

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 970**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/195** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2011** **E 11716841 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2015** **EP 2576599**

54 Título: **Bacteria genéticamente modificada de la especie Listeria monocytogenes**

30 Prioridad:

**02.06.2010 EP 10005731**

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

**07.07.2015**

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)  
Frankfurter Strasse 250  
64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:

**ROSSMANITH, PETER;  
FRUEHWIRTH, KARIN;  
WAGNER, MARTIN y  
FUCHS, SABINE**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 539 970 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**

Bacteria genéticamente modificada de la especie *Listeria monocytogenes*

5 La presente invención se refiere a una bacteria genéticamente modificada de la especie *Listeria monocytogenes*, en la que se ha delecionado el locus genómico del factor de transcripción PrfA, que se caracteriza porque a nivel genómico contiene una secuencia artificial que actúa como control interno de amplificación, el uso de esta bacteria, así como un método para detectar y determinar cualitativa y/o cuantitativamente la presencia de *Listeria monocytogenes* de tipo salvaje en una muestra que se sospecha está contaminada con dicho microorganismo y un kit.

Antecedentes de la invención:

10 *Listeria monocytogenes* es una bacteria gram positiva patógena que causa la listeriosis y es uno de los patógenos más virulentos transmitidos por los alimentos.

15 La detección de patógenos en muestras, por ejemplo en muestras de alimentos o muestras clínicas como sangre, tejidos o heces es cada vez más importante. No obstante, para identificar con claridad y, opcionalmente, cuantificar las células contenidas en una muestra deben proporcionarse métodos fiables para su detección y cuantificación.

Desde la primera implementación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), esta herramienta de biología molecular se ha desarrollado como un método que proporciona muchas oportunidades para mejorar la detección de microorganismos.

20 Un requisito previo importante para que los métodos basados en la PCR se conviertan en patrones reconocidos a nivel internacional es el control interno de amplificación (IAC, por sus siglas en inglés). Un IAC es una secuencia de ADN no diana presente en el mismo tubo de muestra que se coamplifica de forma simultánea con la secuencia diana. En una PCR sin IAC, un resultado negativo no es definitivo ya que puede significar no solo que no había secuencia diana presente sino también que la reacción de amplificación se inhibió por diversos factores. Por tanto, el Comité Europeo de Normalización en colaboración con la Organización Internacional de Normalización (ISO, por sus siglas en inglés) propuso una directriz general para la PCR diagnóstica que requería la presencia de un IAC (ISO/DIS 22174).

25 El IAC debe ser competitivo al usar los mismos sitios de unión del cebador que la PCR diana y claramente distinguible de los amplicones del ADN diana gracias a su longitud y la longitud de onda de fluorescencia del colorante sonda usado en la PCR en tiempo real. En resumen, las características del control deberán ser lo más parecidas posible a las características de la diana garantizando, sin embargo, una interferencia insignificante con la detección de la diana.

30 La implementación de un IAC en los ensayos de PCR garantiza la fiabilidad de los resultados negativos; sin embargo, esto es cierto únicamente para la reacción enzimática que facilita la amplificación de la diana en la PCR y para la reacción de detección cuantitativa y de confirmación basada en el uso de sondas fluorescentes en la PCR en tiempo real. Sin embargo, los pasos metodicos preliminares, como la preparación de la muestra y el aislamiento/purificación del ADN de la matriz de muestras no están cubiertos por este tipo de controles y si acaso, han de ser comprobados mediante controles externos. Esto no permite el control de muestras individuales y, por tanto, los resultados negativos implican la posibilidad de una verificación falsa del estado patogénico de las muestras investigadas, por ejemplo, alimentos.

35 Por tanto, es necesario un control interno del proceso de la muestra (CIPM) que debe cubrir todas los pasos metodicos necesarios para una detección cuantitativa fiable de patógenos con una PCR convencional o en tiempo real

40 Para la detección de virus de ARN transmitidos por los alimentos y el agua se ha publicado el uso de *Calciivirus* felino y el bacteriófago MS2 como controles internos (Mattison y col. [2009] Int. J. Food Microbiol. 132, 73-77; Di y col. [2010] J. Virol. Methods 165, 57-63; Dreier y col. [2005] J. Clin. Microbiol. 43, 4551-4557).

Murphy y col. (2007, Int. J. Food Microbiol. 120, 110-119) describen un control interno del proceso de la muestra bacteriano para la detección de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica*. Este control se basa en una cepa de *E. coli* recombinante que incluye fragmentos del gen de fluorescencia verde (*gfp*) y del gen *iroB* de *S. enterica*. El control no se usaba con fines cuantitativos y la cepa de *E. coli* gram negativa subyacente mostraría características diferentes durante la preparación de la muestra en comparación con *L. monocytogenes*.

Por consiguiente, existe la necesidad de nuevos métodos fiables que permitan la detección y cuantificación del patógeno *Listeria monocytogenes* mediante PCR en tiempo real en muestras contaminadas.

De forma inesperada, se ha encontrado que este problema puede resolverse usando una cepa *L. monocytogenes* EGDe IAC+,  $\Delta$ -*prfA* como control interno del proceso que cubra el proceso de detección completo.

#### Descripción de la invención

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención es una bacteria genéticamente modificada de la especie *Listeria monocytogenes*, en la que se ha delecionado el locus genómico del factor de transcripción PrfA, caracterizada porque a nivel genómico contiene una secuencia artificial que actúa como control interno de amplificación (IAC).

Una bacteria genéticamente modificada de la especie *Listeria monocytogenes* indica una especie de *Listeria monocytogenes* resultante de la alteración de su material genético usando técnicas de ingeniería genética. La modificación genética comprende la inserción y/o deleción de genes. La deleción del gen *prfA* puede, por ejemplo, conseguirse como se describe en Böckmann y col. (1996) Mol. Microbiol. 22, 643-653.

El locus genómico del factor de transcripción PrfA constituye la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína PrfA. Esta es una secuencia de 705 pares de bases (Leimeister-Wächter y col., 1990; Proc Natl Acad Sci USA, 87, 8336-40; Glaser y col., 2001; Science, 294, 849-52). El gen se localiza dentro de la región cromosómica que rodea al gen de la listeriolisina (*lisA*) de *L. monocytogenes* (n.º de identificación del gen: 987031; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/987031#pageTop>). También se proporciona información relacionada con el factor de transcripción PrfA en Scortti y col. (2007) Microbes and Infection 9, 1196-1207, que se incorpora a este documento como referencia. PrfA controla la expresión de determinantes de virulencia clave de *Listeria monocytogenes*. PrfA es una proteína con 237 restos de 27 kDa. La deleción del locus genómico del factor de transcripción PrfA hace que el mutante no sea patógeno.

Según la presente invención, por control interno de amplificación (IAC) se entiende una secuencia de ácido nucleico artificial presente en el tubo de muestra durante la reacción de PCR y que se coamplifica con una determinada secuencia diana como se define en Hoorfar y col. (2003) Lett. Appl. Microbiol. 38, 79-80. La presencia de un IAC permite determinar resultados falsos negativos. La secuencia IAC puede ser cualquier secuencia polinucleotídica. El tamaño de esta secuencia puede variar dependiendo del ensayo de PCR específico y de las condiciones de reacción del mismo.

La secuencia IAC es preferiblemente una secuencia de nucleótidos de copia única es decir, una secuencia de nucleótidos presente solo una vez en el genoma haploide de una bacteria *Listeria monocytogenes*.

Preferiblemente la secuencia IAC es una secuencia que no aparece en *Listeria monocytogenes* ni en ninguna de las demás especies que se prevé aparezcan de forma natural dentro de una muestra que se va a estudiar o en la propia matriz de muestras.

Preferiblemente, la secuencia IAC contiene secuencias de unión al cebador en los extremos 5' y 3'.

Según la presente invención se prefiere que el IAC sea un IAC competitivo, es decir, el IAC de la *Listeria monocytogenes* genéticamente modificada y la secuencia diana *prfA* de la *Listeria monocytogenes* de tipo salvaje se amplifican con un conjunto de cebadores común en las mismas condiciones y en el mismo tubo de PCR durante la PCR en tiempo real.

Por tanto, preferiblemente, las secuencias de unión al cebador del IAC son, en particular, idénticas a las secuencias de unión al cebador del locus *prfA* de la *Listeria monocytogenes* de tipo salvaje.

## ES 2 539 970 T3

En una realización muy especialmente preferida de la presente invención la secuencia IAC artificial es la secuencia de 100 pb según la SEC ID N.º 1

5'-GAT ACA GAA ACA TCG GTT GGC GTA TTC GAA ATG TCC GTT CGG TTG GCG CTA TGA AGA GAT ACG CGG TGG AAC CTG GAA CCT GAT GGC ATC AAG ATT ACA C-3'.

- 5 Esta secuencia IAC se describe en Rossmann y col. (2006) Res. Microbiol. 157, 763-771. Según la presente invención, pueden usarse secuencias IAC con una homología de más del 80 % con la SEC ID N.º 1. Preferiblemente, la homología de secuencia es de más del 90 %, más preferiblemente de más del 95 %.

Según la presente invención se prefiere una cepa *Listeria monocytogenes* EGDe genéticamente modificada como se especifica anteriormente.

- 10 La cepa *Listeria monocytogenes* EGDe es una preparación clínica de *Listeria monocytogenes* serovar 1/2a. Esta cepa es el organismo modelo más extendido del uso científico (número de acceso a GenBank: AL591978; Glaser y col. [2001] Science 294 [5543], 849-52).

- 15 Un aspecto adicional de la presente invención es una cepa *Listeria monocytogenes* EGDe genéticamente modificada, en la que se ha delecionado el locus genómico del factor de transcripción PrfA, que contiene la secuencia de control interno de amplificación (IAC) de SEC ID N.º 1 depositada en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) como *Listeria monocytogenes* ΔprfA+IAC con el número DSM 23639 el 20 de mayo de 2010.

- 20 La bacteria genéticamente modificada de la especie *Listeria monocytogenes* según la presente invención cumple los requisitos dados para un control interno del proceso de la muestra fiable. Está los más estrechamente relacionada posible con la *Listeria monocytogenes* de tipo salvaje. No interfiere con la reacción de detección principal mediante PCR en tiempo real y la realización de la reacción química subyacente para la detección del control es igual a la reacción principal. Adicionalmente, la aplicación de células de *Listeria monocytogenes* como CIPM permite cubrir la progresión completa de los métodos necesarios incluidos en la detección de patógenos alimentarios en la preparación de la muestra para la detección usando PCR en tiempo real.

- 25 Otro aspecto de la presente invención es el uso de *Listeria monocytogenes* genéticamente modificada como se especifica anteriormente para la detección y determinación cualitativa y/o cuantitativa de la presencia de *Listeria monocytogenes* de tipo salvaje en una muestra que se sospecha está contaminada con dicho microorganismo.

Preferiblemente, la muestra es una muestra de alimento, un líquido corporal, en especial sangre, plasma o suero, agua o una muestra de tejido.

- 30 Entre los ejemplos de muestras se incluyen, pero sin limitaciones, alimentos como leche de vaca, oveja, cabra, yegua, burra, camella, yak, búfala de agua y reno; productos lácteos; carne de vaca, cabra, oveja, cordero, cerdo, ancas de rana, ternera, roedor, caballo, canguro, aves de corral como pollo, pavo, pato, ganso, pichón o paloma, avestruz y emú; pescados como salmón y tilapia, y mariscos como moluscos, crustáceos y caracoles; productos cárnicos; productos vegetales; semillas; cereales de gramíneas como maíz, trigo, arroz, cebada, sorgo y mijo; cereales no de gramíneas como trigo sarraceno, amaranto y quinoa; legumbres como judías, cacahuets, guisantes y lentejas; frutos secos como almendras, nueces y piñones; semillas oleaginosas como girasol, colza y sésamo; vegetales como verduras de raíz como patata, yuca y nabo, verduras de hoja como amaranto, espinacas y col rizada, vegetales marinos como dulse, kombu y alaria, verduras de tallo, como brotes de bambú, nopales y espárragos, verduras de inflorescencia como alcachofa, brécol y lirio, verduras de fruto como calabaza, quimbombó y berenjena; frutas, hierbas y especias; sangre completa, orina, esputo, saliva, líquido amniótico, plasma, suero, lavado pulmonar y tejidos, incluyendo pero sin limitaciones, hígado, bazo, riñón, pulmón, intestino, cerebro, corazón, músculo, páncreas y similares. El experto en la materia apreciará que los lisados, los extractos o el material (homogeneizado) obtenidos a partir de cualquiera de los ejemplos de muestras anteriores o mezclas de dichos ejemplos de muestras o composiciones que comprendan uno o más de dichos ejemplos de muestras son también muestras que están dentro del alcance de la invención.

Se prefiere especialmente una muestra de alimento.

La muestra de alimento es preferiblemente un producto lácteo, preferiblemente leche, en especial leche sin procesar, leche en polvo, yogur, queso o helado, un producto pesquero, preferiblemente pescado crudo, un

producto cárnico, preferiblemente carne cruda, carne lavada o salchichas, ensalada lavada, huevo o productos con huevo, como mayonesa.

5 Las muestras de alimentos usados en el método según la presente invención especialmente preferidas son muestras que habitualmente se sabe contienen *Listeria monocytogenes* potencialmente patógena, como el queso.

