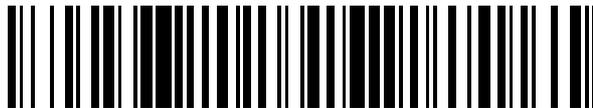


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 540 158**

21 Número de solicitud: 201331415

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

27.09.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

08.07.2015

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE OVIEDO (50.0%)
C/ San Francisco, 3
33006 Oviedo (Asturias) ES;
ALCE CALIDAD, S.L. (25.0%) y
INDUSTRIAS LÁCTEAS ASTURIANAS, S.A.
(25.0%)**

72 Inventor/es:

**VILLAMIZAR RODRÍGUEZ, Germán;
LOMBÓ BRUGOS, Felipe;
NIÑO GONZÁLEZ, María;
MUÑIZ SALAS, Juan;
GONZÁLEZ ÁLVAREZ, María Isabel y
GARCÍA GORDO, Cristina**

54 Título: **Método para la detección simultánea de microorganismos patógenos**

57 Resumen:

Método para la detección simultánea de microorganismos patógenos.

La invención se relaciona con un método in vitro para la detección simultánea de *Campylobacter jejuni*, *Cronobacter sakazakii*, una cepa enterohemorrágica de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* en una muestra que comprende: a) Aislar el ADN de dicha muestra; b) Llevar a cabo una PCR multiplex sobre el ADN aislado en la etapa a) con un conjunto de parejas de cebadores diseñados a tal efecto; y c) Detectar los productos de amplificación obtenidos en la etapa b). La invención también se relaciona con un conjunto de parejas de cebadores especialmente diseñado para poner en práctica dicho método in vitro, así como un kit que comprende el mencionado conjunto de parejas de cebadores.

ES 2 540 158 A1

Método para la detección simultánea de microorganismos patógenos

DESCRIPCIÓN

5 La presente invención se refiere a un método para detección simultánea de múltiples microorganismos patógenos, en particular, patógenos de transmisión alimentaria, mediante el empleo de parejas de cebadores y sondas diseñados específicamente para la detección de dichos microorganismos. Asimismo, la invención también se relaciona con el conjunto de parejas de cebadores y sondas diseñados a tal efecto y
10 con el kit que los contiene. Por lo tanto, la presente invención se engloba dentro del campo de la microbiología, en particular, en el campo de la microbiología alimentaria.

ESTADO DE LA TÉCNICA

15 Las patologías asociadas a microorganismos, fundamentalmente bacterias, representan una de las principales causas de enfermedad y mortalidad a nivel mundial. Se puede definir una enfermedad de origen alimentario como: “cualquier enfermedad de naturaleza infecciosa o toxigénica, que es o se piensa que ha sido causada por el agua o los alimentos”.

20 De esta forma, toda aquella infección producida por microorganismos habitual o extraordinariamente presentes en alimentos, o sus toxinas, y siempre que la vía de entrada al organismo sea la entérica, es considerada como de origen alimentario.

Debido a la globalización del comercio, hoy en día es posible consumir productos
25 frescos provenientes de los lugares más distantes al lugar de residencia, con tiempos de transporte muy breves. Esto supone que patógenos que usualmente han causado enfermedades en ciertas regiones, ahora puedan encontrarse en otras en las que nunca antes se habían detectado. Además, este tipo de intercambios comerciales ha elevado la complejidad de las cadenas de comercialización de tal forma que se ha
30 requerido la aplicación de normas y recomendaciones internacionales que garanticen la inocuidad de los alimentos, tales como las propuestas de la Comisión Internacional del *Codex Alimentarius* o la normativa europea en materia de seguridad alimentaria establecida por la EFSA.

35 Toda esta normativa de seguridad repercute de forma directa en los recursos de la industria alimentaria, ya que es necesario un control exhaustivo de los procesos

productivos, identificando riesgos y minimizándolos de tal manera que se garantice la inocuidad del producto final.

5 Entre los métodos utilizados tradicionalmente tanto en el ámbito industrial, como en el académico y el sanitario, se encuentran la detección y recuento de microorganismos mediante técnicas de cultivo, métodos bioquímicos y métodos inmunológicos. Estos métodos se basan en la identificación de características morfológicas, bioquímicas, fisiológicas e inmunológicas, tales como: la forma de la colonia, su color, la reacción a la tinción de Gram, presencia de endosporas, flagelos, catálisis enzimáticas, 10 fermentación de hidratos de carbono, temperatura de crecimiento, tolerancia al pH y sales, resistencia a antibióticos y tipos de antígenos somáticos, flagelares y capsulares (Yousef, 2008). Sin embargo, si bien han sido útiles durante muchos años, presentan ciertas limitaciones especialmente en lo que a rapidez se refiere. Estas técnicas son bastante laboriosas, ya que para realizar ensayos de detección o 15 cuantificación es necesaria la preparación de los medios de cultivo específicos y el dispensado de los mismos en gran número de placas, seguido por el procesamiento de las muestras alimentarias, que en muchos casos requiere diversas formas de enriquecimiento, y la siembra en las placas de medio sólido. Si se suma el tiempo de preparación previa y el de incubación es posible que los resultados sean obtenidos 20 hasta en 60 horas.

La reducción del tiempo en el que se producen los resultados es un factor crítico que repercute directamente sobre la economía de las industrias agroalimentarias. Para una empresa de este tipo, el retardo en la salida al mercado de los productos que 25 elabora, se traduce en el aumento de costes por almacenamiento, especialmente si son productos perecederos, y en una reducción de la posibilidad de ganancia, ya que si el alimento no está disponible para el intermediario o el consumidor, no se perciben ingresos por su venta.

30 Pero la rapidez y la precisión en la detección de un patógeno no solo son relevantes desde el punto de vista económico. La detección temprana de un brote alimentario permite limitar la incidencia del mismo, evitando la propagación y el aumento del número de casos. Además, facilita la selección y aplicación del tratamiento más adecuado para el paciente.

35

De esta forma el desarrollo de métodos que generen resultados más precisos en tiempos reducidos, supone un logro que provee beneficios tanto para las empresas del sector agroalimentario, como para el ámbito médico-sanitario.

5 Así, se han desarrollado métodos genéticos de detección de microorganismos que solventan los inconvenientes de los métodos tradicionales de detección. Entre los métodos clásicos se encuentran, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCR), la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (qRTi-PCR), la tecnología VeraCore™ o los *microarrays*.

10

La solicitud de patente US2013/0123119 describe el uso de cebadores para la detección de patógenos transmitidos a través de los alimentos. Dichos cebadores permiten la detección simultánea de múltiples microorganismos mediante su empleo en técnicas moleculares, tales como PCR-multiplex y PCR-multiplex a tiempo real.

15

La solicitud de patente EP2020449 describe un método para la detección y cuantificación simultánea, múltiple, de *Listeria spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y/o *E. coli* O157:H7, en una o más muestras, mediante una reacción de amplificación multiplex usando una PCR a tiempo real (qRTi-PCR).

20

Wang, R.F. *et al.* 1997 (*J Appl Microbiol*, 83(6): 727-736) describen la detección de *Escherichia coli*, *E. coli*-EPEC, *E. coli*-O157:H7, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* mediante reacción en cadena de la polimerasa.

25

Fukushima, H. *et al.* 2003 (*Journal of Clinical Microbiology*, 41(11): 5134-5146) describen la detección de 8 de las 17 especies de patógenos alimentarios examinados mediante el empleo de qRTi-PCR.

30

La solicitud de patente US2005/0239086 describe un método para la detección de una o más secuencias de ácido nucleico diana en una muestra, útil en la búsqueda de microorganismos patógenos en alimentos.

35

Sin embargo, ninguno de estos métodos permite la detección simultánea de los principales microorganismos patógenos habitualmente presentes en los alimentos. Por

lo tanto, existe en el estado de la técnica la necesidad de proporcionar un método de detección de microorganismos patógenos alternativos a los existentes en el estado de la técnica que permita la detección múltiple y la cuantificación rápida y eficaz de, principalmente, microorganismos patógenos transmitidos por vía alimentaria y otros de importancia industrial.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los inventores han desarrollado un método para la detección simultánea de microorganismos patógenos alimentarios basado en un conjunto de parejas de cebadores diseñados específicamente para detectar de forma simultánea hasta 11 tipos de microorganismos patógenos mediante una PCR multiplex, entre los que se encuentra *Campylobacter jejuni*, *Cronobacter sakazakii*, una cepa enterohemorrágica de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, un microorganismo de la familia *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Adicionalmente, en caso de que alguno *B. cereus*, *C. perfringens*, un microorganismo de la familia *Enterobacteriaceae*, *E. coli* o *S. aureus* sea detectado, el método permite la cuantificación del mismo, pues se han diseñado parejas de cebadores y sondas a tal efecto.

