stellata</i>	FAW3 Rst 98/1 0/7	45,0
Bacteria		
<i>Oenococcus oeni</i>	DSM 20257	45,0
<i>Pediococcus damnosus</i>	DSM 20331	45,0
<i>Lactobacillus brevis</i>	DSM 2647	45,0

5 Ejemplo 7

Sensibilidad de la prueba de *Dekkera bruxellensis* para determinar la prueba de PCR para *Dekkera bruxellensis*. El ADN se preparó y se utilizó en los experimentos de PCR.

Diferentes cantidades de ADN de *Dekkera bruxellensis* se emplearon en la PCR fluorescente. El número de células

de partida para la extracción de ADN y los valores Ct se ofrecen en la siguiente tabla. Los valores Ct son valores medios de seis replicaciones autónomas.

Número de células/ml para la extracción de ADN	Valores Ct medios
10^7	17,3
10^6	21,4
10^5	24,9
10^4	27,2
10^3	30,0
10^2	31,4
10^1	34,5

5 El resultado muestra que el ARN de 100 células de *Dekkera bruxellensis* se pudo detectar en un ml utilizando PCR fluorescente. La prueba de detección con PCR permite una cuantificación lineal en aproximadamente 6 etapas logarítmicas, es decir, entre 10^2 y 10^7 células/ml.

Ejemplo 8

10 Gracias a la comparación de secuencias de ADNc, a una labor de optimización práctica y al uso de diferentes combinaciones de cebadores y sondas, se determinaron las siguientes secuencias de ADN de actina como la combinación mejor de cebador y sonda para *Hanseniaspora uvarum*:

Secuencia de cebador directo:

5' TCAAAGAAAAGTTATCYTACGTTGCTT 3' (SEQ ID NO: 10)

Sonda:

5'- FAM AGACTTTGACCAAGAAA - MGB - 3' (SEQ ID NO: 11)

15 Secuencia de cebador inverso:

5' TGAAGATTGAGCAGCAGTTTCC 3'

Ejemplo 9

20 Selectividad de la prueba de detección con PCR de *Hanseniaspora uvarum* para evaluar la selectividad de la prueba de PCR específica para *Hanseniaspora uvarum*. El ADN se extrajo a partir de diferentes organismos. El ADN se utilizó para realizar una prueba de PCR fluorescente. La cantidad de productos amplificados con PCR se presentó como el valor Ct (ciclo umbral) en la tabla siguiente:

Lista de las muestras de ADN analizadas:

Organismo	Registro	Resultado (como valor Ct)
Levadura		
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	DSM 2768	22,0
FAW98/10-4	FAW98/10-4	21,3
	FAW75 403H	20,5
	FAW Rbst-9/00-4	20,5
	FAW74	21,0
	Rst 9/10	22,0

<i>Dekkera bruxellensis</i>	DSM 70739	45,0
	Jodat95	45,0
	Buess a	45,0
	Vallellina	45,0
Malanser	Malanser	45,0
	Cor94-41	45,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Lalvin W15	45,0
	Lalvin W27	45,0
	Ceppo 20	45,0
	DSM 4266	45,0
	Lalvin EC 1118	45,0
<i>Saccharomyces bayanus</i>	FAW43	45,0
<i>Saccharomyces uvarum</i>	S6U	45,0
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Rst6	45,0
	DSM 70321	45,0
<i>Pichia anomala</i>	FAW10	45,0
<i>Candida stellata</i>	FAW3	45,0
	Rst 98/1 0/7	45,0
Bacteria		45,0
<i>Oenococcus oeni</i>	DSM 20257	45,0
<i>Pediococcus damnosus</i>	DSM 20331	45,0
<i>Lactobacillus brevis</i>	DSM 2647	45,0

Ejemplo 10

Sensibilidad de la prueba de *Hanseniaspora uvarum* para determinar la prueba con PCR de *Hanseniaspora uvarum*. El ADN se preparó y se utilizó en los experimentos de PCR.