Preferiblemente, la *Listeria monocytogenes* genéticamente modificada como se especifica anteriormente se usa como control interno del proceso de la muestra (CIPM) para un ensayo basado en PCR en tiempo real.

10 Según la presente invención, un CIPM es un organismo modelo añadido a la muestra original antes de la preparación de la muestra. Un CIPM proporciona una medida de la eficacia de la cadena analítica en su totalidad, desde la preparación de la muestra hasta la detección de la molécula diana, y cubre todos los pasos metódicos que son necesarios para la detección cuantitativa fiable de patógenos con PCR convencional o en tiempo real.

15 Un aspecto adicional de la presente invención es un método para la detección y determinación de la presencia de *Listeria monocytogenes* de tipo salvaje en una muestra que se sospecha está contaminada con dicho microorganismo patógeno, que comprende los siguientes pasos:

(a) añadir a dicha muestra una cantidad predefinida de células de la bacteria *Listeria monocytogenes* genéticamente modificada como se especifica anteriormente,

20 (b) incubar la muestra con una solución de extracción,

(c) aislar el ADN mediante métodos convencionales;

25 (d) aplicar la PCR en tiempo real, usando para ello (i) cebadores específicos para el locus *prfA* genómico de *Listeria monocytogenes* de tipo salvaje y la secuencia IAC de *Listeria monocytogenes* genéticamente modificada como se especifica anteriormente y (ii) una sonda oligonucleotídica marcada con fluorescencia que es capaz de hibridar específicamente con dicho locus *prfA* y una sonda oligonucleotídica marcada con fluorescencia que es capaz de hibridar específicamente con dicha secuencia IAC,

30 (e) determinar cualitativa y/o cuantitativamente las señales fluorescentes generadas en el paso (d), y

(f) determinar y/o calcular a partir del paso (e) la presencia y/o la cantidad de células de *Listeria monocytogenes* de tipo salvaje en la muestra original que se sospecha está contaminada con dicho microorganismo.

35 En el paso (a) se añade a la muestra una cantidad predefinida de células de la bacteria *Listeria monocytogenes* genéticamente modificada como se especifica anteriormente. La cantidad añadida a la muestra depende del tamaño de la muestra. Preferiblemente se añade una cantidad de 25 a 100 000 UFC (unidades formadoras de colonias) de *Listeria monocytogenes* genéticamente modificada a una muestra de por ejemplo 25 g. Se prefiere especialmente una cantidad de 100 a 5000 UFC en 25 g.

40 La unidad formadora de colonias (UCF) es una medida de células viables en una muestra. Se puede determinar mediante métodos de cultivo, por ejemplo, mediante extensión uniforme de la muestra sobre un gel de cultivo bacteriano. La incubación en las condiciones de cultivo adecuadas da lugar a la formación de colonias. El número de colonias representa el número de unidades formadoras de colonias en la muestra. Alternativamente, el recuento de células se puede determinar mediante recuento al microscopio de las células teñidas fluorescentes, por ejemplo usando el kit de viabilidad bacteriana Live/Dead® *BadLight*<sup>TM</sup> (Molecular Probes, Willow Creek, OR, EE. UU.) o métodos comerciales comparables.

45 La solución de extracción usada en el paso (b) es una solución acuosa o una solución tampón. Normalmente tiene un valor de pH superior a 5 e inferior a 9, preferiblemente superior a 6 e inferior a 8, más preferiblemente entre 6,5 y 7,5. La solución de extracción puede contener adicionalmente hasta el 20 % de uno o más solventes orgánicos miscibles con agua.

50

El tampón que se puede usar en el método de la presente invención se selecciona preferible a partir del grupo formado por tampón fosfato, solución salina tamponada con fosfato (PBS), tampón 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanediol (TRIS), solución salina tamponada con TRIS (TBS) y TRIS/EDTA (TE).

5 En una realización de la presente invención, la solución de extracción además contiene  $MgCl_2$  y/o un líquido iónico. El  $MgCl_2$ , en caso de estar presente, normalmente está presente en concentraciones de entre 0,05 y 3 M, preferiblemente entre 0,1 y 2 M, más preferiblemente entre 0,3 y 1 M.

En otra realización de la presente invención, la solución de extracción además contiene al menos un agente caotrópico y al menos un detergente.

10 El líquido iónico, en caso de estar presente, normalmente está presente en concentraciones de entre el 0,5 y el 20 % en peso, preferiblemente entre el 1 y el 10 % en peso, en función del peso de la mezcla. El líquido iónico puede ser un líquido iónico o una mezcla de dos o más líquidos iónicos. En una realización preferida, la solución de extracción contiene  $MgCl_2$  o líquido iónico.

15 Los líquidos iónicos usados en la presente invención son especies iónicas que constan de un catión orgánico y un anión generalmente inorgánico. No contienen ninguna molécula neutra y normalmente tienen puntos de fusión por debajo de 100 °C (373 K). Algunos artículos de revisión sobre líquidos iónicos son, por ejemplo, R. Sheldon "Catalytic reactions in ionic liquids", *Chem. Commun.*, 2001, 2399-2407; M.J. Earle, K.R. Seddon "Ionic liquids. Green solvent for the future", *Pure Appl. Chem.*, 72 (2000), 1391-1398; P. Wasserscheid, W. Keim "Ionische Flüssigkeiten – neue Lösungen für die Übergangsmetallkatalyse" [Líquidos iónicos: nuevas soluciones para la catálisis de metales de transición], *Angew. Chem.*, 112 (2000), 3926-3945; T. Welton "Room temperature ionic liquids. Solvents for synthesis and catalysis", *Chem. Rev.*, 92 (1999), 2071-2083 o R. Hagiwara, Ya. Ito "Room temperature ionic liquids of alkylimidazolium cations and fluoroanions", *J. Fluorine Chem.*, 105 (2000), 221-227.

En general, todos los líquidos iónicos de fórmula general  $K^+A^-$  conocidos por los expertos en la materia, en particular los que son miscibles con agua, son adecuados en el método según la invención.

25 Si está presente un líquido iónico o  $MgCl_2$ , en una realización preferida adicional, la solución de extracción no contiene detergente, es decir, no se añade a la solución de extracción detergente aniónico, zwitteriónico ni no iónico como dodecil sulfato sódico, CHAPS o Lutensol AO-7.

30 El término «agente caotrópico» como se usa en este documento, se refiere a una sustancia que afecta a una proteína o ácido nucleico, por ejemplo, pero sin limitaciones, alterando la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria de una proteína o un ácido nucleico, dejando intacta la estructura primaria. Entre los ejemplos de agentes caotrópicos se incluyen, pero sin limitaciones, clorhidrato de guanidina (GuHCl), tiocianato de guanidinio (GuSCN), tiocianato sódico (KSCN), yoduro sódico, perclorato sódico, urea y similares. Se pueden encontrar descripciones de agentes caotrópicos y sales caotrópicas por ejemplo en K. Hamaguchi y col. (Proc. Natl. Acad. Sci. [1962] 62:1129-1136)

35 Como se usa en este documento, el término «detergente» se refiere a moléculas que tienen características tanto lipófilas como hidrófilas (es decir, anfifílicas). Un detergente según la presente invención puede contener, por ejemplo, un resto de ácido graso y una parte hidrófila (p. ej., aniónica o catiónica).

40 Asimismo, es posible añadir a la solución de extracción una o más sustancias adicionales como agentes desestabilizantes o enzimas degradadoras de biopolímeros que ayudan a degradar sustancias presentes en muestras específicas. Un ejemplo es la adición de enzimas degradadoras de almidón para muestras de alimentos que contienen cantidades elevadas de colágeno y/o almidón.

La incubación normalmente se realiza a temperaturas de entre 18 °C y 50 °C, preferiblemente entre 25 °C y 45 °C, más preferiblemente entre 30 °C y 42 °C.

La muestra normalmente se incuba con la solución de extracción durante un tiempo de 10 minutos y 6 horas, preferiblemente entre 20 minutos y 1 hora.

Con el fin de facilitar la disolución de la muestra, dicha muestra puede, por ejemplo, homogeneizarse usando un Stomacher antes de su incubación con la solución de extracción. Además, la disolución se complementa y/o acelera cuando la mezcla se agita durante la incubación.

5 Pueden encontrarse métodos adicionales de extracción en Brehm-Stecher y col. (2009) Journal of Food Protection 72: 1774-1789.

Según la presente invención, el ADN del material bacteriano se aísla en el paso (c). Se pueden emplear varios métodos conocidos en la técnica para extraer el ADN, por ejemplo los métodos descritos en Sambrook y col. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

10 En general, la extracción de ADN comprende la lisis celular y la purificación del ADN mediante precipitación o la unión específica sobre diversos sustratos, como sílice.

La lisis celular puede realizarse mediante métodos convencionales, por ejemplo, mediante métodos enzimáticos, métodos con microesferas o combinaciones de los mismos. Preferiblemente se emplean métodos con detergente.

15 Son enzimas adecuadas para la lisis celular enzimática, por ejemplo, lisozima, lisostafina, zimolasa, celulasa, mutanolisina, glucanasas, proteasas y manasa.

Las microesferas adecuadas para romper las células son de vidrio, cerámica, zirconio o acero. Tras la adición de microesferas a las células se aplica agitación mecánica o magnética a la mezcla. Se puede aplicar agitación, por ejemplo, mediante un mezclador común de laboratorio tipo vórtex o una abrazadera especialmente diseñada.

20 Según la presente invención, un método adicional para la lisis celular es la sonicación. Este método implica la aplicación de ultrasonido (generalmente de 20 a 50 kHz) sobre la muestra.

La lisis celular a base de detergente da lugar a la rotura de la barrera lipídica que rodea a las células. Se pueden elegir detergentes adecuados entre detergentes no iónicos, zwitteriónicos e iónicos, por ejemplo, CHAPS, Triton® X o TWEEN®.

25 Se usan preferiblemente detergentes iónicos. Un ejemplo de detergente iónico adecuado es el SDS.

Además de la elección del detergente, otras consideraciones importantes para la lisis celular óptima son el tampón, pH, fuerza iónica y temperatura.

La solución de lisis normalmente tiene un valor de pH superior a 5 e inferior a 9, preferiblemente superior a 6 e inferior a 8, más preferiblemente entre 6,5 y 7,5.

30 El tampón que se puede usar se selecciona preferiblemente a partir del grupo formado por tampón fosfato, solución salina tamponada con fosfato (PBS), tampón 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanediol (TRIS), solución salina tamponada con TRIS (TBS) y TRIS/EDTA (TE).

35 Opcionalmente, se pueden añadir a la solución de lisis uno o más agentes quelantes para secuestrar cationes divalentes. Los quelantes adecuados son, por ejemplo, EDTA (ácido tetraacético etilendiamina), EGTA (ácido tetraacético de etilenglicol) o etilendiamina. Se usa preferiblemente EDTA.

Los métodos de lisis celular mencionados anteriormente van seguidos habitualmente de centrifugación para separar el ADN del material celular. Un experto en la materia puede determinar fácilmente los parámetros de centrifugación. Normalmente la centrifugación se realiza como se describe en Sambrook y col. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

40 Tras la lisis celular, el ADN generalmente se precipita añadiendo alcohol, preferiblemente etanol o isopropanol.

Adicionalmente, el ADN se puede proporcionar en una forma adecuada para la amplificación usando un kit de aislamiento de ADN disponible en el mercado, como el kit para tejido NucleoSpin® y el protocolo de soporte para

bacterias gram positivas (Machery-Nagel, Düren, Alemania) o el kit Nexttec® para el ADN genómico de bacterias (Nexttec GmbH Biotechnologie, Leverkusen, Alemania).

5 En una realización adicional de la presente invención, el material bacteriano se separa antes del aislamiento del ADN en el paso (c). Este paso adicional es especialmente preferido puesto que permite lograr una concentración más alta de ADN en la muestra para PCR resultante. La separación del material bacteriano se puede realizar mediante cualquier método conocido, como centrifugación, filtración, dielectroforesis y ultrasonidos o mediante unión por afinidad, por ejemplo, usando anticuerpos, lectinas, proteínas de unión víricas, aptómeros o péptidos antimicrobianos (AMP) que preferiblemente se inmovilizan sobre microesferas. Preferiblemente, las células se aíslan mediante filtración o centrifugación, más preferiblemente mediante centrifugación. La filtración de la muestra extraída se requiere en especial cuando la muestra compleja contiene material que es difícil de extraer o no se puede extraer con el método de la presente invención. Normalmente, estos materiales comprenden almidón y/o fibras. No obstante, el método preferido para el aislamiento de las células a partir de la mezcla de extracción es la centrifugación.

10 Dependiendo de la matriz de muestras, el paso de incubación puede repetirse una o varias veces, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o diez veces. Entre estos pasos de incubación, el material bacteriano y la matriz de muestras remanente pueden separarse del sobrenadante mediante, por ejemplo, centrifugación.

Después de la separación del material bacteriano, las células se lavan preferiblemente con agua, una solución tampón y/o soluciones que contienen detergente. El paso de lavado se puede repetir varias veces.