Así, para el diseño del conjunto de parejas de cebadores de la invención (y que permite la detección simultánea de hasta 11 tipos de microorganismos patógenos), se partió de una colección de 66 microorganismos formada por patógenos de origen alimentario y bacterias interferentes que pueden encontrarse tanto en matrices alimentarias como en el ambiente. A partir de dicha colección, los microorganismos patógenos de interés fueron seleccionados y cultivados, tras lo cual se procedió a extraer el ADN genómico de cada uno de ellos. A continuación, se seleccionaron dianas genéticas con alta especificidad y conservación, y las regiones correspondientes a dominios conservados entre cepas de la misma especie fueron seleccionadas para el diseño de los cebadores. Paralelamente, para la detección y cuantificación por qRTi-PCR de cuatro microorganismos y una familia de patógenos de origen alimentario de los microorganismos detectados originalmente, se diseñaron nuevos cebadores y sondas TaqMan®.

Así, en base a estos conjuntos de parejas de cebadores, se han desarrollado los distintos aspectos inventivos que forman parte de la presente invención y que serán descritos en detalle a continuación. Previamente a la descripción de dichos aspectos inventivos, se incluye un listado de definiciones donde se explica el significado de los términos empleados en el contexto de la presente invención para ayudar en la comprensión de la misma.

Definiciones

10 “un”/“una”

El uso de la palabra “un” o “una” cuando se usa junto con el término “comprender” o “comprende” en las reivindicaciones y/o la descripción puede significar “uno”, pero también es consistente con el significado de “uno o más”, “al menos uno” y “uno o más de uno”.

15

PCR

PCR corresponde a las siglas de reacción en cadena de la polimerasa mediante la cual se pueden obtener millones de copias de las regiones de ADN deseadas. Se caracteriza por el empleo de parejas de cebadores que acotan la región de la que se realizarán millones de copias, lo que también se conoce como “amplificar ADN” durante la PCR. La PCR está compuesta por un número determinado de ciclos, compuestos a su vez por tres fases en las que las hebras de ADN se separan, se unen los cebadores y se elongan las nuevas hebras de ADN. En cada ciclo, si la eficiencia de la reacción es del 100% se produce un crecimiento exponencial de los fragmentos de ADN objeto de la amplificación.

25

Reacción de amplificación multiplex

En la presente invención se entiende por “Reacción de amplificación multiplex” a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la cual se amplifica más de una secuencia de ADN en una misma reacción, mediante el empleo de dos o más parejas de cebadores en un único tubo junto con el resto de los reactivos de la reacción con el fin de amplificar simultáneamente múltiples secuencias de ADN.

30

Reacción de amplificación a Tiempo Real o Cuantitativa

En la presente invención se entiende por PCR cuantitativa (qPCR) o PCR en tiempo real (qRTi-qPCR) a una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

35

utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta la cantidad de ADN o ARN presente en la muestra original.

Oligonucleótido

5 El término “oligonucleótido” hace referencia a la secuencia de bases de nucleótidos unidos por enlaces fosfo-diéster, habitualmente no mayor de 50 nucleótidos.

Cebador

10 En la presente invención se entiende por “cebador” o “*primer*” u “oligonucleótido” (“oligo”) a la secuencia de nucleótidos a partir de la cual la ADN polimerasa inicia la síntesis de una molécula nueva de ADN. Los cebadores son secuencias nucleotídicas cortas, aproximadamente de 15-24 nucleótidos de longitud que se pueden alinear con una hebra de ADN diana gracias a la complementariedad de bases para formar un híbrido entre el cebador y la hebra diana de ADN. Después, el enzima ADN
15 polimerasa puede extender el cebador a lo largo de la hebra diana de ADN. Los métodos para preparar y usar cebadores son ampliamente conocidos por el experto en la materia.

Pareja de cebadores

20 En el contexto de la presente invención se entiende por “pareja de cebadores” o “primer pair”, al conjunto de dos cebadores que, empleados en una misma reacción de amplificación o PCR, permiten obtener múltiples copias de una secuencia diana de ADN.

25 Cada uno de los cebadores hibrida con la secuencia diana, de manera que se amplifica la secuencia de nucleótidos acotada mediante cada pareja de cebadores. La extensión de los cebadores durante los ciclos de PCR determina la multiplicación exponencial 2^N de la secuencia de nucleótidos acotada por los cebadores, siendo N el número de ciclos de la reacción PCR.

30

Muestra

En el contexto de la presente invención, se entiende por “muestra” cualquier materia susceptible de contener ADN.

35

Alícuota

En el contexto de la presente invención, se entiende por “alícuota” a la parte que se toma de un volumen (alícuota líquida) o de una masa (alícuota sólida) iniciales, para ser usada en una prueba de laboratorio, cuyas propiedades físicas y químicas, así como su composición, representan las de la sustancia original. Normalmente las alícuotas son el resultado de repartir un volumen inicial en varias partes iguales.

Método de la invención

Los inventores han diseñado un conjunto de parejas de cebadores que, empleados en una PCR multiplex, permite detectar la presencia de los principales microorganismos patógenos alimentarios.

Así, en un primer aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para la detección simultánea de *Campylobacter jejuni*, *Cronobacter sakazakii*, una cepa enterohemorrágica de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* en una muestra; de aquí en adelante “método de la invención”, que comprende:

- a) Aislar el ADN de dicha muestra,
- b) Llevar a cabo una PCR multiplex sobre el ADN aislado en la etapa a) mediante el empleo de las siguientes parejas de cebadores:
 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 3 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 4 diseñados para amplificar *C. jejuni*,
 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 7 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 8 diseñados para amplificar *C. sakazakii*,
 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 11 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 12 diseñados para amplificar una cepa enterohemorrágica de *E. coli*,
 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 15 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 16 diseñados para amplificar *L. monocytogenes*,

- La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 17 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 18 diseñados para amplificar *Salmonella spp.*
 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 19 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 20 diseñados para amplificar *Shigella spp.* y
- 5
- c) Detectar los productos de amplificación obtenidos en la etapa b).

En una realización particular del método de la invención, la cepa enterohemorrágica de *E. coli* es *E. coli* O157:H7, la especie de *Salmonella spp.* es *Salmonella enterica* y/o la especie de *Shigella spp.* es *Shigella dysenteriae*.

10

En una primera etapa [etapa a)], el método de la invención comprende aislar o extraer el ADN de una muestra, para lo cual es necesario la recolección de la misma.

15

La recogida de muestras debe hacerse con el protocolo y la metodología adecuada en función de las características de la muestra, es decir, si es una muestra líquida, sólida, congelada, liofilizada etc. Como sabe el experto en la materia, la recolección de la muestra se debe efectuar evitando toda contaminación externa, tanto ambiental como humana para asegurar la integridad de misma y unos resultados fiables. Es necesario emplear recipientes limpios, secos, libres de fugas, de boca ancha, estériles y de un tamaño apropiado a la muestra. Asimismo, las condiciones de conservación, el transporte, el tiempo comprendido entre la recolección de la muestra y su entrega en el laboratorio, así como la realización del análisis influyen en los resultados obtenidos ya que la población microbiana puede sufrir cambios cualitativos y cuantitativos. Todas estas consideraciones son ampliamente conocidas por el experto en la materia, y los protocolos y procedimientos de recogida de muestras están claramente estandarizados y establecidos por las autoridades competentes.

20

25

Cualquier muestra susceptible de estar contaminada con *Campylobacter jejuni*, *Cronobacter sakazakii*, una cepa enterohemorrágica de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* puede ser analizada con el método de la invención. No obstante, en una realización particular, la muestra es una muestra de alimento que, en otra realización todavía más particular, el alimento es un producto lácteo, un producto cárnico, pescado, huevo, un ovoderivado, un vegetal, un producto de pastelería, una comida preparada o una bebida. El protocolo y la metodología para

30

35

recoger muestras procedentes de estos productos son ampliamente conocidos y práctica de rutina para el experto en la materia.