- 5 Diferentes cantidades de ADN de *Hanseniaspora uvarum* se utilizaron en la PCR fluorescente. El número de células de partida para la extracción de ADN y los valores Ct se proporcionan en la siguiente tabla. Los valores Ct son valores medios de seis repeticiones autónomas.

Número de células/ml para la extracción de ADN	Valores Ct medios
10^7	18,7
10^6	22,0
10^5	25,4
10^4	29,1
10^3	32,1
10^2	35,5
10^1	40,6

El resultado muestra que se pudo detectar el ADN de 100 células de *Hanseniaspora uvarum* en un ml utilizando PCR fluorescente. La prueba de detección con PCR permite una cuantificación lineal en aproximadamente 6 etapas logarítmicas, es decir, entre 10^2 y 10^7 células/ml.

Ejemplo 30

- 5 Selectividad de *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces uvarum*. Prueba de detección con PCR para evaluar la selectividad de la prueba de PCR específica para *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces uvarum*. El ADN se extrajo a partir de diferentes organismos. El ADNc se utilizó para realizar una prueba con PCR fluorescente. La cantidad de productos amplificados con PCR se presentó como el valor Ct (ciclo umbral) en la siguiente tabla:

- 10 Lista de las muestras de ADNc analizadas

Organismo	Registro	Resultado (como valor Ct)
<i>Saccharomyces bayanus</i>		22,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DSM 4266	23,1
<i>Saccharomyces uvarum</i>		22,8
<i>Oenococcus oeni</i>	DSM 20257	45,0
<i>Pediococcus damnosus</i>	DSM 20331	45,0
<i>Pediococcus damnosus</i>	Bpe 176	45,0
<i>Pediococcus damnosus</i>	Bpe 181	45,0
<i>Pediococcus parvulus</i>	DSM 20332	45,0
<i>Pediococcus parvulus</i>	Bpe 124	45,0
<i>Pediococcus parvulus</i>	Bpe 150	45,0
<i>Pediococcus parvulus</i>	Bpe 160	45,0
<i>Lactobacillus brevis</i>	DSM 2647	45,0
<i>Lactobacillus brevis</i>	Lb 11 Aa	45,0
<i>Lactobacillus brevis</i>	Lb 15 Ca	45,0
<i>Lactobacillus brevis</i>	Lb 24A	42,0
<i>Lactobacillus brevis</i>	Lb 21E	39,9
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	DSM 20051	38,5
<i>Lactobacillus plantarum</i>	DSM 20174	45,0
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	DSM 2768	45,0
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	DSM 70739	45,0

Ejemplo 31

Sensibilidad de la prueba de *Saccharomyces spp.* para determinar la prueba con PCR de *Saccharomyces spp.* El ADN se preparó y se utilizó en los experimentos de PCR.

- 15 Las pruebas de sensibilidad se realizaron utilizando el ADN de *Saccharomyces bayanus*. Diferentes cantidades de ADN de *Saccharomyces bayanus* se utilizaron en la PCR fluorescente. El número de células de partida para la extracción de ADN y los valores Ct se proporcionan en la siguiente tabla. Los valores Ct son valores medios de seis replicaciones autónomas.

Número de células/ml para la extracción de ADN	Valores Ct medios
10^7	18,6
10^6	22,1
10^5	24,9
10^4	26,8
10^3	31,4
10^2	34,7

El resultado muestra que el ADN de 100 células de *Saccharomyces bayanus* se podía detectar en un ml utilizando PCR fluorescente. La prueba de detección con PCR permite una cuantificación lineal en aproximadamente 6 etapas logarítmicas, es decir, entre 10^2 y 10^7 células/ml.