20 En el paso (d) de PCR, se aplica preferiblemente PCR en tiempo real. La PCR en tiempo real es un método para detectar y medir productos generados durante cada ciclo de una PCR, que son proporcionales a la cantidad de ácido nucleico molde previo al inicio de la PCR. La información obtenida, tal como la curva de amplificación, se puede utilizar para cuantificar la cantidad inicial de secuencia de ácido nucleico molde.

25 La detección preferiblemente se basa en la monitorización de la fluorescencia en cada ciclo a una temperatura establecida. La fluorescencia generalmente se monitoriza usando un dispositivo óptico para recopilar los datos a longitudes de onda de excitación y emisión específicas para el colorante fluorescente en concreto presente en la muestra. El ciclo al cual la fluorescencia procedente de la muestra sobrepasa el umbral de detección de fluorescencia por encima del fondo se denomina umbral de ciclo (Ct) y permite la cuantificación del molde de partida.

30 Las condiciones de la PCR no están especialmente restringidas, sino que se pueden seleccionar las condiciones óptimas para cada aparato de PCR. Por ejemplo, se pueden utilizar las siguientes condiciones:

- Desnaturalización térmica de ADN bicatenario a ADN monocatenario: el calentamiento generalmente se realiza a aproximadamente 90-98 °C, preferiblemente a aproximadamente 92-96 °C, en general durante aproximadamente 3 segundos a 1 minuto, preferiblemente durante aproximadamente 30 segundos a 1 minuto.

35 - Hibridación: el calentamiento generalmente se realiza a aproximadamente 40-70 °C, preferiblemente a aproximadamente 55-65 °C, en general durante aproximadamente 5 segundos a 2 minutos, preferiblemente durante aproximadamente 30 a 90 segundos.

- Reacción de elongación del ADN: el calentamiento generalmente se realiza a aproximadamente 60-75 °C, preferiblemente a aproximadamente 70-74 °C, en general durante aproximadamente 10 segundos a 3 minutos, preferiblemente durante aproximadamente 30 segundos a 2 minutos.

40 - Concentración de iones Mg en el líquido de reacción: en general aproximadamente 1-5 mM, preferiblemente aproximadamente 1,5-3,5 mM.

Esta reacción se realiza normalmente en 20-50 ciclos aproximadamente, preferiblemente en 45 ciclos aproximadamente, por lo cual se puede amplificar el ADN diana hasta un nivel detectable.

Se puede utilizar cualquier aparato de PCR en tiempo real comercial.

Según el paso (d)(i) del método de la presente invención, se usan los cebadores específicos del locus *prfA* genómico de *Listeria monocytogenes* de tipo salvaje y la secuencia IAC de *Listeria monocytogenes* genéticamente modificada como se define anteriormente.

5 En general, el término «cebador» se refiere a una molécula corta de ácido nucleico, como un oligonucleótido de ADN de 9 nucleótidos o más de longitud, que es complementaria a una sección de la cadena de ácido nucleico diana, es decir, el locus *prfA* genómico y la secuencia IAC, en donde el propósito del cebador es iniciar la replicación de ácido nucleico de un ácido nucleico más largo a lo largo de la cadena. Según la presente invención, se prefieren cebadores de 15 a 40 nucleótidos. En la presente invención, el término «cebadores» se usa para el par de cebadores que flanquean la secuencia diana que se desea amplificar.

10 Preferiblemente, los cebadores usados en el paso (d)(i) son Lip1 y Lip2.

La secuencia de Lip1 es: 5'-GAT ACA GAA ACA TCG GTT GGC-3' (SEC ID N.º 2) y la secuencia de Lip2 es: 5'-GTG TAA TCT TGA TGC CAT CAG G-3' (SEC ID N.º 3).

15 Según el paso (d)(ii) del método de la presente invención, se usa una sonda oligonucleotídica marcada con fluorescencia que es capaz de hibridar específicamente con dicho locus *prfA* y una sonda oligonucleotídica marcada con fluorescencia que es capaz de hibridar específicamente con dicha secuencia IAC.

Según la presente invención, el término «hibridar específicamente» significa unirse de forma específica y detectable. Los polinucleótidos, oligonucleótidos y fragmentos de los mismos hibridan selectivamente con las cadenas de ácido nucleico en condiciones de hibridación que minimizan las cantidades apreciables de unión detectable a ácidos nucleicos inespecíficos.

20 Un oligonucleótido marcado con fluorescencia es un oligonucleótido que tiene un fluoróforo unido covalentemente. Un fluoróforo es un compuesto químico que cuando se excita mediante su exposición a una longitud de onda de luz en concreto, emite luz (fluorescencia), por ejemplo a una longitud de onda de luz diferente.

25 Preferiblemente, las sondas oligonucleotídicas que son capaces de hibridar específicamente con dicho locus *prfA* y dicha secuencia IAC tiene diferentes fluoróforos que emiten luz a diferentes longitudes de onda. Esto permite la detección de una sonda independientemente de la otra.

Las sondas marcadas con fluorescencia usadas normalmente para PCR en tiempo real son, por ejemplo, sondas (de hibridación) LightCycler, balizas moleculares o sondas de hidrólisis (también denominadas sondas TaqMan®). Se usan preferiblemente sondas de hidrólisis.

30 Las sondas LightCycler utilizan la técnica de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). Para este método se usan dos sondas oligonucleotídicas diferentes unidas a un donador FRET y un aceptor FRET, respectivamente, para cada secuencia diana. Estas secuencias se unen lado a lado a la secuencia diana, aproximando los fluoróforos.

35 Las balizas moleculares (Tyagi y col., Nat. Biotechnol. 14:303-8, 1996) son sondas oligonucleotídicas unidas a un fluoróforo indicador y a un amortiguador. Los nucleótidos del extremo 5' son complementarios a los nucleótidos del extremo 3', formando una estructura tallo-bucle. Debido a la proximidad del fluoróforo y del amortiguador, no se observa fluorescencia. La hibridación de la sonda con la secuencia diana durante la PCR en tiempo real da lugar a un aumento de la distancia indicador-amortiguador que tiene como resultado la fluorescencia del indicador.

40 Preferiblemente se usan sondas de hidrólisis (sondas TaqMan®) (Lee y col., Nucleic Acids Res. 21:3761-6, 1993). Estas sondas utilizan también la técnica de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). Las sondas tienen un indicador de fluorescencia en un extremo y un amortiguador de fluorescencia en el extremo opuesto. Debido a la estrecha proximidad entre el indicador y el amortiguador, la detección de la fluorescencia del indicador se suprime. Durante la fase de hibridación de la PCR, ambos cebadores y la sonda hibridan con el ADN diana. La polimerización de una nueva cadena de ADN da lugar a la degradación de la sonda por la actividad 5'-3' exonucleasa de la polimerasa y la separación física entre el indicador de fluorescencia y el amortiguador, lo que resulta en un aumento de la fluorescencia. La fluorescencia se puede detectar y medir en el termociclador de PCR en tiempo real y se utiliza su incremento geométrico

correspondiente al incremento exponencial del producto para determinar el umbral del ciclo (Ct) en cada reacción (véase a continuación).

5 Entre los ejemplos de indicadores se incluyen, aunque sin limitaciones: 6-carboxifluoresceína; carboxifluoresceína (FAM); difluoruro de dipirrometano de boro (BODIPY); acridina, estilbena, 6-carboxifluoresceína (HEX), TET (tetrametil fluoresceína), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), rodamina-6G, rojo Texas, 2',7'-dimetoxi-4',5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), Cy@3, Cy@5, VIC® (Applied Biosystems), LC Red 640, LC Red 705, rojo Texas, Yakima Yellow®, así como derivados de los mismos. En la presente invención se usa preferiblemente un indicador seleccionado entre FAM y HEX.

10 Entre los ejemplos de amortiguadores se incluyen, aunque sin limitaciones, Black Hole Quenchers (documento WO 01/86001 A1) como BHQ1™ y BHQ2™, MGB (ligando de unión al surco menor, documento EP 0819133 B1), N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA), Eclipse® Dark Quencher, DABCYL, DABSYL, DDQ I y DDQ II. Según la presente invención se usan preferiblemente los amortiguadores MGB o BHQ1™.

15 Un experto en la materia puede elegir fácilmente una combinación indicador-amortiguador adecuada. Normalmente es necesario que el espectro de absorción del amortiguador tenga un buen solapamiento con el espectro de emisión del indicador para permitir una amortiguación óptima.

Preferiblemente, la sonda marcada con fluorescencia que hibrida con la secuencia IAC del paso (d)(ii) es pLucLm4 (SEC ID N.º 4) como se describe en Rossmanith y col. (2006) Res. Microbiol. 157, 763-771. La sonda marcada con fluorescencia que hibrida con el locus *prfA* es preferiblemente LipProbe (SEC ID N.º 5).

20 La sonda marcada con fluorescencia pLucLm4 tiene preferiblemente HEX como fluoróforo indicador y BHQ1™ como amortiguador.

La sonda marcada con fluorescencia LipProbe tiene preferiblemente FAM como indicador y MGB como amortiguador.

25 Según la presente invención, las señales fluorescentes generadas en el paso (d) se determinan cualitativamente y/o cuantitativamente en el paso (e).

La detección preferiblemente se basa en la monitorización de la fluorescencia en cada ciclo a una temperatura establecida. La fluorescencia generalmente se monitoriza usando un dispositivo óptico para recopilar los datos a longitudes de onda de excitación y emisión específicas para los fluoróforos en concreto presentes en la muestra.

30 En el paso (f) se determina y/o calcula a partir del paso (e) la presencia y/o cantidad de células de *Listeria monocytogenes* de tipo salvaje en la muestra original que se sospecha está contaminada con dicho microorganismo.

La presencia de células de *Listeria monocytogenes* de tipo salvaje en la muestra original normalmente se calcula determinando cualitativamente las señales fluorescentes del paso (e).

35 La cantidad de células de *Listeria monocytogenes* en la muestra original normalmente se calcula mediante los siguientes pasos:

40 - Calculando la cantidad inicial de ADN por medio de las copias de ADN de *Listeria monocytogenes* genéticamente modificada y *Listeria monocytogenes* de tipo salvaje mediante el uso del método Ct (método de umbral) basado en la señal de fluorescencia correspondiente después de la amplificación por PCR en tiempo real. El método de umbral se basa en la comparación de la correspondiente señal de la muestra estudiada con un patrón de calibración (Kaltenböck y col. [2005], *Advances in Clinical Chemistry* 40: 219-259).

45 - Calculando la pérdida durante el procedimiento analítico (que comprende la preparación de la muestra, la purificación y aislamiento del ADN y la PCR en tiempo real según los pasos (b), (c) y (d) del método de la presente invención) en función del valor inicial conocido de células de *Listeria monocytogenes* genéticamente modificada dentro de la muestra y el valor de células obtenido por el método Ct después de la PCR en tiempo real.

- Calculando el número de células de *Listeria monocytogenes* de tipo salvaje presentes en la muestra que se sospecha está contaminada con dicho microorganismo en función de la pérdida calculada de células de *Listeria monocytogenes* genéticamente modificada durante el procedimiento analítico.

5 El método de la presente invención es ventajoso puesto que el uso de *Listeria monocytogenes* como control interno del proceso de la muestra (CIPM) para la detección de patógenos mediante biología molecular proporciona la máxima semejanza con el organismo diana y por tanto la máxima aplicabilidad para la detección de patógenos bacterianos. Incluso una especie estrechamente relacionada como es *Listeria innocua* daría lugar a un control interno no competitivo que requeriría un segundo par de cebadores durante la PCR en tiempo real. El sencillo uso de un CIPM basado en ADN derivado de un IAC existente, desde el mismo inicio del proceso de  
10 detección, tampoco cumpliría el prerequisite de máxima semejanza del control y la diana. Por otro lado, la mayoría del ADN se perdería durante los distintos pasos metódicos antes de la detección mediante PCR.

Un aspecto adicional de la presente invención es un kit para su uso en un ensayo para la detección y determinación de *Listeria monocytogenes* de tipo salvaje en una muestra que se sospecha está contaminada con dicho microorganismo, que comprende al menos en uno o más envases:

15 (i) *Listeria monocytogenes* genéticamente modificada como se especifica anteriormente;

(ii) los cebadores específicos del locus genómico *prfA* de *Listeria monocytogenes* de tipo salvaje y la secuencia IAC de *Listeria monocytogenes* genéticamente modificada según se especifica anteriormente; y

(iii) una sonda oligonucleotídica marcada con fluorescencia que es capaz de hibridar específicamente con dicho locus *prfA* y una sonda oligonucleotídica marcada con fluorescencia que es capaz de hibridar específicamente  
20 con dicha secuencia IAC.

Preferiblemente, los cebadores del kit son Lip1 (SEC. ID N.º 2) y Lip2 (SEC ID N.º 3).

Las sondas marcadas con fluorescencia son preferiblemente pLucLm4 (SEC ID N.º 4) para la detección de la secuencia IAC y LipProbe (SEC ID N.º 5) para la detección del locus *prfA*.

Según la presente invención, el kit puede contener adicionalmente una solución de extracción.

25 Otro aspecto de la presente invención es un método para la fabricación de una bacteria *Listeria monocytogenes* genéticamente modificada como se especifica anteriormente que comprende los siguientes pasos:

(a) deleccionar el locus genómico del factor de transcripción PrfA de la especie bacteriana *Listeria monocytogenes*,

(b) clonar un vector que contiene un IAC,

30 (c) transformar la especie bacteriana del paso (a) con el vector del paso (b).