5 Una vez recogida la muestra esta debe llevarse al laboratorio donde será procesada para extraer el ADN. El procesamiento de la muestra puede llevarse a cabo inmediatamente después de ser recibida por el laboratorio o puede ser procesada más tarde, en cuyo caso la muestra debe ser almacenada hasta su uso. Como sabe el experto en la materia, el almacenamiento debe realizarse en las condiciones adecuadas, siendo lo más habitual congelarlas a -20° C. Cuando la muestra vaya a ser analizada, ésta deberá ser descongelada siguiendo los protocolos estándar establecidos para tal propósito y ampliamente conocidos por el experto en la materia.

15 En el caso de las muestras alimentarias puede presentarse una distribución no homogénea de los microorganismos. Por lo tanto, para asegurar una distribución lo más uniforme posible, previamente a la extracción del ADN puede ser conveniente homogenizar la muestra. Esto puede hacerse mediante el empleo, por ejemplo, del aparato Stomacher®, en el que unas paletas golpean ligeramente la muestra previamente introducida en una bolsa de plástico junto con un diluyente. Dicho golpeteo liberará a las bacterias de las partículas de alimento, debido en parte a la agitación violenta del líquido y en parte por la compresión que sufre la muestra por las paletas. No es necesaria una homogenización completa de la muestra.

25 Una vez obtenida la muestra, esta debe ser procesada para obtener el ADN de la misma. La extracción de ADN consta de una etapa de lisis, que consiste en romper las estructuras que confinan el citoplasma y liberar al medio su contenido, y otra de purificación, que implica la retirada de la solución final de la mayoría de elementos que pueden interferir en la PCR. La extracción del ADN puede llevarse a cabo usando cualquier método conocido por los expertos en la materia que incluyen, sin limitarse a, 30 centrifugaciones en gradientes de densidad, extracción en dos fases usando fenol acuoso o cloroformo con etanol, cromatografía en columna, métodos basados en la capacidad del ADN para unirse en superficies de cristal y/o silicatos, como preparaciones de tierra diatomeas o lechos de cristal, empleando kits comerciales, por ejemplo, los kits “Q-Biogene fast DNA kit” o el “QIAamp(R) DNA Blood Mini Kit”

(Qiagen, Hilden, Alemania) o el "G-Spin IIp" (Intron Biotechnology, Corea) o el "Fast Prep System Bio 101" (Qbiogene, Madrid, España) o PrepMan Ultra (Invitrogen, USA).

5 Tras el aislamiento del ADN, el método de la invención comprende una etapa b), en la que se lleva a cabo una reacción de amplificación multiplex (PCR multiplex) sobre el ADN aislado en la etapa a). Las parejas de cebadores empleadas en dicha PCR multiplex son

- 10 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 3 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 4 diseñados para amplificar *C. jejuni*,
- La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 7 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 8 diseñados para amplificar *C. sakazakii*,
- 15 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 11 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 12 diseñados para amplificar una cepa enterohemorrágica de *E. coli*,
- La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 15 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 16 diseñados para amplificar *L. monocytogenes*,
- 20 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 17 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 18 diseñados para amplificar *Salmonella spp.*
- La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 19 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 20 diseñados para amplificar *Shigella spp.* .
- 25

En una realización particular, el método de la invención comprende adicionalmente, la detección de al menos 1, preferiblemente 2, 3, 4 o 5 de los microorganismos seleccionados de la lista que consiste en *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, un microorganismo de la familia *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* mediante el empleo de las siguientes parejas de cebadores:

30

- La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 2 diseñados para amplificar *B. cereus*,

- La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 5 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 6 diseñados para amplificar *C. perfringens*,
- La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 13 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 14 diseñados para amplificar un microorganismo de la familia *Enterobacteriaceae*,
- La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 9 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 10 diseñados para amplificar *E. coli*, o
- La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 21 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 22 diseñada para amplificar *S. aureus*.

Las secuencias de nucleótidos de las parejas de cebadores se muestran en la Tabla 1.

Microorganismo	Cebador	Secuencia (5' - 3')	Tm (°C)	Amplificación (pb)
<i>Bacillus cereus</i>	GVR-BC-Mpx-up (SEQ ID NO: 1)	GCGTACTGAGTTAGAGAACGGT	56° C	132
	GVR-BC-Mpx-rp (SEQ ID NO: 2)	TTTGCTTGCTTTGCATACGGA		
<i>Campylobacter jejuni</i>	GVR-CJ-Mpx-up (SEQ ID NO: 3)	GAGTGAGGCGAAATTCCAAC		251
	GVR-CJ-Mpx-rp (SEQ ID NO: 4)	TCTCATCTCCCTTGCCATTG		
<i>Clostridium perfringens</i>	GVR-CP-Mpx-up (SEQ ID NO: 5)	TGGGAAAGTTCTTTCAACACC		116
	GVR-CP-Mpx-rp	GAGAAAGAATCCAAGTATTCTGAAGG		

	(SEQ ID NO: 6)			
<i>Cronobacter sakazakii</i>	GVR-CS-Mpx-up (SEQ ID NO: 7)	TGGCATCATCAACACTTTCGT	207	
	GVR-CS-Mpx-rp (SEQ ID NO: 8)	TCGACTACTACCTGGTGGACG		
<i>Escherichia coli</i>	GVR-EC-Mpx-up (SEQ ID NO: 9)	GTTGGTGGGAAAGCGCGTTACA	70	
	GVR-EC-Mpx-rp (SEQ ID NO: 10)	CGTTAAAACTGCCTGGCACAG		
Cepa enterohemorrágica de <i>E. coli</i>	GVR-H7-Mpx-up (SEQ ID NO: 11)	TGGGTACTGTGCCTGTACTG	216	
	GVR-H7-Mpx-rp (SEQ ID NO: 12)	AAGCCCTCGTATATCCACAGC		
Fam. <i>Enterobacteriaceae</i>	GVR-EB-Mpx-up (SEQ ID NO: 13)	TCAGAGTTCCCGAAGGCACTC	77	
	GVR-EB-Mpx-rp (SEQ ID NO: 14)	GCAACGCGAAGAACCTTACCT		
<i>Listeria monocytogenes</i>	GVR-LM-Mpx-up (SEQ ID NO: 15)	TGACGAAATGGCTTACAGTGA	163	
	GVR-LM-Mpx-rp (SEQ ID NO: 16)	GCCGAAGTTTACATTCAAGCT		

<i>Salmonella spp.</i>	GVR-SE-Mpx-up (SEQ ID NO: 17)	CCCGATTTTCTCTGGATGGT	176
	GVR-SE-Mpx-rp (SEQ ID NO: 18)	GGCAATAGCGTCACCTTTGA	
<i>Shigella spp.</i>	GVR-SH-Mpx-up (SEQ ID NO: 19)	TCAAAACACATTGATGAGTATCAGG	150
	GVR-SH-Mpx-rp (SEQ ID NO: 20)	TACATCTTTTTGACCGGACTTCTTA	
<i>Staphylococcus aureus</i>	GVR-SA-Mpx-up (SEQ ID NO: 21)	GCAACTGAAACAACAGAAGCT	101
	GVR-SA-Mpx-rp (SEQ ID NO: 22)	TCACGGATACCTGTACCAGCA	

Tabla 1: parejas de cebadores del método de la invención.

En total, el método de la invención permite la detección simultánea de hasta 11 tipos de microorganismos distintos, es decir, 7 especies (*Campylobacter jejuni*,
 5 *Cronobacter sakazakii*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*,
Listeria monocytogenes y *Staphylococcus aureus*), una familia (familia *Enterobacteriaceae*), dos géneros (*Salmonella spp.* y *Shigella spp.*) y una cepa (las cepas enterohemorrágicas de *Escherichia coli*).

10 Como entiende el experto en la materia, una reacción de amplificación multiplex requiere una serie de reactivos, entre los que se incluyen, sin limitar a, el ADN molde, la enzima ADN polimerasa, al menos, dos parejas de cebadores (siendo cada cebador de cada pareja complementario a una de las dos hebras del ADN), desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), cloruro de magnesio (MgCl₂), *buffer* de reacción y aditivos
 15 opcionales, que pueden añadirse por separado mezclándose en el laboratorio o

adquirir previamente mezclados, como es el caso de Qiagen Multiplex PCR Kit (Qiagen, Valencia, CA), al que se le añaden las parejas de cebadores en las concentraciones adecuadas y el ADN molde. La PCR se lleva a cabo en un termociclador que realiza los ciclos en los tiempos y temperaturas programadas de forma exacta, tales como la temperatura de hibridación, que depende de la temperatura de fusión de cada uno de los cebadores utilizados en la reacción o la temperatura de extensión.