5 **Cebadores y sondas**

para *Dekkera bruxellensis*

SEQ ID NO: 1 (5' a 3') / como amplicón

TGTCAGAGACATCAAGGAGAAGCTTTGTTACGTTGCTTTGGACTTTGACCA
GGAAATGCAGACG

10 SEQ ID NO: 2 (5' a 3') / cebador directo

TGTCAGAGACATCAAGGAGAAGCT

SEQ ID NO: 3 (5' a 3') / como sonda

(FAM) TGTTACGTTGCTTTGGAC (MGB)

SEQ ID NO: 4 (5' a 3') / como cebador inverso

15 CGTCTGCATTTCTGGTCAA

para *Dekkera bruxellensis*

SEQ ID NO: 5 (5' a 3') / como amplicón

TGTCAGAGACATCAAGGAGAAGCTTTGTTACGTTGCTTTGGACTTTGACCAGGAA
ATGCAGACGGCAGCACAG

20 SEQ ID NO: 6 (5' a 3') / cebador directo

TGTCAGAGACATCAAGGAGAAGCT

SEQ ID NO: 7 (5' a 3') / como sonda

(FAM) TGTTACGTTGCTTTGGACTTTGACCAGGA (TAMRA)

SEQ ID NO: 8 (5' a 3') / como cebador inverso

25 CTGTGCTGCCGTCTGCAT

para *Hanseniaspora uvarum*

SEQ ID NO: 9 (5' a 3') / como amplicón

TCAAAGAAAAGTTATCYTACGTTGCTTTAGACTTTGACCAAGAAATGGAA
ACTGCTGCTCAATCTTCA

ES 2 439 227 T3

SEQ ID NO: 10 (5' a 3') / cebador directo

TCAAAGAAAAGTTATCYTACGTTGCTT

SEQ ID NO: 11 (5' a 3') / como sonda

(FAM) AGACTTTGACCAAGAAA (MGB)

5 SEQ ID NO: 12 (5' a 3') / como cebador inverso

TGAAGATTGAGCAGCAGTTT

para *Hanseniaspora uvarum*

SEQ ID NO: 13 (5' a 3') / como amplicón

AGTCATCACCATTTGGTAACGAAAGATTCAGAGCTCCAGAAGCCTTATTCC

10 AACCTTCCTTTATTGGTTTAGAATCTGCTGG

SEQ ID NO: 14 (5' a 3') / cebador directo

AGTCATCACCATTTGGTAACGAAAG

SEQ ID NO: 15 (5' a 3') / como sonda

(FAM) TTCAGAGCTCCAGAAGCCTTATTCCAACCT (TAMRA)

15 SEQ ID NO: 16 (5' a 3') / como cebador inverso

CCAGCAGATTCTAAACCAATAAAGG

para *Saccharomyces bayanus*

SEQ ID NO: 37 (5' a 3') / como amplicón

atttgccggtgagagattgactgactactgtgaagatcttgaggaacgtggttactcttctccaccactgctgaaagaga

20 aattgtccgtgacatcaaggaaaaactatgttacgtcg

SEQ ID NO: 38 (5' a 3') / cebador directo

ATTTGGCCGGTAGAGATTTGAC

SEQ ID NO: 39 (5' a 3') / como sonda

(FAM) TTGAGTGAACGTGGTTACTCTTTCTCCACCACT (TAMRA)

25 SEQ ID NO: 40 (5' a 3') / como cebador inverso

TTG AGT GAA CGT GGT TAC TCT TTC TCC ACC ACT

para *Saccharomyces spp* (*S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. uvarum*)

SEQ ID NO: 41 (5' a 3') / como amplicón

ttg aga gtt gcc cca gaa gaa cac cct gtt ctt ttg act gaa gct cca atg aac cct aaa tca aac aga gaa aag atg act c

30 SEQ ID NO: 42 (5' a 3') / cebador directo

TTG AGA GTT GCC CCA GAA GAA C

SEQ ID NO: 43 (5' a 3') / como sonda

(FAM) ACC CTG TTC TTT TGA C (MGB)

SEQ ID NO: 44 (5' a 3') / como cebador inverso

35 GAG TCA TCT TTT CTC TGT TTG ATT TAG G

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ETS Laboratories

5 <120> NUEVOS MÉTODOS Y KITS RELACIONADOS CON LA DETECCIÓN, LA IDENTIFICACIÓN Y LA CUANTIFICACIÓN DE LEVADURAS EN VINO, CERVEZA Y ZUMOS