La delección del locus genómico de PrfA según el paso (a) se realiza mediante procedimientos conocidos en la técnica y que pueden realizarse, por ejemplo, como se describe en Böckmann y col. (1996) Mol. Microbiol. 22, 643-653. En principio, se construye un plásmido *knock-out*. Las células de *Listeria monocytogenes* se transforman con este plásmido. El cruzamiento da lugar a la escisión del gen *prfA*. El organismo resultante se  
35 denomina también *Listeria monocytogenes*  $\Delta$ -*prfA*.

Las condiciones óptimas de cultivo para las bacterias *Listeria monocytogenes* pueden ser determinadas fácilmente por un experto en la materia. Normalmente, las bacterias se crecen en TSB-Y (medio de cultivo de soja triptona con extracto de levadura) a 37 °C con aireación.

En el paso (b) se obtiene un vector que contiene el IAC.

40 Las cantidades adecuadas de la secuencia IAC para clonación se producen normalmente mediante la amplificación de la secuencia por medio de PCR convencional (Rossmannith y col. [2006] Res. Microbiol. 157, 763-771). Los cebadores utilizados para la PCR normalmente comprenden sitios de restricción para enzimas de

restricción especiales que permiten la integración posterior en el vector. Para una secuencia IAC según la SEC ID N.º 1 se usan preferiblemente los cebadores modificados LipBam (SEC ID N.º 6) y LipSal (SEC ID N.º 7) que contienen los sitios de restricción BamHI y Sall, respectivamente.

La secuencia de LipBam es: 5'GCG CGG ATC CGA TAC AGA AAC ATC GGT TGG C'3 (SEC ID N.º 6).

5 La secuencia de LipSal es 5'GCG CGT CGA CGT GTA ATC TTG ATG CCA TCA GG'3 (SEC ID N.º 7).

Tras la purificación del producto de amplificación se lleva a cabo la digestión con enzimas de restricción, la desfosforilación y el ligamiento con un vector de integración adecuado.

10 La digestión con enzimas de restricción se realiza normalmente mediante la incubación del producto de amplificación con enzimas de restricción disponibles en el mercado correspondientes a los sitios de restricción de los cebadores usados para la PCR. Preferiblemente se usan BamHI y Sall.

15 La desfosforilación de los fragmentos IAC se puede realizar mediante la incubación con una fosfatasa adecuada, por ejemplo, fosfatasa alcalina termosensible Fast AP<sup>TM</sup> (Fermentas). Un experto en la materia puede elegir fácilmente un vector de integración adecuado. El vector contiene una secuencia génica que otorga resistencia a un antibiótico al que es sensible la cepa bacteriana receptora que se pretende (p. ej., cloranfenicol) para permitir la posterior selección de los clones positivos. Preferiblemente, se usa un vector de inserción basado en fago, por ejemplo pPL1 o pPL2 como se describe en Lauer y col. (2002) J. Bacteriol. 184, 4177-4186. Se prefiere especialmente el vector de inserción basado en fago pPL2 (6123 pb) puesto que proporciona una inserción estable de una copia única dentro del genoma de *Listeria monocytogenes*.

20 Se pueden producir cantidades adecuadas del vector de inserción amplificando el vector en una bacteria, por ejemplo en *E. coli* TOP10F', y el posterior aislamiento, digestión con enzimas de restricción y desfosforilación como se describe anteriormente. Normalmente, los sitios de restricción se pueden encontrar en un sitio de clonación múltiple (SCM) del vector.

El ligamiento se realiza normalmente mediante la adición de una ADN ligasa, por ejemplo ADN ligasa T4 disponible en Fermentas.

25 Una bacteria adecuada, por ejemplo *E. coli* TOP10F', se transforma con el vector resultante para su amplificación y para la selección de los clones positivos. Esta selección se realiza normalmente sembrando la bacteria en un medio que contenga el antibiótico mencionado anteriormente.

30 En el paso (c) el vector del paso (b) se transfiere dentro de las células de *Listeria monocytogenes* del paso (a). La transformación se puede realizar usando los distintos métodos bien conocidos en la técnica. Ejemplos de estos son la transformación mediante choque térmico o la electroporación. Preferiblemente, la transformación se realiza mediante electroporación.

35 La transformación mediante choque térmico se realiza enfriando las células en presencia de cationes divalentes como Ca<sup>2+</sup> (en CaCl<sub>2</sub>) o Rb<sup>2+</sup> (RbCl<sub>2</sub>) lo que prepara la membrana celular para hacerse permeable al ADN del plásmido. Las células se incuban en hielo con el ADN y a continuación se someten brevemente a un choque térmico (generalmente a 41-43 °C durante 30 a 120 segundos).

Para la electroporación, las células se someten a un breve choque con un campo ecléctico de 10-25 kV/cm. Preferiblemente, la electroporación se realiza según Park y col. (1990) Gene 94, 129-132.

40 Tras clonarlo con éxito, el organismo resultante puede ser analizado. La inserción con éxito del vector en el genoma de *Listeria monocytogenes* Δ-*prfA* se puede analizar mediante amplificación del fragmento de 499 pb por medio de PCR (según Lauer y col. [2002] J. Bacteriol. 184, 4177-4186) y secuenciación.

45 La inserción de una única copia de IAC en el genoma de *Listeria monocytogenes* Δ-*prfA* se puede verificar mediante la comparación con las cantidades de ADN genómico de *Listeria monocytogenes* transformada medidas mediante espectroscopía UV/VIS con los datos obtenidos tras la PCR en tiempo real en comparación con los datos de la bacteria de tipo salvaje, en función del tamaño conocido del genoma de *Listeria* (Nelson y col. [2004] Nucleic Acids Res. 32, 2386-2395).

La presente invención se ilustra además mediante las siguientes figuras y ejemplos sin que, no obstante, se vea restringida por los mismos.

**Figura 1. Confirmación de pPL2-IAC, *E. coli* y *L. monocytogenes* EGDe IAC+,  $\Delta$ -*prfA*** (según los ejemplos 1.4 y 1.6). (A) Amplificación mediante PCR en tiempo real de pPL2-IAC, los clones de *E. coli* después de la transformación y el aislamiento del plásmido usando como diana el IAC artificial dentro del plásmido. Las curvas de amplificación de la izquierda incluyen la preparación del plásmido como diana. Las curvas de amplificación de la derecha (ss IAC) representan la función de calibración (eficiencia: 96,8 %;  $R^2$ : 0,999). (B) Amplificación mediante PCR en tiempo real de clones de *L. monocytogenes* EGDe IAC+,  $\Delta$ -*prfA* usando como diana el IAC artificial dentro del genoma para confirmar la integración del vector pPL2-IAC dentro del genoma de *Listeria* (eficiencia: 96,0 %;  $R^2$ : 0,999). Las curvas de amplificación de la izquierda incluyen el ADN genómico de cuatro clones de *L. monocytogenes* EGDe IAC+,  $\Delta$ -*prfA* como diana.

**Figura 2. Confirmación de la integración positiva de pPL2-IAC en el genoma de *Listeria* y confirmación de la cepa *L. monocytogenes* EGDe IAC+,  $\Delta$ -*prfA* mediante PCR convencional** (según el ejemplo 1.6.). (A) Gel de agarosa de las cepas clonadas, confirmadas como *L. monocytogenes*. M: marcador; 1: *L. ivanovii*, *L. seeligeri* y *L. welshimeri*; 2: *L. innocua*; 3: *L. monocytogenes*; 4: *L. grayi*; 5-8: cuatro clones de *L. monocytogenes* EGDe IAC+,  $\Delta$ -*prfA*. (B) Confirmación de *L. monocytogenes* EGDe IAC+,  $\Delta$ -*prfA* amplificando el gen de ARNr 16S específico de todas las especies de *Listeria* y el gen *hly* específico de *L. monocytogenes*. 9: *L. sp.*; 10: *L. monocytogenes*; 11-14: cuatro clones de, *L. monocytogenes* EGDe IAC+,  $\Delta$ -*prfA*. (C) Confirmación de la integración de pPL2-IAC en el genoma de la cepa de *L. monocytogenes* EGDe  $\Delta$ -*prfA*. 1-4: cuatro clones de *L. monocytogenes* EGDe IAC+,  $\Delta$ -*prfA*. El fragmento resultante de 499 pb después de la PCR indica la integración. Los productos de PCR se separan en un gel de agarosa al 1 % y se tiñen con bromuro de etidio.

Las memorias descriptivas completas de todas las solicitudes, patentes y publicaciones citadas anteriormente y a continuación se incorporan por referencia.

## 1. Ejemplos:

Los siguientes ejemplos describen aplicaciones prácticas de la invención.

**1.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.** *L. monocytogenes* EGDe (1/2a, número interno 2964) es parte de la colección de cepas bacterianas del Instituto de Higiene de la Leche, Tecnología de la Leche y Ciencia de los Alimentos, Departamento de Salud Pública Veterinaria y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Medicina Veterinaria de Viena, Austria (IMML). *L. monocytogenes* EGDe (1/2a)  $\Delta$ -*prfA* es parte de la colección de cepas bacterianas del Departamento de Microbiología del Instituto Theodore Boveri, Universidad de Würzburg, Würzburg, Alemania. Las bacterias *E. coli* TOP10F' electrocompetentes están disponibles en Invitrogen (Carlsbad, CA, EE. UU.). Todas las bacterias se mantienen a -80 °C usando la tecnología MicroBank™ (Pro-Lab Diagnostics, Richmond Hill, Canadá).

La determinación de la densidad óptica de los cultivos bacterianos se realiza a 600 nm ( $DO_{600}$ ) por duplicado con un espectrofotómetro HP 8452 (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, EE. UU.). La siembra selectiva de *L. monocytogenes* EGDe de tipo salvaje y de *L. monocytogenes* EGDe IAC+,  $\Delta$ -*prfA* se realiza en RAPID'L.mono (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Alemania), OCLA (agar cromogénico para *Listeria* Oxoid; Oxoid, Hampshire, Reino Unido), PALCAM (Solabia Biokar Diagnostics, Pantin Cedex, Francia) y agar sangre (Biomerieux, Marcy l'Etoile, Francia) ya sea mediante el estriado de 100  $\mu$ l de cultivo bacteriano en placas o mediante la técnica del asa de siembra.

La enumeración de las suspensiones bacterianas se realiza usando el método de recuento en placa o con el kit de viabilidad bacteriana Live/Dead® BacLight™ (Molecular Probes, Willow Creek, OR, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante.

**1.2. Oligonucleótidos, plásmidos y reacciones enzimáticas.** Las secuencias de oligonucleótidos y los plásmidos se presentan en la tabla 1. Los cebadores para la PCR convencional y en tiempo real, así como la sonda marcada con HEX pLucm4 están disponibles en MWG Biotech (Ebersberg, Alemania); la sonda Lip modificada con MGB es de Applied Biosystems (Foster City, CA, EE. UU.). La diana artificial de 100 pb para el IAC está sintetizada por VBC Genomics (Viena, Austria). El vector de inserción basado en fago pPL2 se obtiene según Lauer y col. (2002) J. Bacteriol. 184, 4177-4186.

TABLA 1.

Secuencias de oligonucleótidos y cebadores y organismos

Oligonucleótidos	Secuencia / Marcado		Ref. / Fuente
Lip 1	Cebador sentido <sup>a</sup>	5'-GAT ACA GAA ACA TCG GTT GGC-3'	D'Agostino et al., 2004
Lip 2	Cebador complementario <sup>a</sup>	5'-GTG TAA TCT TGA TGC CAT CAG G-3'	D'Agostino et al., 2004
Lip Bam	Cebador sentido <sup>b</sup>	5'GCG CGG ATC CGA TAC AGA AAC ATC GGT TGG C'3	SEQ ID NO: 6
Lip Sal	Cebador complementario <sup>c</sup>	5'GCG CGT CGA CGT GTA ATC TTG ATG CCA TCA GG'3	SEQ ID NO: 7
LipProbe	Sonda de unión al locus <i>prfA</i> <sup>c</sup>	FAM-CAG GAT TAA AAG TTG ACC GCA-MGB	Rossmannith et al., 2006, SEQ ID NO: 5
pLucLm 4	Sonda de unión a la diana artificial	HEX-TTC GAA ATG TCC GTT CGG TTG GC-BHQ1	Rossmannith et al., 2006, SEQ ID NO: 4
IAC	Diana artificial	5'-GAT ACA GAA ACA TCG GTT GGC GTA TTC GAA ATG TCC GTT CGG TCG CTA TGA AGA GAT ACG CGG TGG AAC CTG GAA CCT GAT GGC ATC AAG ATT ACA C-3'	Rossmannith et al., 2006, SEQ ID NO: 1
NC 16	Confirmación de la inserción de pPL2	5'-GTC AAA ACA TAC GCT CTT ATC-3'	Lauer et al., 2002
PL 95	Confirmación de la inserción de pPL2	5'-ACA TAA TCA GTC CAA AGT AGA TGC-3'	Lauer et al., 2002
Sequ. 1 (NC 16)	Confirmación de la inserción de pPL2	Secuencia incluida en la tabla 1A	Este trabajo
Sequ. 2 (PL 95)	Confirmación de la inserción de pPL2	Secuencia incluida en la tabla 1A	Este trabajo
Especie / Plásmido	Cepa		
<i>L. monocytogenes</i>	EGDe (1/2a)	Cepa de tipo salvaje detectada mediante PCR en tiempo real para <i>prfA</i>	IMML <sup>d</sup> cepa N°. 2964
<i>L. monocytogenes</i> $\Delta$ diana	EGDe (1/2a) $\Delta$ <i>prfA</i>	Cepa <i>L. monocytogenes</i> EGDe con delección total del locus <i>prfA</i>	Böckmann et al., 1996
<i>E. coli</i> TOP10F'	-	<i>E. coli</i> químicamente competente	Invitrogen
Vector de inserción basado en fago pPL2	Específico para <i>L. monocytogenes</i>	Sitio de integración PSA. Integrantes de copia única estables: $-10^4$ /células donadoras.	Lauer et al., 2002

<sup>a</sup> Específico para *L. monocytogenes* de tipo salvaje

<sup>b</sup> Cebador que contiene el sitio de restricción BamHI.