Tras llevar a cabo la PCR multiplex de la etapa b), el método de la invención comprende la detección de los productos de amplificación [etapa c)], lo cual puede llevarse a cabo por cualquiera de los métodos descritos en el estado de la técnica.

Tras finalizar la reacción de amplificación multiplex, se puede proceder a separar los productos de amplificación o amplicones. Prácticamente cualquier método convencional empleado para separar los productos de amplificación puede ser utilizado dentro del marco de la presente invención. Las técnicas para separar los productos de amplificación están ampliamente descritas en el estado de la técnica. Técnicas para separar los productos de amplificación incluyen, sin limitar a, electroforesis sumergida con geles de Methafor, electroforesis en geles de poliacrilamida y electroforesis capilar. Seguidamente a la separación de los productos de amplificación, se procede a identificar el tamaño de los fragmentos separados, para lo cual puede emplearse cualquiera de los procedimientos de identificación de fragmentos de amplificación conocidos del estado de la técnica, tales como hibridación con sondas marcadas (por ejemplo con un fluoróforo) que serán detectadas por un detector y procesadas mediante un sistema informático, tinción, por ejemplo, con bromuro de etidio, tinción de plata, etc. Tal como entiende el experto en la materia, si todo este proceso es integrado en un sistema informático, se puede generar una gráfica denominada electroferograma donde puede identificarse el tamaño de los fragmentos amplificados.

Opcionalmente, si se desea, puede llevarse a cabo el marcaje de los cebadores que participan en dicha reacción de amplificación multiplex con el fin de poder detectar posteriormente los fragmentos amplificados. El marcaje de los productos de amplificación puede realizarse por métodos convencionales. Dicho marcaje puede ser directo, para lo cual pueden utilizarse fluoróforos, por ejemplo, Cy3, Cy5, fluoresceína, alexa, etc., enzimas, por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa, etc., isotopos

radiactivos, por ejemplo, ^{33}P , ^{125}I , etc., o cualquier otro marcador conocido por el experto en la materia. Alternativamente, dicho marcaje puede ser indirecto mediante el empleo de métodos químicos, enzimáticos, etc.; a modo ilustrativo, el producto de amplificación puede incorporar un miembro de un par de unión específica, por ejemplo, avidina o estreptavidina conjugada con un fluorocromo (patógeno), y la sonda se une al otro miembro del par de unión específica, por ejemplo, biotina (indicador), efectuándose la lectura mediante fluorimetría, etc., o bien, el producto de amplificación puede incorporar un miembro de un par de unión específica, por ejemplo, un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con una enzima (locus), y la sonda se une al otro miembro del par de unión específica, por ejemplo, digoxigenina (indicador), etc., transformándose el sustrato de la enzima en un producto luminiscente o fluorescente y efectuándose la lectura mediante quimio-luminiscencia, fluorimetría, etc. Así, el marcaje del producto de amplificación se lleva a cabo mediante el marcaje, en uno de sus extremos, de uno de los oligonucleótidos de cada pareja de cebadores. El compuesto empleado en el marcaje de los oligonucleótidos se selecciona del grupo que consiste en un radioisótopo, un material fluorescente, digoxigenina y biotina. Ejemplos de materiales fluorescentes que se pueden emplear en el marcaje de oligonucleótidos incluyen, sin limitar a, 5-carboxifluoresceína (5-FAM), 6-FAM, análogo tetraclorinado de t-FAM (TET), análogo hexaclorinado de 6-FAM (HEX), 6-carboxitetrametilrodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína (JOE), NED, Cy-3, Cy-5, Cy-5.5, fluoresceína-6-isotiocinato (FITC) y tetrametilrodamina-5-isotiocinato (TRITC).

Una vez identificados los microorganismos objeto del método de detección de la invención, puede ser deseable cuantificar algunos de ellos, es decir, conocer la cantidad de microorganismos presentes en el producto de partida de donde procede la muestra. A modo de ejemplo, la legislación europea permite en el caso de *E. coli* un máximo de 500 UFC/g de carne picada para consumo humano (unidades formadoras de colonia/g), siempre y cuando no se trate de cepas enterohemorrágicas, en cuyo caso el límite máximo permitido es 0 UFC/g.

Como sabe el experto en la materia, para conseguir una cuantificación lo más precisa posible, ésta tendría que hacerse sobre la muestra tomada inicialmente, la cual ya ha sido empleada en el método de detección. Por este motivo, a la hora de poner en práctica el método de la invención y querer cuantificar algunos de los microorganismos detectados, es conveniente dividir en varias alícuotas la muestra

tomada inicialmente ya homogenizada. De esta forma, una de las alícuotas es empleada en el método de detección y la otra (procedente de la misma muestra recolectada) será empleada en la cuantificación de los microorganismos detectados.

Por lo tanto, en una realización particular, el método de la invención adicionalmente comprende, previamente a la etapa a), la homogeneización de la muestra y la posterior extracción de dos o más alícuotas de la muestra homogeneizada, en donde, una de las alícuotas es empleada en la etapa a) y la otra es empleada en caso de que se quiera cuantificar los microorganismos detectados previamente. Una vez que se tienen las alícuotas, una se emplea en la detección y la otra puede ser conservada o almacenada en caso de que sea necesario su posterior uso.

Como sabe el experto en la materia, en el caso de productos alimentarios, hay determinados microorganismos que, aunque patógenos, pueden estar presentes en el alimento que va a destinarse al consumo humano o animal siempre y cuando la salud del individuo no se vea comprometida, lo cual viene determinado por el número de células de estos patógenos presentes en ese alimento. Entre estos microorganismos se incluyen, pero no se limitan a, *B. cereus*, *C. perfringens*, un microorganismo de la Familia *Enterobacteriaceae*, *E. coli* y/o *S. aureus*. Por lo tanto, si su presencia es detectada en la muestra tras aplicar el método de la invención, es deseable conocer la concentración del microorganismo/s detectado/s presente/s en la misma, por lo que tiene/n que ser cuantificado/s. La cuantificación puede realizarse por cualquiera de los métodos que existen en el estado de la técnica y que son empleados en los laboratorios de análisis microbiológicos de forma rutinaria. No obstante, en una realización particular, el método de cuantificación elegido es una PCR a Tiempo Real o PCR cuantitativa. Para ello, los inventores han diseñado parejas de cebadores y sondas dirigidos específicamente a *B. cereus*, *C. perfringens*, un microorganismo de la Familia *Enterobacteriaceae*, *E. coli* y/o *S. aureus*. Las parejas de cebadores y sondas dirigidos específicamente a estos microorganismos se describen en la Tablas 2 y 3.

Microorganismo	Cebador	Secuencia (5' - 3')	Tm (°C)
<i>B. cereus</i>	RT-GVR-BC-up (SEQ ID NO: 23)	GGTCGTAGTAGTGGAAGCGAATG	60
	RT-GVR-BC-rp (SEQ ID NO: 24)	AACGTTAGGAAACTATTCATC	
<i>C. perfringens</i>	RT-GVR-CP-up (SEQ ID NO: 25)	TGGGAAAGTTCTTTCAACACC	
	RT-GVR-CP-rp (SEQ ID NO: 26)	AAAAACAAAACGGTGGATTAAGAG	
Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	RT-GVR-EB-up	CGCGAAGAACCTTACCTACTCTTG	

	(SEQ ID NO: 27)		
	RT-GVR-EB-rp (SEQ ID NO: 28)	TCCCGAAGGCACTCCTCTATC	
<i>E. coli</i>	RT-GVR-EC-up (SEQ ID NO: 29)	TGGTGATTACCGACGAAAACG	
	RT-GVR-EC-rp (SEQ ID NO: 30)	CCGGCGTAGTTAAAGAAATCATG	
<i>S. aureus</i>	RT-GVR-SA-up (SEQ ID NO: 31)	CCGCAATTTAACAAAACACC	
	RT-GVR-SA-rp (SEQ ID NO: 32)	TGGTCTCGCTTCATATCCAA	