<130> P2998EPPC

10 <140> EP 05749752.1
<141> 06-06-2005

<150> EP04014518.7
<151> 21-06-2004

15 <160> 49

<170> BiSSAP 1.2

20 <210> 1
<211> 64
<212> ADN
<213> Dekkera bruxellensis

25 <220>
<221> fuente
<222> 1..64
<223> /organismo="Dekkera bruxellensis" /mol_type="AND sin asignar"

30 <220>
<221> unión_cebador
<222> 1..64
<223> /nota="secuencia de amplicón completa"

35 <400> 1

tgtcagagac atcaaggaga agctttgtta cgttgctttg gactttgacc aggaaatgca 60

gacg 64

40 <210> 2
<211> 24
<212> DNA
<213> Dekkera bruxellensis

45 <220>
<221> fuente
<222> 1..24
<223> /organismo="Dekkera bruxellensis" /tipo_mol="ADN sin asignar"

50 <220>
<221> unión_cebador
<222> 1..24
<223> /nota="cebador directo"

55 <400> 2

tgtcagagac atcaaggaga agct 24

60 <210> 3
<211> 18
<212> ADN
<213> Dekkera bruxellensis

<220>

ES 2 439 227 T3

<221> fuente
 <222> 1..18
 <223> /organismo="Dekkera bruxellensis" /tipo_mol="ADN sin asignar"

5 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> 1..18
 <223> /nota="sonda MGB"

10 <400> 3
 tgttacgttg cttggac 18

15 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Dekkera bruxellensis

20 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /organismo="Dekkera bruxellensis" /tipo_mol="ADN sin asignar"

25 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> 1..20
 <223> /note="cebador inverso"

30 <400> 4
 cgtctgcatt tcctgtcaa 20

35 <210> 5
 <211> 73
 <212> ADN
 <213> Dekkera bruxellensis

40 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..73
 <223> /organismo="Dekkera bruxellensis" /tipo_mol="ADN sin asignar"

45 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> 1..73
 <223> /nota="secuencia de amplicón completa"

<400> 5
 tgtcagagac atcaaggaga agctttgtta cgttgctttg gactttgacc aggaaatgca 60

50 gacggcagca cag 73

55 <210> 6
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Dekkera bruxellensis

60 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..24
 <223> /organismo="Dekkera bruxellensis" /tipo_mol="ADN sin asignar"

<220>
 <221> unión_cebador

ES 2 439 227 T3

```

<222> 1..24
<223> /nota="cebador directo"

<400> 6
5      tgtcagagac atcaaggaga agct                24

<210> 7
<211> 29
10     <212> ADN
      <213> Dekkera bruxellensis

<220>
<221> fuente
15     <222> 1..29
      <223> /organismo="Dekkera bruxellensis" /tipo_mol="ADN sin asignar"

<220>
<221> unión_cebador
20     <222> 1..29
      <223> /nota="sonda TaqMan"

<400> 7
25     tgttacgttg cttggactt tgaccagga          29

<210> 8
<211> 18
<212> ADN
30     <213> Dekkera bruxellensis

<220>
<221> fuente
<222> 1..18
35     <223> /organismo="Dekkera bruxellensis" / tipo_mol="ADN sin asignar "

<220>
<221> unión_cebador
<222> 1..18
40     <223> /note="reverse primer"

<400> 8
45     ctgtgctgcc gtctgcat                    18

<210> 9
<211> 68
<212> ADN
50     <213> Hanseniaspora uvarum

<220>
<221> fuente
<222> 1..68
55     <223> /organism="Hanseniaspora uvarum" / tipo_mol="ADN sin asignar "

<220>
<221> unión_cebador
<222> 1..68
60     <223> /nota="secuencia de amplicón completa"

<400> 9
      tcaaagaaaa gttatcytac gttgcttttag actttgacca agaaatggaa actgctgctc    60

      aatcttca                                68