<sup>c</sup> Cebador que contiene el sitio de restricción Sall.

<sup>d</sup> IMML: Instituto de Higiene de la Leche, Tecnología de la Leche y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Medicina Veterinaria

# ES 2 539 970 T3

TABLA 1 A. Secuencias e informes Blast del análisis de los productos de amplificación de la PCR según Lauer y col., 2002

Nombre / Cebador	Informe Blast	Referencia <sup>a</sup>	Secuencia <sup>b</sup>
Secuencia 1 Clon 1/NC16	Identicidades = 210/210 (100%), Huecos = 0/210 (0%), Cadena= más/más	emb AJ417449.2 Vector de integración lanzadera pPL2	ANNANNNACGTATCCAGTTCGATTTCATGGACCGAGATGAC AACGAACTAACAGACCTAACCCAAACCTTCCCATTAAACGAAG CGTAACTAGGTCAAAGACACCCGAAAAAGAAAAATGCAT AACTTAAAGAAAACCTTGACAAACAAGCGATTAAACATA AAATGGTATTTGGCTGTTGAAAAGACAGTGCCATTTGTCCTG ATAGCTCAGCTGGATAGAGCAACGGCCTTAAAGCCGTCGGT CGGGGGTTCGAATCCCTCTCAGGACGTTAAATAGTAATGTAA AGAAATCTCTAAAACGTTGAAAAGCCTTGATATTAAGGGCG GATGAATGTTTTGGAGTTTTTTTTATATCGTATAATACCCGTT TTATCCGTTGTTTTGTTGGCATTGTTGTAATAATTTGGGTA TTTTCATCTGTTTTAGTGTGAAAAAGCATCTACTTTGGACT GATTATGGTAAAACCACTTGGATGGATAAGGTGATCT CCATTGGAGAGATATGTGCCACCACTACTTACGGATGATT AG
		emb AL591978.1 Cepa <i>Listeria mono-</i> <i>cytogenes</i> EGD, genoma completo, segmento 6/12	GGNNTGAAACGNNCAGTTCGATTTCATGGACCGAGATGAC AACGAACTAACAGACCTAACCCAAACCTTCCCATTAAACGAAG CGTAACTAGGTCAAAGACACCCGAAAAAGAAAAATGCAT TAACTTAAAGAAAACCTTGACAAACAAGCGATTAAACATA AAATGGTATTTGGCTGTTGAAAAGACAGTGCCATTTGTCCTG ATAGCTCAGCTGGATAGAGCAACGGCCTTAAAGCCGTCGGT CGGGGGTTCGAATCCCTCTCAGGACGTTAAATAGTAATGTAA AGAAATCTCTAAAACGTTGAAAAGCCTTGATATTAAGGGCG GATGAATGTTTTGGAGTTTTTTTTATATCGTATAATACCCGTT TTATCCGTTGTTTTGTTGGCATTGTTGTAATAATTTGGGTA TTTTCATCTGTTTTAGTGTGAAAAAGCATCTACTTTGGACT GATTATGGTAAAACCACTTGGATGGATAAGGGGACA TCCATTGGAGAGATATGTANCCCTTTGGAGGACTGATG AGG
Secuencia 1 Clon 1/NC16	Identicidades = 210/210 (100%), Huecos = 0/210 (0%), Cadena= más/más	emb AJ417449.2 Vector de integración lanzadera pPL2	GGNNTGAAACGNNCAGTTCGATTTCATGGACCGAGATGAC AACGAACTAACAGACCTAACCCAAACCTTCCCATTAAACGAAG CGTAACTAGGTCAAAGACACCCGAAAAAGAAAAATGCAT TAACTTAAAGAAAACCTTGACAAACAAGCGATTAAACATA AAATGGTATTTGGCTGTTGAAAAGACAGTGCCATTTGTCCTG ATAGCTCAGCTGGATAGAGCAACGGCCTTAAAGCCGTCGGT CGGGGGTTCGAATCCCTCTCAGGACGTTAAATAGTAATGTAA AGAAATCTCTAAAACGTTGAAAAGCCTTGATATTAAGGGCG GATGAATGTTTTGGAGTTTTTTTTATATCGTATAATACCCGTT TTATCCGTTGTTTTGTTGGCATTGTTGTAATAATTTGGGTA TTTTCATCTGTTTTAGTGTGAAAAAGCATCTACTTTGGACT GATTATGGTAAAACCACTTGGATGGATAAGGGGACA TCCATTGGAGAGATATGTANCCCTTTGGAGGACTGATG AGG
		emb AL591978.1 Cepa <i>Listeria mono-</i> <i>cytogenes</i> EGD, genoma completo, segmento 6/12	NNAANNNGTATCCAGTTCGATTTCATGGACCGAGATGACAA GAACTAACAGACCTAACCCAAACCTTCCCATTAAACGAAGCGT AACTAGGTCAAAGACACCCGAAAAAGAAAAATGCAATA CTTAAAGAAAACCTTGACAAACAAGCGATTAAACATA ATGGTATTTGGCTGTTGAAAAGACAGTGCCATTTGTCCTGAT AGCTCAGCTGGATAGAGCAACGGCCTTAAAGCCGTCGGT GGGGTTCGAATCCCTCTCAGGACGTTAAATAGTAATGTAAAG AAATCTCTAAAACGTTGAAAAGCCTTGATATTAAGGGCGGA TGAATGTTTTGGAGTTTTTTTTATATCGTATAATACCCGTTT ATTCCGTTGTTTTGTTGGCATTGTTGTAATAATTTGGGTA TTTTCATCTGTTTTAGTGTGAAAAAGCATCTACTTTGGCTGAT TATGGTAAATCCACTACTTTGAATGGATAAGGTGATCTCCA TTGGAGAGAGATATGTATCTACTTTGAGGGATGATGATGT ACCACCTAGGTTGGACTGAATAGGTCCTTCTTCCGATTA AACACGGGATAAAGTA
Secuencia 1 Clon 1/NC16	Identicidades = 209/210 (99%), Huecos = 1/210 (0%), Cadena= más/más	emb AJ417449.2 Vector de integración lanzadera pPL2	NNNNTNNAAGTATCCAGTTCGATTTCATGGACCGAGATGA CACGAACTAACAGACCTAACCCAAACCTTCCCATTAAACGAAG CGTAACTAGGTCAAAGACACCCGAAAAAGAAAAATGCAT TAACTTAAAGAAAACCTTGACAAACAAGCGATTAAACATA AAATGGTATTTGGCTGTTGAAAAGACAGTGCCATTTGTCCTG ATAGCTCAGCTGGATAGAGCAACGGCCTTAAAGCCGTCGGT CGGGGGTTCGAATCCCTCTCAGGACGTTAAATAGTAATGTAA AGAAATCTCTAAAACGTTGAAAAGCCTTGATATTAAGGGCG GATGAATGTTTTGGAGTTTTTTTTATATCGTATAATACCCGTT TTATCCGTTGTTTTGTTGGCATTGTTGTAATAATTTGGGTA TTTTCATCTGTTTTAGTGTGAAAAAGCATCTACTTTGGCTGAT TATGGTAAATCCACTACTTTGAATGGATAAGGTGATCTCCA TTGGAGAGAGATATGTATCTACTTTGAGGGATGATGATGT ACCACCTAGGTTGGACTGAATAGGTCCTTCTTCCGATTA AACACGGGATAAAGTA
		emb AL591978.1 Cepa <i>Listeria mono-</i> <i>cytogenes</i> EGD, genoma completo, segmento 6/12	NNNNTNNAAGTATCCAGTTCGATTTCATGGACCGAGATGA CACGAACTAACAGACCTAACCCAAACCTTCCCATTAAACGAAG CGTAACTAGGTCAAAGACACCCGAAAAAGAAAAATGCAT TAACTTAAAGAAAACCTTGACAAACAAGCGATTAAACATA AAATGGTATTTGGCTGTTGAAAAGACAGTGCCATTTGTCCTG ATAGCTCAGCTGGATAGAGCAACGGCCTTAAAGCCGTCGGT CGGGGGTTCGAATCCCTCTCAGGACGTTAAATAGTAATGTAA AGAAATCTCTAAAACGTTGAAAAGCCTTGATATTAAGGGCG GATGAATGTTTTGGAGTTTTTTTTATATCGTATAATACCCGTT TTATCCGTTGTTTTGTTGGCATTGTTGTAATAATTTGGGTA TTTTCATCTGTTTTAGTGTGAAAAAGCATCTACTTTGGCTGAT TATGGTAAATCCACTACTTTGAATGGATAAGGTGATCTCCA TTGGAGAGAGATATGTATCTACTTTGAGGGATGATGATGT ACCACCTAGGTTGGACTGAATAGGTCCTTCTTCCGATTA AACACGGGATAAAGTA

TABLA 1A. Cont.

Secuencia 1 Clon 1/PL95	Identidades = 172/176 (97%), Huecos = 3/176 (1%), Cadena= más/menos	emb AJ417449.2 Vector de integración lanzadera pPL2	NNNNNAAAAACGNATGAAATACCACAAATTTTACCACAA ATGCCAAAAACAACGGAATAAACGGGTATTATACGATA TAAAAAAACTCCAAAACATTCATCCGCCCTTTAATATCAAG GCTTTTCAACGTTTTAAAGATTTCTTTACATTACTATTTAACG TCCTGAGAGGGATTGAAACCCCGACCGACGGCTTAAAGG CCGTTGCTATCCAGCTGAGCTATCAGGACAAATGGCACTG TCTTTTCAACAGCCAAATACCATTTTATGTTTAAATCGCTTGT TTGCAATGGTTTTCTTAAAGTATTGCATTTTTCTTTTTCG GGTGTCTTTTGACCTATTTACGCTTCGTTAATGGGAAGGTTT GGGTTAGGTCTGTTAGTTCGTTGTCATCTCGGTCCATGAATC GAACTGGATACCTTCTGGTGTGAATCGATAAGAGCGTATG TTTTGAACAACCACTACTTTGGAAGTATTAGGTAA
Secuencia 1 Clon 1/PL95	Identidades = 165/168 (98%), Huecos = 1/168 (0%), Cadena= más/menos	emb AJ417449.2 Vector de integración lanzadera pPL2	TNNTNNANACGATGACATACCACAAATTTTACCACAAATGCC ACAAAAACAACGGAATAAACGGGTATTATACGATATAAAA AAAACTCCAAAACATTCATCCGCCCTTTAATATCAAGGCTTT TCAACGTTTTAAAGATTTCTTTACATTACTATTTAACGTCCTG AGAGGGATTGAAACCCCGACCGACGGCTTAAAGGCCGTT GCTCTATCCAGCTGAGCTATCAGGACAAATGGCACTGTCTTT TCAACAGCCAAATACCATTTTATGTTTAAATCGCTTGTGTC AATGGTTTTCTTAAAGTATTGCATTTTTCTTTTTCGGGTGT CTTTTACCTAGTTACGCTTCGTTAATGGGAAGGTTTGGGTT AGGCTGTTAGTTCGTTGTCATCTCGGTCCATGAATCGAACT TGGATACCTTCTGGTGTGAATCGATAAGAGCNNNGTTTTT GTANACAAAACCTTTTACTTTGGACTGAATAAGGTACCCCCC CTTGTAAGGTTTTATGTAACCCCTTTGTAGAGTTAATTT GGAACCACGAGGGGATTGATTAGGCCACCTCGCTTTAA GTTACAGTGGGCGACAN
Secuencia 1 Clon 1/PL95	Identidades = 171/174 (98%), Huecos = 2/174 (1%), Cadena= más/menos	emb AJ417449.2 Vector de integración lanzadera pPL2	NNTTAGNTAAAACGATGAAATACCACAAATTTTACCACAAAT GCCAAAAACAACGGAATAAACGGGTATTATACGATATA AAAAAACTCCAAAACATTCATCCGCCCTTTAATATCAAGGC TTTTCAACGTTTTAAAGATTTCTTTACATTACTATTTAACGTC CTGAGAGGGATTGAAACCCCGACCGACGGCTTAAAGGCC GTTGCTCTATCCAGCTGAGCTATCAGGACAAATGGCACTGTC TTTTCAACAGCCAAATACCATTTTATGTTTAAATCGCTTGT GTCAATGGTTTTCTTAAAGTATTGCATTTTTCTTTTTCGGG TGCTTTTTGACCTAGTTACGCTTCGTTAATGGGAAGGTTTGG GTTAGGTCTGTTAGTTCGTTGTCATCTCGGTCCATGAATCGA ACTTGGATACCTTCTGGTGTGAATCGATAAGAGCGTATGTT TTTGACCAACCATCACTTTGACGGATTAGGTAACCTCCAT TTGAGAGAGTATGTAACCATTTTTGGGAGGTATGATGA AAAN
Secuencia 1 Clon 1/PL95	Identidades = 167/168 (99%), Huecos = 1/168 (0%), Cadena= más/menos	emb AJ417449.2 Vector de integración lanzadera pPL2	TNNNNGTANAANGATGAAATACCACAAATTTTACCACAAA TGCCAAAAACAACGGAATAAACGGGTATTATACGATATA AAAAAACTCCAAAACATTCATCCGCCCTTTAATATCAAGG CTTTTCAACGTTTTAGAGATTTCTTTACATTACTATTTAACGT CCTGAGAGGGATTGAAACCCCGACCGACGGCTTAAAGGCC CGTTGCTCTATCCAGCTGAGCTATCAGGACAAATGGCACTGT CTTTTCAACAGCCAAATACCATTTTATGTTTAAATCGCTTGT TGCAATGGTTTTCTTAAAGTATTGCATTTTTCTTTTTCGG GTGCTTTTTGACCTAGTTACGCTTCGTTAATGGGAAGGTTTGG GGTTAGGTCTGTTAGTTCGTTGTCATCTCGGTCCATGAATCG AACTTGGATACCTTCTGGTGTGAATCGATAAGAGCGTATGTT TTTGAAAAACCATCACTTTGACGGATTAGGTAACCTCCAT TTTGAGAGATA TTTGAGAGATA