Tabla 2: parejas de cebadores empleados en la cuantificación de *B. cereus*, *C. perfringens*, un microorganismo de la Familia *Enterobacteriaceae*, *E. coli* y/o *S. aureus*

Microorganismo	Sonda	Secuencia (5' - 3')	Fluoróforo	T _m (°C)
<i>B. cereus</i>	TaqMan-GVR-BC1 (SEQ ID NO: 33)	AACGTTAGGAAACTATTCATC	6-FAM	60
	TaqMan-GVR-BC2 (SEQ ID NO: 34)	AACGTTAGGAAACTATTCATC	VIC	
<i>C. perfringens</i>	TaqMan-GVR-CP (SEQ ID NO: 35)	TAACTCAATTCAACATAGGTGACA	VIC	
Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	TaqMan-GVR-EB (SEQ ID NO: 36)	CATCCAGAGAATCCTTT	Cy5	
<i>E. coli</i>	TaqMan-GVR-EC (SEQ ID NO: 37)	CAAGAAAAAGCAGTCTTAC	NED	
<i>S. aureus</i>	TaqMan-GVR-SA (SEQ ID NO: 38)	CGTGAATACAACGATGGAACA	FAM	
Control Interno de Amplificación (IAC)	TaqMan-GVR-IAC1 (SEQ ID NO: 39)	AACCGTCAGGAACCCAGAC	NED	
	TaqMan-GVR-IAC2 (SEQ ID NO: 40)	AACCGTCAGGAACCCAGAC	VIC	
	TaqMan-GVR-IAC3 (SEQ ID NO: 41)	AACCGTCAGGAACCCAGAC	FAM	

Tabla 3: sondas empleadas en la cuantificación de *B. cereus*, *C. perfringens*, un microorganismo de la Familia *Enterobacteriaceae*, *E. coli* y/o *S. aureus*.

5

Así, en una realización particular del método de la invención, si *B. cereus*, *C. perfringens*, un microorganismo de la Familia *Enterobacteriaceae*, *E. coli* y/o *S. aureus* son detectados en la etapa c), entonces, el método comprende adicionalmente las siguientes etapas:

- 5 d) Aislar el ADN de una de las alícuotas obtenidas previamente a la etapa a),
 e) Llevar a cabo una PCR a Tiempo Real (qRTi-PCR) del ADN aislado en la etapa d) de dichos microorganismos con las siguientes parejas de cebadores y sondas:

- 10 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 23 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 24, y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 34 si el microorganismo a detectar es *B. cereus*,
- 15 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 25 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 26, y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID NO: 35 si el microorganismo a detectar es *C. perfringens*,
- La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 27 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 28, y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID NO: 36 si el microorganismo a detectar es de la familia *Enterobacteriaceae*,
- 20 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 29 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 30, y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID NO: 37 si el microorganismo a detectar es *E. coli*, y/o
- 25 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 31 y el oligonucleótido que comprende la SEQ ID NO: 32, y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID NO: 38 si el microorganismo a detectar es *S. aureus*, y

f) cuantificar los productos amplificados en la etapa e).

30 Con la finalidad de que la qRTi-PCR sea lo más fiable posible, los inventores han diseñado sondas que permiten detectar el control interno de la amplificación o IAC (del inglés, *Internal Amplification Control*) con el fin de validar la precisión de la qRTi-PCR, permitiendo distinguir resultados negativos verdaderos de falsos negativos causados por un mal funcionamiento de la PCR (debido a inhibiciones, deterioro de los reactivos de PCR, etc.). Los inventores han diseñado un IAC de tipo quimérico que posee una
 35 secuencia de ADN heterólogo a todos los microorganismos de estudio y que consiste

en una zona interna al gen que codifica la enzima cinnamoil-CoA-reductasa de *Eucalyptus globulus*. Flanqueando esta región de ADN heterólogo se han añadido las secuencias correspondientes a los sitios de hibridación de las cinco parejas de cebadores diseñados para la amplificación por qRTi-PCR de los cinco patógenos a cuantificar. Dicho IAC consiste en la amplificación independiente de una secuencia de ADN artificial que es co-amplificada con el ADN diana del patógeno durante la PCR. El IAC está incorporado a la mezcla de reacción a una concentración cuidadosamente ajustada, de modo que la especificidad y sensibilidad del test no resultan afectadas por la amplificación competitiva de ambos ADNs. Así pues, la señal de amplificación del IAC puede desaparecer en muestras positivas con un alto contenido de ADN del patógeno. No obstante, la señal del IAC debe detectarse siempre en las muestras negativas (ausencia del patógeno). Si no se obtiene señal del IAC ni del patógeno, deberá aclararse la causa del mal funcionamiento de la reacción de PCR, verificando la integridad de los reactivos de PCR o aplicando soluciones alternativas para eliminar los problemas de inhibición.

Por lo tanto, en una realización particular del método de la invención, la qRTi-PCR comprende al menos una sonda para el control interno de amplificación seleccionada de la lista que consiste en:

- 20 - La sonda de ácido nucleico que comprende el oligonucleótido SEQ ID NO: 39 en el caso de que el microorganismo cuantificado sea *E. coli*, un microorganismo de la Familia *Enterobacteriaceae* o *S. aureus*,
- La sonda de ácido nucleico que comprende el oligonucleótido SEQ ID NO: 41 en caso de que el microorganismo cuantificado sea *C. perfringens* o *E.coli*, y
- 25 - La sonda de ácido nucleico que comprende el oligonucleótido SEQ ID NO: 40 en caso de que el microorganismo cuantificado sea *B. cereus*, *C. perfringens*, *E. coli*, un microorganismo de la Familia *Enterobacteriaceae* o *S. aureus*.

En una realización particular, las sondas empleadas en el método de la invención están marcadas en uno de sus extremos que, en otra realización todavía más particular, el compuesto con el que se lleva a cabo el marcaje es un fluoróforo. Ejemplos de fluoróforos que se pueden emplear en el marcaje de las sondas incluyen, sin limitar a, 5-carboxifluoresceína (5-FAM), 6-FAM, análogo tetraclorinado de t-FAM (TET), análogo hexaclorinado de 6-FAM (HEX), 6-carboxitetrametilrodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-

dimetoxifluoresceína (JOE), NED, Cy-3 , Cy-5, Cy-5.5, fluoresceína-6-isotiocinato (FITC) y tetrametilrodamina-5-isotiocinato (TRITC).

5 Finalmente, tras llevar a cabo la reacción de qRTi-PCR, se procede a la cuantificación de los productos amplificados.

10 Tal como se ha explicado previamente a lo largo de la descripción, el método de la invención comprende la detección de microorganismos patógenos mediante una PCR multiplex. Sin embargo, si los microorganismos están una concentración muy baja en la muestra, es posible que estos no sean detectados. Para evitar esta posibilidad y asegurar que, por muy baja que sea la concentración de los microorganismos en la muestra, estos van a ser detectados, es aconsejable incubar previamente la muestra en un medio de enriquecimiento. Por lo tanto, en una realización particular, previamente a la etapa a), el método de la invención comprende el cultivo de la muestra en un medio de enriquecimiento.

15 Alternativamente, si además de detectar los microorganismos presentes en la muestra se deseara cuantificar los mismos en caso de que sean detectados, entonces tal como se ha explicado previamente, la muestra es homogeneizada y dividida en dos o más alícuotas, en donde solo la alícuota empleada en la etapa a) del método es cultivada en un medio de enriquecimiento, mientras que el resto de alícuotas serán empleadas en la cuantificación posterior. Por lo tanto, en otra realización particular, la alícuota empleada en la etapa a) es cultivada en un medio de enriquecimiento. El tiempo de incubación varía en función de los microorganismos que vayan a ser detectados (por ejemplo, entre 16 y 48 horas para *C. jejuni*, y entre 16 y 24 horas para *C. sakazakii*, una cepa enterohemorrágica de *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella spp.* y *Shigella spp.*), y su elección es práctica de rutina para el experto en la materia. Por lo tanto, en una realización particular, el tiempo de incubación de la muestra en el medio de cultivo de enriquecimiento es entre 16 y 48 horas, preferiblemente entre 16 y 24 horas.