```

ES 2 439 227 T3

<210> 10
 <211> 27
 <212> ADN
 5 <213> Hanseniaspora uvarum

 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..27
 10 <223> /organismo="Hanseniaspora uvarum" / tipo_mol="ADN sin asignar"

 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> 1..27
 15 <223> /nota="cebador directo"

 <400> 10

 tcaaagaaaa gttatcytac gttgctt 27
 20
 <210> 11
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Hanseniaspora uvarum
 25
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..17
 <223> /organismo="Hanseniaspora uvarum" /tipo_mol="ADN sin asignar"
 30
 <220>
 <221> primer_bind
 <222> 1..17
 <223> /nota="sonda MGB"
 35
 <400> 11

 agacttgac caagaaa 17
 40
 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Hanseniaspora uvarum
 45
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /organismo="Hanseniaspora uvarum" / tipo_mol="ADN sin asignar"
 50
 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> 1..20
 <223> /nota="cebador inverso"
 55
 <400> 12

 tgaagattga gcagcagttt 20
 60
 <210> 13
 <211> 81
 <212> ADN
 <213> Hanseniaspora uvarum
 65
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..81

ES 2 439 227 T3

```

<223> /organismo="Hanseniaspora uvarum" / tipo_mol="ADN sin asignar"

<220>
<221> unión_cebador
5 <222> 1..81
<223> /nota="secuencia de amplicón completa"

<400> 13

    agtcatcacc attggtaacg aaagattcag agctccagaa gccttattcc aaccttcctt        60

10  tattggttta gaatctgctg g                                                81

<210> 14
<211> 24
<212> ADN
15 <213> Hanseniaspora uvarum

<220>
<221> fuente
<222> 1..24
20 <223> /organismo="Hanseniaspora uvarum" / tipo_mol="ADN sin asignar"

<220>
<221> unión_cebador
<222> 1..24
25 <223> /nota="cebador directo"

<400> 14

    agtcatcacc attggtaacg aaag                                24

30 <210> 15
<211> 30
<212> DNA
<213> Hanseniaspora uvarum
35 <220>
<221> fuente
<222> 1..30
<223> /organismo="Hanseniaspora uvarum" /tipo_mol="ADN sin asignar"
40 <220>
<221> unión_cebador
<222> 1..30
<223> /nota="sonda TaqMan"
45 <400> 15

    ttcagagctc cagaagcctt attccaacct                                30

50 <210> 16
<211> 25
<212> ADN
<213> Hanseniaspora uvarum

55 <220>
<221> fuente
<222> 1..25
<223> /organismo="Hanseniaspora uvarum" /tipo_mol="ADN sin asignar"

60 <220>
<221> unión_cebador
<222> 1..25
<223> /nota="cebador inverso"

```

ES 2 439 227 T3

<400> 16
5 ccagcagatt ctaaccaat aaagg
<210> 17
<400> 17
000
10 <210> 18
<400> 18
15 000
<210> 19
<400> 19
20 000
<210> 20
25 <400> 20
000
<210> 21
30 <400> 21
000
35 <210> 22
<400> 22
000
40 <210> 23
<400> 23
45 000
<210> 24
<400> 24
50 000
<210> 25
55 <400> 25
000
<210> 26
60 <400> 26
000
65 <210> 27

25

<400> 27
000
5 <210> 28
<400> 28
000
10 <210> 29
<400> 29
15 000
<210> 30
<400> 30
20 000
<210> 31
25 <400> 31
000
<210> 32
30 <400> 32
000
35 <210> 33
<400> 33
000
40 <210> 34
<400> 34
45 000
<210> 35
<400> 35
50 000
<210> 36
55 <400> 36
000
<210> 37
60 <211> 123
<212> ADN
<213> *Saccharomyces bayanus*
<220>
65 <221> fuente
<222> 1..123

ES 2 439 227 T3

<223> /organismo="Saccharomyces bayanus" /tipo_mol="ADN sin asignar"

<220>
 <221> unión_cebador
 5 <222> 1..123
 <223> /nota="secuencia de amplicón completa"