a Referido al informe Blast  
b Según lo obtenido mediante secuenciación

La digestión con enzimas de restricción se realiza usando las enzimas de restricción BamHI y Sall FastDigest® de Fermentas (Fermentas International Inc., Burlington, Canadá) según las instrucciones del fabricante. Se incubó un volumen total de 20 µl durante una hora a 37 °C. La desfosforilación del vector y los fragmentos IAC antes del ligamiento se realiza con la fosfatasa alcalina termosensible FastAP™

(Fermentas) según las instrucciones del fabricante durante 30 min a 37 °C. Se usó ADN ligasa T4 (Fermentas) para el ligamiento del vector pPL2 y el fragmento IAC artificial durante toda la noche a 4 °C.

5 La detección mediante PCR en tiempo real de *L. monocytogenes* teniendo como diana un fragmento de 274 pb del gen *prfA* se realiza según el formato publicado previamente usando los cebadores Lip1 y Lip2 y Lip-Probe marcada con FAM (D'Agostino y col. [2004] J. Food Prot. 67, 1646-1655; Rossmannith y col. [2006] Res. Microbiol. 157, 763-771). La detección mediante PCR en tiempo real del fragmento IAC artificial se realiza según Rossmannith y col. (2006) usando Lip1 y Lip2, y pLucLm4 marcado con HEX.

10 El cebador sentido (Lip1: 5'-GATACAGAAACATCGGTTGGC-3') y el cebador complementario (Lip2: 5'-GTGTAATCTTGATGCCATCAGG-3') amplifican un fragmento de 274 pb del gen *prfA*. Se usan dos formatos de sonda TaqMan™ diferentes con temperatura de fusión incrementada. En la sonda Lip-Probe (5'-FAM-CAGGATTAAGTTGACCGCA-MGB-3') se utiliza una modificación con MGB. La sonda para el IAC del ensayo (pLucLm 4: 5'-HEX-TCGAAATGTCCGTTCCGTTGGC -BHQ1-3') está marcada con HEX. Los cebadores y sondas pLucLm 4 se pueden adquirir en MWG Biotech (Ebersberg, Alemania). La sonda modificada con MGB se puede adquirir en Applied Biosystems.

15 La PCR convencional para la confirmación de la inserción de pPL2-IAC en el genoma de *L. monocytogenes* EGDe  $\Delta$ -*prfA* se realiza usando los cebadores NC16 y PL95 (Lauer y col. [2002] J. Bacteriol. 184, 4177-4186). *L. monocytogenes* EGDe IAC+,  $\Delta$ -*prfA* se identifica como *L. monocytogenes* EGDe amplificando el locus *iap*- de *L. monocytogenes* según Bubert y col. (1999, Appl. Environ. Microbiol. 65, 4688-4692) y usando como diana el gen del ARNr 16S específico para todas las especies de *Listeria* y el gen *hly* específico para *L. monocytogenes*  
20 según Border y col. (1990, Lett. Appl. Microbiol. 11, 158-162).

25 Las reacciones de PCR convencional y en tiempo real se realizan en un termociclador de PCR en tiempo real Mx3000p (Stratagene, La Jolla, CA, EE. UU.). El volumen de 25  $\mu$ l contiene Tris-HCl 20 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 3,5 mM, 500 nM de cada cebador, 250 nM de cada sonda, 200  $\mu$ M (cada uno) de dATP, dTTP, dGTP y dCTP, 1,5 U de ADN polimerasa Taq Platinum® (Invitrogen, Lofer, Austria) y 5  $\mu$ l de ADN aislado. La amplificación después de la desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 min se realiza en 45 ciclos, a 94 °C durante 15 s y a 64 °C durante 1 min.

30 En el caso del patrón de ADN para la cuantificación mediante PCR en tiempo real, se aísla el ADN de un mililitro de cultivo puro de la cepa EGDe de *L. monocytogenes* usando el kit para tejido NucleoSpin® y el protocolo de soporte para bacterias gram positivas. La concentración de ADN se mide fluorimétricamente usando un dispositivo Hoefer DyNA Quant200 (Pharmacia Biotech). El número de copias del gene *prfA* se determina asumiendo que, según el peso molecular del genoma de *L. monocytogenes*, 1 ng de ADN equivale a  $3,1 \times 10^5$  copias del genoma completo, y que el gen *prfA* es un gen de copia única. La pendiente (s) de la curva patrón se usa para el cálculo de la eficiencia (E) de la PCR con la siguiente ecuación:  $E = 10^{-1/s} - 1$  [21].

35 Los resultados de la PCR en tiempo real se expresan como equivalentes de células bacterianas (ECB). El número de copias del gen *prfA* y el inserto IAC se determina asumiendo que, según el peso molecular del genoma de *L. monocytogenes*, 1 ng de ADN equivale a  $3,1 \times 10^5$  copias del genoma completo, y que el gen *prfA* y el inserto IAC son un gen de copia única y un inserto de copia única dentro del genoma respectivo (Nelson y col. [2004] Nucleic Acids Res. 32, 2386-2395). Todas las reacciones de PCR en tiempo real se realizan por duplicado excepto cuando se indique otra cosa.

40 Los productos de PCR de la PCR convencional se separan en geles de agarosa al 1,5 % a 90 V durante 25 min y se tiñen con 0,5  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Alemania). Como patrón se usó GeneRuler 100 pb (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania).

45 **1.3. Extracción y medición del ADN.** Se extrajo el ADN genómico de un mililitro de cultivo bacteriano de toda la noche utilizando el kit para tejido NucleoSpin® (Macherey - Nagel) y el protocolo de soporte para bacterias gram positivas. El ADN del plásmido para los experimentos de clonación se extrajo con Qiagen Plasmid Midi Kit (Hilden, Alemania) según las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN se determina analíticamente mediante medición fluorimétrica usando un aparato Hoefer DyNA Quant200 (Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, EE. UU.) y un espectrofotómetro de matriz de diodos 8452A (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, EE. UU.).

50 **1.4. Clonación de pPL2-IAC.** Se produjeron cantidades adecuadas de IAC (IAC: 5'-GAT ACA GAA ACA TCG GTT GGC GTA TTC GAA ATG TCC GTT CGG TTG GCG CTA TGA AGA GAT ACG CGG TGG AAC CTG GAA

CCT GAT GGC ATC AAG ATT ACA C-3') para la clonación mediante amplificación del fragmento de 100 pb por PCR convencional según Rossmann y col. (2006, Res. Microbiol. 157, 763-771) usando los cebadores modificados LipBam y LipSal que contienen los sitios de restricción BamHI y Sall. Tras la purificación del producto de amplificación usando NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel), se llevó a cabo la digestión con enzimas de restricción y la desfosforilación como se describe anteriormente, seguido del ligamiento con el vector pPL2. Antes del ligamiento, las células de *E. coli* TOP10F' se transforman con el vector de integración basado en fago pPL2 mediante técnicas convencionales de choque térmico (Sambrook y col. [1989] Molecular cloning: a laboratory manual, 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) para su amplificación. El vector se extrae como se describe anteriormente y se usa para el ligamiento después de su purificación, digestión con enzimas de restricción y desfosforilación. A continuación, *E. coli* TOP10F' se transforma con el plásmido pPL2-IAC resultante mediante choque térmico. Los clones pPL2-IAC positivos se seleccionan mediante siembra en medio de cultivo Luria-Bertani (LB; Oxoid) que contiene 25 µg/ml de cloranfenicol.

Se toman colonias bacterianas individuales y se analiza la transformación positiva de *E. coli* con pPL2-IAC. El análisis mediante digestión con enzimas de restricción da lugar a dos fragmentos de una longitud de ~6000 pb y 100 pb correspondientes a las longitudes del vector y el inserto, lo que indica la transformación de pPL2-IAC en *E. coli*. La PCR en tiempo real con IAC como diana usando pLucLm4 da lugar a la amplificación de la diana, confirmando de este modo el análisis con enzimas de restricción (Fig. 1A).

**1.5. Transformación de *L. monocytogenes* EGDe  $\Delta$ -prfA con pPL2-IAC.** *L. monocytogenes* EGDe  $\Delta$ -prfA se transforma con pPL2-IAC usando un protocolo de electroporación modificado (Park y col. [1990] Gene 94, 129-132). Las células de *L. monocytogenes* EGDe  $\Delta$ -prfA electrocompetentes se preparan como sigue: las células se crecen en medio de infusión de cerebro corazón (BHI; Oxoid) con 5 µg/ml de penicilina G hasta una DO<sub>600</sub> de 0,3 a 37 °C. Las células se recogieron mediante centrifugación a 8000 x g durante 10 min a 4 °C y el sedimento se lavó dos veces en 1/10 vol. de tampón SMHEM 3,5x (sacarosa 72 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM y HEPES 2 mM). Tras resuspender el sedimento en 1/100 vol. de tampón SMHEM 3,5x. se conservaron alícuotas de 100 µl a -80 °C.

Para la electroporación, se descongelan en hielo alícuotas de 100 µl de *L. monocytogenes* EGDe  $\Delta$ -prfA y se mezclan con 5 µl de suspensión de ADN (~1 µg/reacción) que contiene pPL2-IAC. Tras la incubación durante un minuto en hielo, se realiza la electroporación (100 Ω, 50 µF, 1000 V) en un sistema de electroporación Gene Pulser Xcell™ (Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, CA, EE. UU.). Se añade un mililitro de BHI previamente calentada, la muestra se incuba durante 6 h a 37 °C y posteriormente se siembra en agar BHI que contiene 25 µg/ml de cloranfenicol. Tras la incubación durante 24-48 h a 37 °C, se tomaron colonias individuales y se seleccionaron clones de *L. monocytogenes* EGDe  $\Delta$ -prfA pPL2-IAC positivos.

**1.6. Confirmación de *L. monocytogenes* EGDe IAC+,  $\Delta$ -prfA.** Se confirman cuatro clones positivos en la selección con cloranfenicol de *L. monocytogenes* EGDe IAC+,  $\Delta$ -prfA mediante el análisis de la presencia de la secuencia en *L. monocytogenes* EGDe  $\Delta$ -prfA. Esto se realiza amplificando el fragmento de 100 pb de IAC utilizando la sonda pLucLm4. El DNA genómico de *L. monocytogenes* EGDe IAC+,  $\Delta$ -prfA se sometió a PCR en tiempo real dando lugar a una amplificación positiva (Fig. 1B). Los clones analizados muestran un valor medio de Ct de 11,5 (DE [desviación estándar]: 0,16) correspondiente a una media de  $5,36 \times 10^7$  copias. El estado de  $\Delta$ -prfA de la cepa clonada se analiza mediante PCR en tiempo real usando la sonda Lip-Probe que hibrida con el fragmento de 274 pb del locus prfA de *L. monocytogenes* de tipo salvaje sin que se produzca amplificación.

La integración del vector dentro del genoma se analiza mediante PCR convencional como se describe en el párrafo 1.2. Los fragmentos resultantes después de la electroforesis se corresponden con la longitud propuesta del producto de amplificación de 499 pb (Fig. 2C). Esto indica la inserción del vector en el genoma de *Listeria*, ya que los cebadores NC16 y PL95 permiten la amplificación del sitio de unión de RNAt<sup>Arg</sup>-attBP' en *L. monocytogenes* de serotipo 1/2a, dando lugar a amplificadores híbridos que contienen partes de las secuencias del vector (3') y el genoma de *Listeria* (5').