30 Como sabe el experto en la materia, a la hora de elegir el cultivo de enriquecimiento éste debe cubrir las necesidades específicas del microorganismo/s que va/n a ser cultivado/s para que se produzca el crecimiento del mismo/los mismos. Así, dependiendo del microorganismo/s que vaya/n a ser detectado/s, el medio de enriquecimiento a emplear será uno u otro. Cultivos de enriquecimiento adecuados para el crecimiento de los microorganismos que son detectados mediante el método

de la invención están disponibles comercialmente. No obstante, el medio de enriquecimiento también puede prepararse en el laboratorio, en cuyo caso los ingredientes a incluir en el medio también están disponibles comercialmente, y los requisitos nutricionales de los microorganismos están descritos en el estado de la técnica. Partiendo de esta información, se puede elaborar un medio de enriquecimiento adecuado para el/los microorganismo/s detectados. Así, en una realización particular, el medio de cultivo de enriquecimiento comprende Agua de Peptona Tamponada, Sangre de Caballo Desfibrinada y Hemolisada, Manitol y Suplemento de Crecimiento de *Campylobacter*. Este medio de enriquecimiento es adecuado para la incubación simultánea de todos los microorganismos detectados mediante el empleo del método de la invención. En una realización particular, el medio de enriquecimiento comprende

- entre 5-100 mL de sangre de caballo desfibrinada y hemolisada por cada 500 mL de medio,
- entre 2,5-80 g de manitol por cada 500 mL de medio, y/o
- entre 1-8 mL de suplemento de crecimiento de *Campylobacter* por cada 500 mL de medio.

Conjunto de parejas de cebadores de la invención

Los inventores han desarrollado un método para la detección simultánea de microorganismos patógenos alimentarios basado en un conjunto de parejas de cebadores diseñados específicamente para detectar de forma simultánea hasta 11 tipos de microorganismos patógenos mediante una PCR multiplex.

Por lo tanto, en un segundo aspecto, la invención se relaciona con un conjunto de parejas de cebadores, de aquí en adelante “conjunto de parejas de cebadores de la invención”, que comprende

- La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 3 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 4 diseñados para amplificar *C. jejuni*,
- La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 7 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 8 diseñados para amplificar *C. sakazakii*,

- La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 11 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 12 diseñados para amplificar una cepa enterohemorrágica de *E. coli*,
- 5 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 15 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 16 diseñados para amplificar *L. monocytogenes*,
- La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 17 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 18 diseñados para amplificar *Salmonella spp.*,
- 10 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 19 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 20 diseñados para amplificar *Shigella spp.*, y

15 En una realización particular, la cepa hemorrágica de *E. coli* es *E. coli* O157:H7, la especie de *Salmonella spp.* es *Salmonella enterica* y/o la especie de *Shigella spp.* es *Shigella dysenteriae*.

20 Adicionalmente, las parejas de cebadores que forman parte del conjunto de parejas de cebadores de la invención han sido diseñadas para que, si se desea, puedan emplearse simultáneamente con una o más parejas de cebadores dirigidas a otros microorganismos de interés, como son, *C. perfringens*, un microorganismo de la familia *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, *S. aureus* o *B. cereus*.

25 Por lo tanto, en una realización particular, el conjunto de parejas de cebadores de la invención comprende, además, 1, preferiblemente 2, 3, 4 ó 5 de las parejas de cebadores seleccionadas de la lista que consiste en:

- La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 5 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 6 diseñados para amplificar *C. perfringens*,
- 30 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 13 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 14 diseñados para amplificar la familia *Enterobacteriaceae*,
- La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 9 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 10 diseñados para amplificar *E. coli*,
- 35

- La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 21 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 22 diseñada para amplificar *S. aureus*, y
- La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 2 diseñados para amplificar *B. cereus*.

En total, el conjunto de parejas de cebadores de la invención permite la detección simultánea de 11 tipos de microorganismos entre los que se encuentran *Campylobacter jejuni*, *Cronobacter sakazakii*, una cepa enterohemorrágica de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, un microorganismo de la familia *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Por otro lado, de todos los microorganismos detectados mediante el conjunto de parejas de cebadores de la invención, puede ser deseable cuantificar algunos de ellos, es decir, conocer la cantidad de microorganismos presentes en el producto de partida de donde procede la muestra. Este es el caso de *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, un microorganismo de la familia *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. En el caso de productos alimentarios, la presencia de una determinada cantidad (concentración) de estos microorganismos en el producto de partida puede ser determinante para decidir si dicho producto es adecuado para el consumo humano.

Por este motivo, adicionalmente los inventores han diseñado unas parejas de cebadores y sondas que permiten la cuantificación de estos microorganismos. Por lo tanto, en otra realización todavía más particular, el conjunto de parejas de cebadores según la invención comprende, además, al menos 1, preferiblemente 2, 3, 4 o 5, de las parejas de cebadores y sondas seleccionadas del grupo que consiste en:

- La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 23 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 24, y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 34 si el microorganismo a detectar es *B. cereus*,
- La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 25 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ

ID NO: 26, y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID NO: 35 si el microorganismo a detectar es *C. perfringens*,

5 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 27 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 28, y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID NO: 36 si el microorganismo a detectar es de la familia *Enterobacteriaceae*,

10 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 29 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 30, y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID NO: 37 si el microorganismo a detectar es *E. coli*, y

15 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 31 y el oligonucleótido que comprende la SEQ ID NO: 32, y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID NO: 38 si el microorganismo a detectar es *S. aureus*.

20 La técnica de elección para llevar a cabo la cuantificación de *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, un microorganismo de la familia *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* es la PCR cuantitativa o a Tiempo Real. Por lo tanto, en una realización particular, las sondas están marcadas en uno de sus extremos que, en otra realización todavía más particular, están marcadas con un fluoróforo. Ejemplos de compuestos que pueden ser empleados como marcadores de las sondas han sido descritos previamente en el método de la invención. En otra realización particular, el conjunto de cebadores de la invención comprende, además de las parejas de cebadores y sondas SEQ ID NO: 1 a 38, al menos un control de

25 amplificación interna de la PCR cuantitativa seleccionado del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42..

Uso del conjunto de parejas de la invención

30 Los inventores han desarrollado un método para la detección simultánea de microorganismos patógenos alimentarios basado en un conjunto de parejas de cebadores diseñados específicamente para detectar de forma simultánea hasta 11 tipos de microorganismos patógenos mediante una PCR multiplex.

35 Por lo tanto, en un tercer aspecto, la invención se relaciona con el uso *in vitro* del conjunto de parejas de cebadores de la invención para la detección simultánea de *C.*

jejuni, *C. sakazakii*, una cepa enterohemorrágica de *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* En una realización particular, la cepa hemorrágica de *E. coli* es *E. coli* O157:H7, la especie de *Salmonella spp.* es *Salmonella enterica* y/o la especie de *Shigella spp.* es *Shigella dysenteriae*.

5

Tal como se ha explicado en el segundo aspecto inventivo, el conjunto de parejas de cebadores de la invención puede comprender, además, parejas de cebadores dirigidos a detectar *B. cereus*, *C. perfringens*, un microorganismo de la familia *Enterobacteriaceae*, *E. coli* y/o *S. aureus*.

10

Por lo tanto, en otra realización particular, la invención se relaciona con el uso del conjunto de parejas de cebadores de la invención para la detección simultánea de *C. jejuni*, *C. sakazakii*, una cepa enterohemorrágica de *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* y al menos 1, preferiblemente 2, 3, 4 o 5 de los microorganismos seleccionados de la lista que consiste en *B. cereus*, *C. perfringens*, un microorganismo de la familia *Enterobacteriaceae*, *E. coli* y *S. aureus*.

15

20

La forma en que el conjunto de parejas de cebadores de la invención puede emplearse en la detección de simultánea de *C. jejuni*, *C. sakazakii*, una cepa enterohemorrágica de *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* y al menos 1, preferiblemente 2, 3, 4 o 5 de los microorganismos seleccionados de la lista que consiste en *B. cereus*, *C. perfringens*, un microorganismo de la familia *Enterobacteriaceae*, *E. coli* y *S. aureus*, ha sido explicada en detalle en el primer aspecto inventivo.

25

Kit de la invención

30

Por otro lado, la invención se relaciona con un kit útil para la puesta en práctica del método de la invención, que comprende el conjunto de parejas de cebadores de la invención.

Así, en un cuarto aspecto, la invención se relaciona con un kit que comprende el conjunto de parejas de cebadores de la invención.