<400> 37

atttgccgg tagagatttg actgactact tgatgaagat cttgagtga cgtggttact 60

ctttctccac cactgctgaa agagaaattg tccgtgacat caaggaaaa ctatgttacg 120

10

<210> 38
 <211> 22
 <212> ADN
 15 <213> Saccharomyces bayanus

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..22
 20 <223> /organismo="Saccharomyces bayanus" /tipo_mol="ADN sin asignar"

<220>
 <221> unión_cebador
 <222> 1..22
 25 <223> /nota="cebador directo"

<400> 38

atttgccgg tagagatttg ac 22

30

<210> 39
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Saccharomyces bayanus

35

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..33
 <223> /organism="Saccharomyces bayanus" /tipo_mol="ADN sin asignar"

40

<220>
 <221> unión_cebador
 <222> 1..33
 <223> /nota="sonda TaqMan"

45

<400> 39

ttgagtgaac gtggttactc tttctccacc act 33

50

<210> 40
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Saccharomyces bayanus

55

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..33
 <223> /organismo="Saccharomyces bayanus" /tipo_mol="ADN sin asignar"

60

<220>
 <221> unión_cebador

ES 2 439 227 T3

<211> 28
<212> ADN
<213> Saccharomyces spp

5 <220>
<221> fuente
<222> 1..28
<223> /organismo="Saccharomyces spp" /tipo_mol="ADN sin asignar"

10 <220>
<221> unión_cebador
<222> 1..28
<223> /nota="cebador inverso"

15 <400> 44
gagtcacatt ttctctgttt gatttagg 28

<210> 45

20 <400> 45
000

25 <210> 46
<400> 46

<210> 47

30 <400> 47
000

35 <210> 48
<400> 48
000

40 <210> 49
<211> 22
<212> ADN
<213> Hanseniaspora uvarum

45 <220>
<221> fuente
<222> 1..22
<223> /organismo="Hanseniaspora uvarum" /tipo_mol="ADN sin asignar"

50 <400> 49
tgaagattga gcagcagttt cc 22

55

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar e identificar organismos de levadura en bebidas alcohólicas y no alcohólicas, que comprende:

- extraer una muestra de ADN a partir de una muestra de bebida;

5 - poner en contacto la muestra de ADN con una pareja de cebadores de ADN y una sonda de ADN, que comprenden moléculas de cebadores de ADN de longitud suficiente de nucleótidos contiguos del gen de actina o de homólogos del mismo;

- proporcionar una condición para la reacción de amplificación del ácido nucleico que permite la realización de dicha amplificación del ácido nucleico, produciendo de este modo una molécula de amplicón de ADN;

10 - detectar la molécula de amplicón;

caracterizado porque las secuencias de los cebadores y la secuencia de la sonda se seleccionan entre una de las siguientes combinaciones:

- secuencia de cebador SEQ ID NO: 2 y 4 y secuencia de sonda SEQ ID NO: 3 para detectar *Dekkera bruxellensis*;

15 - secuencia de cebador SEQ ID NO: 6 y 8 y secuencia de sonda SEQ ID NO: 7 para detectar *Dekkera bruxellensis*;

- secuencia de cebador SEQ ID NO: 10 y 12 y secuencia de sonda SEQ ID NO: 11 para detectar *Hanseniaspora uvarum*;

20 - secuencia de cebador SEQ ID NO: 14 y 16 y secuencia de sonda SEQ ID NO: 15 para detectar *Hanseniaspora uvarum*;

- secuencia de cebador SEQ ID NO: 10 y TGAAGATTGAGCAGCAGTTTCC y secuencia de sonda SEQ ID NO: 11 para detectar *Hanseniaspora uvarum*.

2. El método según la reivindicación 1, en donde el número de organismos de levadura que estaban presentes en la muestra de bebida se determina basándose en la cantidad de moléculas de amplicón de ADN producidas, y en donde la cantidad de moléculas de amplicón de ADN se determina mediante PCR fluorescente cuantitativa.