El análisis de la secuencia de *L. monocytogenes* EGDe IAC+,  $\Delta$ -prfA se realiza usando este amplificado de PCR híbrido con los cebadores NC16 y PL95. La secuencia obtenida es 100 % idéntica a un fragmento de 210 pb del vector de integración lanzadera pPL2 y 100 % idéntica a un fragmento de 261 pb de *L. monocytogenes*, incluido el sitio de unión de tRNA<sup>Arg</sup>-attBP' propuesto (cepa EGDe, genoma completo, segmento 6/12; emb/AL591978.1).

El análisis de confirmación de que la cepa IAC+,  $\Delta$ -prfA resultante es *L. monocytogenes* EGDe se realiza adicionalmente mediante PCR convencional como se describe en el párrafo 1.2. Los resultados se presentan en

las figuras 2A y B donde se demuestra la coincidencia de los tamaños del fragmento para *L. monocytogenes* EGDe IAC+,  $\Delta$ -*prfA* y el control *L. monocytogenes* EGDe en ambos ensayos de PCR.

5 **1.6. Secuenciación de *L. monocytogenes* EGDe IAC+,  $\Delta$ -*prfA*.** Los productos de PCR de clones positivos después de la amplificación se purifican usando el kit NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR purificados se envían a Macrogen Inc. (Seúl, Corea) para la secuenciación del ADN. Se secuencian ambas cadenas de la muestra usando los cebadores NC16 y PL95 en la reacción de secuenciación por ciclos.

Las secuencias obtenidas se analizan y alinean usando el servidor BLAST disponible en la página web del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

10 **1.7. PCR cuantitativa en tiempo real para la confirmación de la inserción de una única copia de pPL2-IAC en el genoma de *L. monocytogenes* EGDe  $\Delta$ -*prfA* y calibración frente a los datos de *L. monocytogenes* EGDe de tipo salvaje.** Los patrones de calibración del ADN genómico de *L. monocytogenes* EGDe IAC+,  $\Delta$ -*prfA* y *L. monocytogenes* EGDe de tipo salvaje se comparan usando el ensayo de PCR en tiempo real para *prfA* en un sistema multiplex con las sondas pLucM4 y Lip-Probe. Basándose en la suposición de que *prfA* es un gen de una única copia, se comparan diluciones 1/10 de ambos ADN diana. Las diluciones 1/10 se inicia a  $1,58 \times 10^6$  copias equivalentes a 5 ng de ADN genómico determinado mediante medición fluorimétrica y UV-VIS. Los resultados se presentan en la tabla 3 y muestran una buena concordancia de los valores de Ct de ambas series de patrones. Esto también demuestra el rendimiento comparable de ambas sondas dentro de las reacciones. Los datos subyacentes son el resultado de duplicados repetidos en cuatro ensayos de PCR en tiempo real. Para la confirmación de estos resultados, las concentraciones de cultivos de *L. monocytogenes* EGDe IAC+,  $\Delta$ -*prfA* se determinan mediante tinción de viabilidad y comparando con los resultados de la PCR en tiempo real. La cifra de  $3,2 \times 10^3$  (DER [desviación estándar relativa]: 6,7 %) ECB por muestra obtenida mediante PCR en tiempo real es comparable a las  $2,8 \times 10^3$  (DER: 25,0 %) UFC por muestra que se determina mediante tinción de viabilidad.

Tabla 3. Comparación de los valores de Ct tras la PCR en tiempo real derivados de una dilución del patrón 1/10 del ADN genómico de *L. monocytogenes* EGDe de tipo salvaje y de la cepa EGDe  $\Delta$ -*prfA* IAC+ clonada que demuestra la inserción de una única copia de pPL2-IACa dentro del genoma de *L. monocytogenes* EGDe  $\Delta$ -*prfA*.

	Cepa		
	EGDe $\Delta$ - <i>prfA</i> IAC+	EGDe tipo salvaje	EGDe tipo salvaje frente al fondo de EGDe $\Delta$ - <i>prfA</i> IAC+
	PCR monoplex		PCR duplex
N.º de copias de la diana <sup>b</sup>	Valores de Ct (DE) <sup>c</sup>	Valores de Ct (DE) <sup>d</sup>	Valores de Ct (DE) <sup>d,e</sup>
$1,58 \times 10^6$	16,8 (0,08)	16,6 (0,11)	-
$1,58 \times 10^5$	20,1 (0,13)	20,0 (0,02)	19,9 (0,13)
$1,58 \times 10^4$	23,4 (0,14)	23,1 (0,18)	23,4 (0,26)
$1,58 \times 10^3$	26,8 (0,13)	26,7 (0,06)	26,7 (0,31)
$1,58 \times 10^2$	30,4 (0,07)	30,1 (0,02)	29,9 (0,68)

(continuación)

Cepa			
EGDe $\Delta$ -prfA IAC+		EGDe tipo salvaje	
PCR monoplex		PCR duplex	
N.º de copias de la diana <sup>b</sup>	Valores de Ct (DE) <sup>c</sup>	Valores de Ct (DE) <sup>d</sup>	Valores de Ct (DE) <sup>d,e</sup>
$1,58 \times 10^1$	33,8 (0,27)	34,1 (0,91)	33,4 (0,77)

a Basado en la asunción de que *prfA* es un gen de una única copia.

b Dilución en serie derivada de una solución que contiene 1 ng/ $\mu$ l de ADN genómico que representa  $1,58 \times 10^6$  copias en 5  $\mu$ l de ADN molde.

c Ensayo de PCR en tiempo real para *prfA* usando la sonda pLucLM4 marcada con HEX que amplifica la secuencia IAC artificial.

d Ensayo de PCR en tiempo real para *prfA* usando la sonda Lip-Probe marcada con FAM que amplifica 274 pb de la secuencia del locus *prfA*.

e ADN genómico de *L. monocytogenes* EGDe frente al fondo de  $1,58 \times 10^5$  del genoma de la cepa EGDe *prfA* IAC+ en una reacción multiplex.

5 Mediante la PCR en tiempo real multiplex, se estudia la influencia de cantidades crecientes de ADN genómico derivado de *L. monocytogenes* EGDe IAC+,  $\Delta$ -prfA sobre el rendimiento de la reacción principal que amplifica el locus *prfA* de la cepa de tipo salvaje y la principal diana bacteriana. Usando las sondas Lip-Probe y pLucLM4, se analizaron diluciones 1/10 del ADN genómico de *L. monocytogenes* EGDe de tipo salvaje desde  $1,58 \times 10^6$  a  $1,58 \times 10^1$  copias en una matriz tanto creciente como decreciente frente al fondo de diluciones de diez veces de  $1,58 \times 10^6$  a  $1,58 \times 10^1$  copias de ADN de *L. monocytogenes* EGDe IAC +,  $\Delta$ -prfA. Los valores de Ct resultantes para todas las combinaciones analizadas se desvían de los valores respectivos obtenidos mediante experimentos monoplex de los patrones genómicos de ambas cepas

10 con un desviación estándar de la media de 0,3 para todas las combinaciones de concentración del patrón. A modo de ejemplo, se presentan en la tabla 3 los valores de Ct de una dilución 1/10 del ADN genómico de *L. monocytogenes* EGDe frente al fondo de  $1,58 \times 10^5$  copias de *L. monocytogenes* EGDe IAC+,  $\Delta$ -prfA.

15 **1.8. Muestras de alimentos contaminados natural y artificialmente.** Se compra leche UHT en los supermercados locales para su contaminación artificial y se analiza que es negativa para *L. monocytogenes* antes de la inoculación realizando una PCR en tiempo real con el locus *prfA* de *L. monocytogenes* como diana. La contaminación artificial se realiza usando una dilución seriada 1/10 en solución de Ringer (Oxoid) de un cultivo puro de *L. monocytogenes* EGDe que contiene  $8,5 \times 10^8$  UFC/ml. Se añaden 100  $\mu$ l de las diluciones apropiadas a las muestras. La dilución seriada se prepara para contener  $10^1$ - $10^2$ ,  $10^2$ - $10^3$ ,  $10^3$ - $10^4$  y  $10^4$ - $10^5$  UFC/ml. El número de UFC para cada paso de la dilución seriada se obtiene mediante el recuento en placa usando agar soja triptona con el 0,6 % de levadura (TSA-Y; Oxoid). El experimento se realiza por triplicado.

25 Las muestras de queso tierno contaminado de forma natural fueron proporcionadas por las autoridades sanitarias y procedían de un brote reciente de *L. monocytogenes* en Styria (Austria) que se conservaron a 4 °C. Se procesan por cuadruplicado dos muestras procedentes de dos cánones de producción diferentes que dan lugar a ocho muestras individuales. Además, se lleva a cabo el consiguiente método ISO 11290-2 para cada muestra

para comparar los resultados cuantitativos de los experimentos con este método estándar (ISO 11290-2; ISO 11290-2/Amd1).

**1.9. Tratamiento de la muestra.** El tratamiento de la muestra se realiza usando el protocolo de lisis de la matriz como publican Mester y col. (2010) J. Food Protect. 73, 680-687 y Rossmanith y col. (2007) J. Microbiol. Methods 69, 504-511.

**1.10. Análisis estadístico.**

Las comparaciones entre dos grupos se analizan mediante la prueba de chi cuadrado. Se calculan los valores de P y se consideran significativos valores  $\leq 0,05$ .

**2. Ejemplos de aplicación:**

**2.1. Fenotipo de *L. monocytogenes* EGDe IAC+,  $\Delta$ -prfA en medios de agar OCLA, PALCAM, agar sangre y RAPID'L.mono.** En agar sangre, *L. monocytogenes* EGDe IAC+,  $\Delta$ -prfA no muestra hemólisis. En agar PALCAM, *L. monocytogenes* EGDe IAC+,  $\Delta$ -prfA muestra el mismo fenotipo que *L. monocytogenes* EGDe de tipo salvaje, como se presenta en la tabla 2. La morfología y el color de *L. monocytogenes* EGDe IAC+,  $\Delta$ -prfA en OCLA también es similar al tipo salvaje, excepto por la formación del halo que no se puede observar para *L. monocytogenes* EGDe IAC+,  $\Delta$ -prfA después de 24 y 48 horas de incubación. Después de 72 h de incubación, *L. monocytogenes* EGDe IAC+,  $\Delta$ -prfA muestra también la formación de un débil halo. Sembrada en RAPID'L.mono, la cepa clonada desarrolla un color blanco que carece del característico color verde de la cepa *L. monocytogenes* EGDe de tipo salvaje en agar RAPID'L.mono.

TABLA 2.  
Morfología de las colonias de la cepa *L. monocytogenes* EGDe  $\Delta$ prfA IAC+ clonada en comparación con *L. monocytogenes* EGDe de tipo salvaje y *L. innocua* en medios de agar selectivos y cromogénicos seleccionados.

Cepa / Medio		RAPID' L.mono	OCLA	PALCAM	Agar sangre
<i>L. monocytogenes</i> EGDe de tipo salvaje	Morfología	-	Formación de halo <sup>a</sup>	Ojo de pez	-
	Color	Verde	Azul	Verde	-
	Tinción del agar	no	-	Negro	Hemólisis
<i>L. monocytogenes</i> EGDe $\Delta$ prfA, IAC+	Morfología	-	Halo después de 72 h <sup>b</sup>	Ojo de pez	-
	Color	Blanco	Azul	Verde	-
	Tinción del agar	no	-	Negro	Sin hemól.
<i>L. innocua</i>	Morfología	-	Sin halo	Ojo de pez	-
	Color	Blanco	Azul	Verde	-
	Tinción del agar	Amarillo	-	Negro	Sin hemól.

a La formación de halo finalizó después de 24 h de incubación a 37 °C en el caso de *L.*

b No se observó halo en el caso de *L. monocytogenes* EGDe  $\Delta$ prfA, IAC+ después de 24 y 48 h de incubación.

**2.2. Aplicación de *L. monocytogenes* EGDe IAC+,  $\Delta$ -prfA como control interno del proceso para la muestra de leche UHT contaminada artificialmente y de queso Quargel contaminado de forma natural.** Las muestras alimentarias contaminadas tanto artificial como naturalmente se procesan según el método descrito en Rossmanith y col. (2007) J. Microbiol. Methods 69, 504-511. Este método se basa en la preparación de la muestra mediante lisis de la matriz alimentaria y la posterior separación de las bacterias diana mediante centrifugación seguido por el aislamiento del ADN y la detección mediante PCR en tiempo real. El líquido iónico 1-etil-3-metilimidazolío tiocianato ([emim]SCN) se utiliza como solvente para la preparación de la muestra.

Para la contaminación artificial, se inoculan muestras de 12,5 gr de leche UHT con una dilución seriada 1/10 de cuatro pasos de *L. monocytogenes* EGDe de tipo salvaje como se describe en la sección 1.8. Además se añadieron  $1,4 \times 10^3$  (DER: 29,0 %) UFC por muestra del control interno del proceso de la muestra *L. monocytogenes* EGDe IAC+,  $\Delta$ -prfA.