Como entiende el experto en la materia, el kit de la invención además de comprender el conjunto de parejas de cebadores de la invención, puede incluir, opcionalmente, los reactivos necesarios para llevar a cabo una reacción de amplificación multiplex, entre los que se incluyen, sin limitar a, desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), iones divalentes y/o monovalentes, una solución tampón (buffer) que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa, ADN polimerasa o mezcla de distintas polimerasas, etc. No obstante, si el kit de la invención no comprende los reactivos necesarios para poner en práctica el método de la invención, estos están disponibles comercialmente y pueden encontrarse formando parte de un kit. Cualquier kit de los disponibles comercialmente que contenga los reactivos necesarios para llevar a cabo una reacción de amplificación, puede emplearse con éxito en la puesta en práctica del método de la invención.

Por otro lado, el kit de la invención puede comprender las parejas de cebadores de la invención ya marcados, o los reactivos necesarios para llevar a cabo el marcaje de los mismos. Los distintos métodos que existen en el estado de la técnica para realizar el marcaje de los cebadores, así como los tipos de compuestos que se pueden emplear en dicho marcaje han sido explicados previamente en la presente memoria.

Asimismo, el kit de la invención también es útil en la puesta en práctica del método de invención. Por lo tanto, en un sexto aspecto, la invención se relaciona con el uso del kit de la invención para la detección simultánea de *C. jejuni*, *C. sakazakii*, una cepa enterohemorrágica de *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* En una realización particular, la cepa hemorrágica de *E. coli* es *E. coli* O157:H7, la especie de *Salmonella spp.* es *Salmonella entérica* y/o la especie de *Shigella spp.* es *Shigella dysenteriae*.

En otra realización particular, la invención se relaciona con el uso del kit de la invención para la detección simultánea de *C. jejuni*, *C. sakazakii*, una cepa enterohemorrágica de *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* y al menos 1, preferiblemente 2, 3, 4 o 5 de los microorganismos seleccionados de la lista que consiste en *B. cereus*, *C. perfringens*, un microorganismo de la familia *Enterobacteriaceae*, *E. coli* y *S. aureus*.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o

pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras simplemente ilustran la presente invención y no pretender ser limitativos de la misma.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Gel de agarosa. Optimización de cebadores GVR-BC-Mpx-up/rp, sobre ADN de *B. cereus* CECT 131, con cinco series de temperatura (Tm) y 16 combinaciones de concentración de cebadores.

10

Figura 2. Gel de agarosa. Optimización de cebadores GVR-CJ-Mpx-up/rp, sobre ADN de *C. jejuni* ATCC 49943, con cinco series de temperatura (Tm) y 16 combinaciones de concentración de cebadores.

15

Figura 3. Gel de agarosa. Optimización de cebadores GVR-CS-Mpx-up/rp, sobre ADN de *C. sakazakii* ATCC 894 BAA, con cinco series de temperatura (Tm) y 16 combinaciones de concentración de cebadores.

20

Figura 4. Gel de Agarosa. Optimización de cebadores GVR-CP-Mpx-up/rp, sobre ADN de *C. perfringens* CECT 376T, con cinco series de temperatura (Tm) y 16 combinaciones de concentración de cebadores.

25

Figura 5. Gel de agarosa. Optimización de cebadores GVR-EC-Mpx-up/rp, sobre ADN de *E. coli* CECT 4267, con cinco series de temperatura (Tm) y 16 combinaciones de concentración de cebadores.

30

Figura 6. Gel de agarosa. Optimización de cebadores GVR-H7-Mpx-up/rp, sobre ADN de *E. coli* O157.H7, con cinco series de temperatura (Tm) y 16 combinaciones de concentración de cebadores.

35

Figura 7. Gel de agarosa. Optimización de cebadores GVR-SE-Mpx-up/rp, sobre ADN de *S. enterica* CECT 443, con cinco series de temperatura (Tm) y 16 combinaciones de concentración de cebadores.

Figura 8. Gel de agarosa. Optimización de cebadores GVR-EB-Mpx-up/rp, sobre ADN de la enterobacteria *Pantoea ananatis* CECT 4858T, con cinco series de temperatura (Tm) y 16 combinaciones de concentración de cebadores.

5 **Figura 9.** Gel de agarosa. Optimización de cebadores GVR-LM-Mpx-up/rp, sobre ADN de *L. monocytogenes* CECT 911, con cinco series de temperatura (Tm) y 16 combinaciones de concentración de cebadores.

10 **Figura 10.** Gel de agarosa. Optimización de cebadores GVR-SA-Mpx-up/rp, sobre ADN de *S. aureus* CECT 240, con cinco series de temperatura (Tm) y 16 combinaciones de concentración de cebadores.

15 **Figura 11.** Gel de agarosa. Optimización de cebadores GVR-SH-Mpx-up/rp, sobre ADN de *S. dysenteriae* CECT 584, con cinco series de temperatura (Tm) y 16 combinaciones de concentración de cebadores.

20 **Figura 12.** Electroferograma. PCR múltiplex con 11 pares de cebadores y el ADNg de *B. cereus* (BC), *C. jejuni* (CJ), *C. perfringens* (CP), *C. sakazakii* (CS), *E. coli* (EC), *E. coli* O157:H7 (H7), Familia *Enterobacteriaceae* (EB), *L. monocytogenes* (LM), *Salmonella spp.* (SE), *Shigella spp.* (SH) y *S. aureus* (SA), a 56 °C.

25 **Figura 13A-B.** Electroferogramas. PCR múltiplex sobre ADNg de los dos grupos de microorganismos. (Fig. 13A) El electroferograma A corresponde a aquellos que pertenecen a la Familia *Enterobacteriaceae* (*C. sakazakii*, *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella spp.* y *Shigella spp.*) y (Fig. 13B) el electroferograma B, a aquellos no enterobacterias (*B. cereus*, *C. jejuni*, *C. perfringens*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*).

30 **Figuras 14A-K.** Electroferogramas de los productos de amplificación obtenidos por PCR múltiplex, para los 11 microorganismos de este trabajo, de forma independiente. En el eje de ordenadas (Y) se indica la intensidad de la fluorescencia detectada, y en el eje de abscisas (X), el tamaño en pares de bases (pb), indicándose sobre cada pico el mismo. (Fig. 15A) *C. jejuni*, (Fig. 15B) *B. cereus*, (Fig. 15C) *L. monocytogenes*, (Fig. 15D) *C. perfringens*, (Fig. 15E) Familia *Enterobacteriaceae*, (Fig. 15F) *C. sakazakii*, (Fig. 15G) *E. coli* O157:H7, (Fig. 15H) *S. aureus*, (Fig. 15I) *E. coli*, (Fig. 15J) *Shigella spp.* y (Fig. 15K) *Salmonella spp.*

35

Figuras 15A-B. Amplificaciones obtenidas por qRTi-PCR con diluciones decimales seriadas de ADNg de Familia *Enterobacteriaceae* (*Pantoea ananatis* CECT 48458) (Fig. 15A) y *S. aureus* CECT 240 (Fig. 15B), con el fin de establecer el umbral mínimo de detección alcanzado con las concentraciones optimizadas de cebadores y de sonda específicos.

Figuras 16A-C. Amplificaciones obtenidas por qRTi-PCR con diluciones decimales seriadas de ADNg de *E.coli* CECT 4167 (Fig. 16A); *B. cereus* CECT 131 (Fig. 16B) y *C. perfringens* CECT 376-T (Fig. 16C) con el fin de establecer el umbral mínimo de detección alcanzado con las concentraciones optimizadas de cebadores y de sonda específicos.

Figuras 17A-C. Curvas de amplificación obtenidas en qRTi-PCR con diluciones decimales del ADN de referencia stock de pGVR-QIAC y utilizando como *reporter* la sonda TaqMan-GVR-IAC1 (Fig. 17A); TaqMan-GVR-IAC2 (Fig. 17B) y TaqMan-GVR-IAC3 (Fig. 17C). En el eje de ordenadas se representa el valor de ΔR_n , mientras que en el eje de abscisas se indican los ciclos de amplificación.