3. El método según la reivindicación 2, en donde el número de organismos de levadura que estaban presentes en la muestra de bebida se determina basándose en el número de ciclos de replicación durante la reacción de amplificación del ácido nucleico que son necesarios para obtener una cierta señal fluorescente.

4. Un método para la detección y la identificación de una molécula de ADN seleccionada a partir del gen de actina o de homólogos del mismo de organismos de levadura en una muestra de ADN, comprendiendo el método:

- extraer una muestra de ADN a partir de una muestra de bebida;

- poner en contacto la muestra de ADN con una pareja de cebadores de ADN y una sonda de ADN, que comprenden moléculas de cebadores de ADN de longitud suficiente de nucleótidos contiguos del gen de actina o de homólogos del mismo;

- proporcionar una condición para la reacción de amplificación del ácido nucleico que permite la realización de dicha amplificación del ácido nucleico, produciendo de este modo una molécula de amplicón de ADN;

- detectar la molécula de amplicón;

caracterizado porque las secuencias de los cebadores y la secuencia de la sonda se seleccionan a partir de al menos una de las siguientes combinaciones:

- secuencia de cebador SEQ ID NO: 2 y 4 y secuencia de sonda SEQ ID NO: 3 para detectar *Dekkera bruxellensis*;

- secuencia de cebador SEQ ID NO: 6 y 8 y secuencia de sonda SEQ ID NO: 7 para detectar *Dekkera bruxellensis*;

- secuencia de cebador SEQ ID NO: 10 y 12 y secuencia de sonda SEQ ID NO: 11 para detectar *Hanseniaspora uvarum*;

- secuencia de cebador SEQ ID NO: 14 y 16 y secuencia de sonda SEQ ID NO: 15 para detectar *Hanseniaspora uvarum*;

- secuencia de cebador SEQ ID NO: 10 y TGAAGATTGAGCAGCAGTTTCC y secuencia de sonda SEQ ID NO: 11 para detectar *Hanseniaspora uvarum*.

5. El método según la reivindicación 4, en donde el número de moléculas de ADN que estaban presentes en la muestra de bebida se determina basándose en la cantidad de moléculas de amplicón de ADN producidas, y en donde la cantidad de moléculas de amplicón de ADN se determina mediante PCR fluorescente cuantitativa.

6. El método según la reivindicación 5, en donde el número de moléculas de ADN que estaban presentes en la muestra de bebida se determina basándose en el número de ciclos de replicación durante la reacción de amplificación del ácido nucleico que son necesarios para obtener una cierta señal fluorescente.

10. Un kit de prueba para detectar e identificar contaminaciones por levadura en bebidas alcohólicas y no alcohólicas, que comprende al menos una de las siguientes combinaciones de cebadores y sondas específicas para un gen diana de un contaminante de levadura:

- secuencia de cebador SEQ ID NO: 2 y 4 y secuencia de sonda SEQ ID NO: 3 para detectar *Dekkera bruxellensis*;

15. - secuencia de cebador SEQ ID NO: 6 y 8 y secuencia de sonda SEQ ID NO: 7 para detectar *Dekkera bruxellensis*;

- secuencia de cebador SEQ ID NO: 10 y 12 y secuencia de sonda SEQ ID NO: 11 para detectar *Hanseniaspora uvarum*;

- secuencia de cebador SEQ ID NO: 14 y 16 y secuencia de sonda SEQ ID NO: 15 para detectar *Hanseniaspora uvarum*;

20. - secuencia de cebador SEQ ID NO: 10 y TGAAGATTGAGCAGCAGTTTCC y secuencia de sonda SEQ ID NO: 11 para detectar *Hanseniaspora uvarum*.

8. El kit de prueba según la reivindicación 7, caracterizado porque el kit de prueba está destinado al empleo en una tecnología de PCR fluorescente.

25. 9. Uso de un kit según la reivindicación 7 u 8, para detectar e identificar organismos de levadura en bebidas alcohólicas y no alcohólicas.

10. Un método para la detección y la identificación de organismos en bebidas alcohólicas y no alcohólicas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, utilizando un kit de prueba según la reivindicación 7 u 8.