- 5 El patógeno diana principal *L. monocytogenes* EGDe de tipo salvaje se recupera a partir de la leche UHT en un factor del 55 % (DER: 10,9 %) en comparación con el recuento al microscopio. La desviación estándar relativa dentro de las escalas logarítmicas es del 10,9 %, lo que representa un nivel elevado de precisión y reproducibilidad en términos de recuperación en escala logarítmica, e indica la ausencia de influencia sesgada del control interno del proceso de la muestra por las células *L. monocytogenes* EGDe IAC+,  $\Delta$ -prfA.
- 10 El control interno del proceso de la muestra indica una recuperación del 49 % (DER: 27,1 %) en comparación con el recuento al microscopio. Inicialmente  $1,4 \times 10^3$  (DER: 29,0 %) UFC (unidades formadoras de colonias) por muestra dan lugar a  $6,9 \times 10^2$  (DER: 27,0 %) ECB tras la recuperación y detección mediante PCR en tiempo real.

El sistema se aplica a continuación a muestras de queso Quargel contaminado de forma natural. Además se añadieron  $1,4 \times 10^3$  (DER: 29,0 %) UFC de *L. monocytogenes* EGDe IAC+,  $\Delta$ -prfA por muestra.

- 15 Las muestras se procesan de dos formas: Se obtiene una cuantificación directa del valor de *L. monocytogenes* mediante lisis de la matriz y la posterior PCR en tiempo real. También se realiza el método ISO 11290-2 para su comparación. Las muestras se procesan adicionalmente mediante la lisis de la matriz y la posterior PCR en tiempo real usando un protocolo de aislamiento de ADN que omite el paso de digestión con proteinasa K. Este paso sesga artificialmente el rendimiento de la digestión teniendo como resultado la eficiencia del protocolo completo.
- 20

- Los valores de contaminación con *L. monocytogenes* de las muestras obtenidos directamente después de la PCR en tiempo real alcanzan un promedio de  $1,4 \times 10^6$  (DER: 5,9 %) ECB y  $1,1 \times 10^8$  (DER: 8,9 %) ECB para las dos producciones de queso Quargel. Estos valores se corrigen de acuerdo con la tasa de eficiencia de cada muestra obtenida mediante comparación de los valores de cada replicado con el valor promedio del control del proceso de *L. monocytogenes* EGDe IAC+,  $\Delta$ -prfA de  $6,9 \times 10^2$  (DER: 5,9 %) ECB después de la PCR en tiempo real. Después de esta corrección, el promedio de la contaminación por *L. monocytogenes* es de  $1,1 \times 10^6$  (DER: 35,8%) ECB y  $2,3 \times 10^8$  (DER: 10,2 %) para las dos producciones. Después de la PCE en tiempo real se realiza una corrección más incluyendo la pérdida global de células de *L. monocytogenes* EGDe IAC+,  $\Delta$ -prfA control del proceso respecto a las  $1,4 \times 10^3$  (DER: 29,0 %) ECB a  $6,9 \times 10^2$  (DER: 5,9 %) ECB iniciales. Esto da lugar a  $2,32 \times 10^6$  (DER: 36,0 %) ECB/g y  $5,0 \times 10^8$  (DER: 9,9 %) ECB/g para las dos producciones de queso a  $2,07 \times 10^6$  (DER: 91,1 %) ECB/g y  $4,9 \times 10^8$  (DER: 73,2 %) UFC/g obtenidas por el método ISO 11290-2.
- 25
- 30

- Las muestras procesadas mediante el aislamiento de ADN sesgado artificialmente dan un promedio en los valores básicos de  $4,9 \times 10^5$  (DER: 6,3 %) ECB y  $3,7 \times 10^7$  (DER: 2,9 %) para las respectivas producciones de queso. Tras la corrección como se describe anteriormente, la respectiva contaminación por *L. monocytogenes* es de  $1,8 \times 10^6$  (DER: 47 %) ECB y  $4,6 \times 10^8$  (DER: 10,1 %) ECB.
- 35

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Merck Patent GmbH

<120> Un mutante no natural de la especie bacteriana *Listeria*

*monocytogenes*

- 40 <130> I10/116

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

- <211> 100
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 5 <223> Secuencia de control interno de amplificación (IAC)
- <300>
- <301> Rossmanith y col.
- <302> Detection of *Listeria monocytogenes* in food using a combined enrichment/real-time PCR method targeting the *prfA* gene
- 10 <303> Res. Microbiol.
- <304> 157
- <306> 763-771
- <307> 2006-04-03
- <400> 1
- 15 gatacagaaa catcggttg cgtattcgaa atgtccggtc ggtggcgct atgaagagat 60  
acgcggtgga acctggaacc tgatggcatc aagattacac 100
- <210> 2
- <211> 21
- <212> ADN
- 20 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Cebador Lip1
- <300>
- <301> D'Agostino y col.
- 25 <302> A validated PCR-based method to detect *Listeria monocytogenes* using raw milk as a food model towards an international standard
- <303> J. Food. Prot.
- <304> 67
- <306> 1646-1655

- <307> 2004
- <400> 2
- gatacagaaa catcggttg c 21
- <210> 3
- 5 <211> 22
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Cebador Lip2
- 10 <300>
- <301> D'Agostino y col.
- <302> A validated PCR-based method to detect *Listeria monocytogenes* using raw milk as a food model towards an international standard
- <303> J. Food Prot.
- 15 <304> 67
- <306> 1646-1655
- <307> 2004
- <400> 3
- gtgtaatctt gatgcatca gg 22
- 20 <210> 4
- <211> 23
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 25 <223> pLucLm4: Sonda de unión a IAC
- <300>
- <301> Rossmanith y col.
- <302> Detection of *Listeria monocytogenes* in food using a combined enrichment/real-time PCR method targeting the *prfA* gene

- <303> Res. Microbiol.  
<304> 157  
<306> 763-771  
<307> 2006
- 5 <400> 4  
ttcgaaatgt ccgttcgggt ggc 23  
<210> 5  
<211> 21  
<212> ADN
- 10 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> LipProbe: Sonda de unión al locus prfA  
<300>  
<301> Rossmanith y col.
- 15 <302> Detection of *Listeria monocytogenes* in food using a combined enrichment/real-time PCR method targeting the prfA gene  
<303> Res. Microbiol.  
<304> 157  
<306> 763-771
- 20 <307> 2006  
<400> 5  
caggattaa agttgaccgc a 21  
<210> 6  
<211> 31
- 25 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Cebador LipBam  
<400> 6

gcgcgatcc gatacagaaa catcggttg c 31

<210> 7

<211> 32

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador LipSal

<400> 7

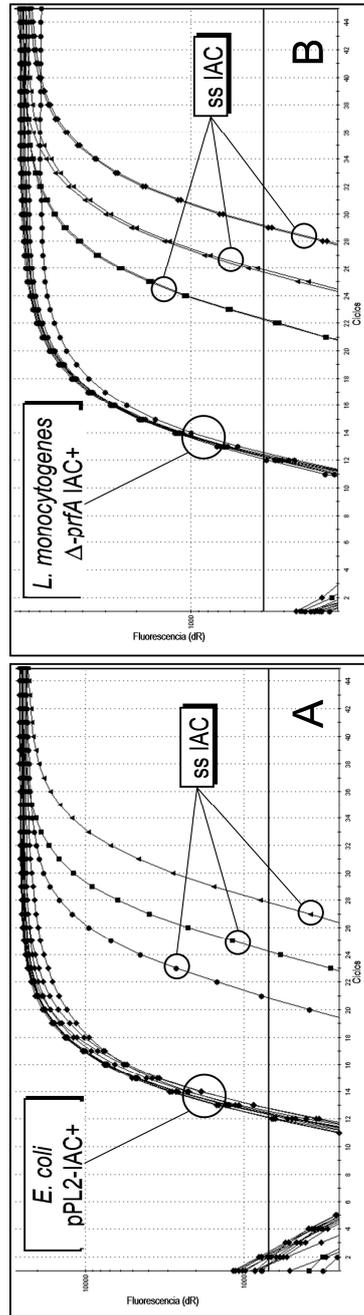
10 gcgctcgac gtgtaatctt gatccatca gg 32

**REIVINDICACIONES**

1. Una bacteria genéticamente modificada de la especie *Listeria monocytogenes*, en la que se ha deletado el locus genómico del factor de transcripción PrfA, caracterizada porque a nivel genómico contiene una secuencia artificial que actúa como control interno de amplificación (IAC).
- 5 2. La bacteria *Listeria monocytogenes* de la reivindicación 1, en la que la secuencia artificial que actúa como IAC contiene las secuencias de unión al cebador en los extremos 5' y 3'.
3. La bacteria *Listeria monocytogenes* de la reivindicación 2, en la que las secuencias de unión al cebador son idénticas a las secuencias de unión al cebador del locus prfA de *Listeria monocytogenes* de tipo salvaje.
- 10 4. Una bacteria *Listeria monocytogenes* de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la secuencia artificial que actúa como IAC es una secuencia de 100 pb según la SEC ID N.º 1.
5. Una cepa *Listeria monocytogenes* EGDe de cualquier de las reivindicaciones 1 a 4 genéticamente modificada.
6. Una cepa *Listeria monocytogenes* EGDe genéticamente modificada según una o más de las reivindicaciones 1 a 5, en la que se ha deletado el locus genómico del factor de transcripción PrfA, que contiene la secuencia de control interno de amplificación (IAC) de SEC ID N.º 1 depositada en el DSMZ como *Listeria monocytogenes*  $\Delta$ prfA/IAC+ con el número de identificación DSM 23639 el 20 de mayo de 2010.
- 15 7. Uso de *Listeria monocytogenes* genéticamente modificada como se especifica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la detección y determinación cualitativa y/o cuantitativa de la presencia de *Listeria monocytogenes* de tipo salvaje en una muestra que se sospecha está contaminada con dicho microorganismo.
8. Uso según la reivindicación 7, caracterizado porque la muestra es un alimento.
- 20 9. Uso de *Listeria monocytogenes* genéticamente modificada como se especifica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 como control interno del proceso de la muestra (CIPM) para un ensayo basado en PCR en tiempo real.
10. Un método para la detección y determinación de la presencia de *Listeria monocytogenes* de tipo salvaje en una muestra que se sospecha está contaminada con dicho microorganismo patógeno, que comprende los siguientes pasos:
- 25 (a) añadir a dicha muestra una cantidad predefinida de células de la bacteria *Listeria monocytogenes* genéticamente modificada como se especifica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6,
- (b) incubar la muestra con una solución de extracción,
- (c) aislar el ADN mediante métodos convencionales;
- 30 (d) aplicar la PCR en tiempo real, usando para ello (i) cebadores específicos para el locus prfA genómico de *Listeria monocytogenes* de tipo salvaje y la secuencia IAC de *Listeria monocytogenes* genéticamente modificada como se especifica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y (ii) una sonda oligonucleotídica marcada con fluorescencia que es capaz de hibridar específicamente con dicho locus prfA y una sonda oligonucleotídica marcada con fluorescencia que es capaz de hibridar específicamente con dicha secuencia IAC,
- 35 (e) determinar cualitativa y/o cuantitativamente las señales fluorescentes generadas en el paso (d), y
- (f) determinar y/o calcular a partir del paso (e) la presencia y/o la cantidad de células de *Listeria monocytogenes* de tipo salvaje en la muestra original que se sospecha está contaminada con dicho microorganismo.
- 40 11. El método según la reivindicación 10, en el que los cebadores usados en el paso (d)(i) son Lip1 (SEC ID N.º 2) y Lip2 (SEC ID N.º 3).

12. El método de la reivindicación 10 u 11, en el que las sondas marcadas con fluorescencia usadas en el paso (d)(ii) son pLucLm4 (SEC ID N.º 4) para la detección de la secuencia IAC y LipProbe (SEC ID N.º 5) para la detección del locus prfA.
- 5 13. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que la solución de extracción del paso (b) contiene al menos MgCl<sub>2</sub> y/o un líquido iónico.
14. Un kit para su uso en un ensayo para la detección y determinación de *Listeria monocytogenes* de tipo salvaje en una muestra que se sospecha está contaminada con dicho microorganismo, que comprende al menos en uno o más envases
- 10 (i) *Listeria monocytogenes* genéticamente modificada como se especifica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6;
- (ii) los cebadores específicos del locus prfA genómico de *Listeria monocytogenes* de tipo salvaje y la secuencia IAC de *Listeria monocytogenes* genéticamente modificada según se especifica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6; y
- 15 (iii) una sonda oligonucleotídica marcada con fluorescencia que es capaz de hibridar específicamente con dicho locus prfA y una sonda oligonucleotídica marcada con fluorescencia que es capaz de hibridar específicamente con dicha secuencia IAC.
15. El kit según la reivindicación 14, en el que los cebadores son Lip1 (SEC. ID N.º 2) y Lip2 (SEC ID N.º 3).
16. El kit según la reivindicación 14 o 15, en el que las sondas marcadas con fluorescencia son pLucLm4 (SEC ID N.º 4) para la detección de la secuencia IAC y LipProbe (SEC ID N.º 5) para la detección del locus prfA.
- 20 17. Un método para la producción de una bacteria de la especie *Listeria monocytogenes* genéticamente modificada como se especifica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que comprende los siguientes pasos:
- (a) deleciónar el locus genómico del factor de transcripción PrfA de la especie bacteriana *Listeria monocytogenes*,
- (b) clonar un vector que contiene un IAC,
- 25 (c) transformar el vector del paso (b) en la especie bacteriana del paso (a).

Fig. 1



**Fig. 2**