Figuras 18A-C. Patrones obtenidos en la amplificación de las combinaciones dúplex de *C. perfringens*, según tabla 14, incorporando pGVR-QIAC y su respectiva sonda. (Fig. 18A) combinación *C. perfringens*/*E.coli*. (Fig. 18B) combinación *C. perfringens*/*S. aureus*. (Fig. 18C) combinación *perfringens*/*B. cereus*. CP= sonda TaqMan-GVR-CP (VIC); EC= sonda TaqMan-GVR-EC (NED); SA= sonda TaqMan-GVR-SA (FAM); IAC2= sonda TaqMan-GVR-IAC2 (NED); IAC3= sonda TaqMan-GVR-IAC3 (FAM).

Figuras 19A-B. Patrones obtenidos en la amplificación de las combinaciones dúplex de *E. coli*, según tabla 33, incorporando pGVR-QIAC y su respectiva sonda. (Fig. 19A) combinación *E. coli* / *S. aureus*. (Fig. 19B) combinación *E. coli* / *B. cereus*. EC= sonda TaqMan-GVR-EC (NED); SA= sonda TaqMan-GVR-SA (FAM); BC= sonda TaqMan-GVR-BC (FAM). IAC1= sonda TaqMan-GVR-IAC1 (VIC).

Figura 20. Patrones obtenidos en la amplificación de las combinaciones dúplex de *S. aureus* con *E. coli*, según tabla 14, incorporando pGVR-QIAC y su respectiva sonda. SA= sonda TaqMan-GVR-SA (FAM); BC2= sonda TaqMan-GVR-BC2 (VIC). IAC1= sonda TaqMan-GVR-IAC2 (NED).

Figuras 21A-D. Patrones obtenidos en la amplificación de las combinaciones dúplex de Familia *Enterobacteriaceae*, según tabla 14, incorporando pGVR-QIAC y su respectiva sonda. (Fig. 21A) combinación *Enterobacteriaceae* / *C. perfringens*. (Fig. 21B) combinación *Enterobacteriaceae* / *E. coli*. (Fig. 21C) combinación *Enterobacteriaceae* / *S. aureus*. (Fig. 21D) combinación *Enterobacteriaceae* / *B. cereus*. EB= sonda TaqMan-GVR-EB (Cy5); CP= sonda TaqMan-GVR-CP (VIC); BC= sonda TaqMan-GVR-BC (FAM).SA= sonda TaqMan-GVR-SA (FAM); EC= sonda TaqMan-GVR-EC (NED); IAC1= sonda TaqMan-GVR-IAC1 (VIC); IAC2= sonda TaqMan-GVR-IAC2 (NED).

10

Figura 22. Diagrama representativo de los pasos seguidos para la adición de los diferentes sitios de hibridación de los cebadores específicos (a cuatro microorganismos y una familia de patógenos de origen alimentario) a la secuencia heteróloga de *E. globulus* usada como control interno de amplificación.

15

Figura 23. Representación gráfica de la estructura final del control interno de amplificación quimérico elaborado.

Figuras 24A-H. Curvas de crecimiento obtenidas para: *B. cereus* (Fig.14A), *C. jejuni* (Fig. 24B), *C. perfringens* (Fig. 24C), *C. sakazakii* (Fig. 24D), *L. monocytogenes* (Fig. 24E), *S. aureus* (Fig.24F), *Salmonella enterica* (Fig. 24G) y *E. coli* (Fig. 24H)). Para la Familia *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, una cepa enterohemorrágica de *E. coli* (como la O157:H7) y *S. dysenteriae*, se ha utilizado la curva de la figura 24H.

25

Figura 25. Gel de electroforesis. Amplificación control obtenida a partir de una matriz contaminada artificialmente con *B. cereus* (BC), *C. jejuni* (CJ), *C. perfringens* (CP), *C. sakazakii* (CS), *E. coli* (EC), una cepa enterohemorrágica de *E. coli* (como la O157:H7) (H7), *P. ananatis* (Fam. *Enterobacteriaceae*) (EB), *L. monocytogenes* (LM), *Salmonella enterica*. (SE), *S. dysenteriae* (SD) y *S. aureus* (SA). Matriz: Carne roja (CR).

30

Figuras 26A-D. Amplificación obtenida a partir de matrices contaminadas artificialmente con: Fig. 27A: *C. jejuni* y cebadores GVR-CJ-Mpx-up/rp. Amplicón= 251 bp; Fig.2B: *E.coli* y cebadores GVR-EC-Mpx-up/rp. Amplicón: 70 bp; Fig. 27C: *E. coli* y cebadores GVR-H7-mpx-up/rp. Amplicón: 216 bp. Fig. 27D: *E. coli* y cebadores GVR-EB-Mpx-up/rp. Amplicón= 77 pb. Leyenda de matrices: CR= Carne roja; P= Pollo; S=

35

Salchicha fresca; E= Embutidos curados; F= Pescado fresco; CF= Conservas de
pescado; SF= Sopa de pescado; LC= Leche cruda; Y= Yogurt; N= Nata; Q= Queso;
Nt= Natillas; LP= Leche en polvo; FI1= Fórmula infantil 1; FI2= Fórmula infantil 2; HC=
Huevo crudo; HM= Huevo manufacturado; V= Vegetales; M=Miel; W/O= Medio sin
matriz; C+= control positivo PCR, C-= Control negativo PCR.

Figura 27A-B. Amplificación obtenida a partir de matrices contaminadas
artificialmente con: Fig. 28A: *S. aureus*, y cebadores GVR-SA-Mpx-up/rp. Amplicón=
101 pb. Fig. 28B: *S. dysenteriae* y cebadores GVR-SH-Mpx- up/rp. Amplicón= 150 pb.
Leyenda de matrices: CR= Carne roja; P= Pollo; S= Salchicha fresca; E= Embutidos
curados; F= Pescado fresco; CF= Conservas de pescado; SF= Sopa de pescado; LC=
Leche cruda; Y= Yogurt; N= Nata; Q= Queso; Nt= Natillas; LP= Leche en polvo; FI1=
Fórmula infantil 1; FI2= Fórmula infantil 2; HC= Huevo crudo; HM= Huevo
manufacturado; V= Vegetales; M=Miel; W/O= Medio sin matriz; C+= control positivo
PCR, C-= Control negativo PCR

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los
inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

Ejemplo 1

Detección de microorganismos patógenos mediante PCR multiplex y su posterior cuantificación

25

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas microbianas

30

1.1 Colección de microorganismos, medios y condiciones de cultivo.

Se ha generado una colección de 66 microorganismos formada por patógenos de
origen alimentario y bacterias interferentes que pueden encontrarse tanto en matrices
alimentarias, como en el ambiente. Las cepas tipo fueron suministradas por la
Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), la *American Type Culture Collection*
(ATCC) y la *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ), en

forma de cultivos liofilizados, los cuales fueron reconstituidos y cultivados siguiendo las instrucciones recomendadas. Así mismo, las condiciones y medios de cultivo utilizados corresponden a los recomendados por los proveedores de las cepas (Tabla 4).

Cepa	Código	Medio de Cultivo	Temperatura °C	[O ₂]
<i>Bacillus cereus</i>	CECT 131	Agar Nutritivo I	30°	ANF
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 49943	<i>Campylobacter</i> agar según Karmali / Bolton broth	37°	MA
<i>Clostridium perfringens</i>	CECT 376T	Medio reforzado para Clostridios (RCM)	37°-45°	AN
<i>Cronobacter sakazakii</i>	ATCC BAA-894	TSA	37°	AF
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (EHEC)	CECT 4267	Agar Nutritivo I	37°	A/ANF
<i>Listeria monocytogenes</i>	CECT 911	Infusión de cerebro- corazón (BHI)	37°	A
<i>Shigella dysenteriae</i>	CET 584	Agar Nutritivo I	37°	A/ANF
<i>Staphylococcus aureus</i>	CECT 240	Agar Nutritivo	37°	A/ANF
<i>Salmonella bongori</i>	ATCC 43975	TSA	37°	ANF
<i>Salmonella enterica</i> var. <i>arizonae</i>	CECT 4395	Agar Nutritivo I	37°	ANF
<i>Salmonella enterica</i> var. <i>houtenae</i>	CECT 5326	Agar Nutritivo I	37°	ANF.
<i>Salmonella enterica</i> var. <i>salamanae</i>	CECT 4000T	Agar Nutritivo I	37°	ANF
<i>Salmonella enterica</i> <i>enterica</i> var. <i>tiphy</i>	CECT 725	Agar Nutritivo I	37°	ANF
<i>Salmonella enterica</i> <i>enterica</i> var. <i>Tiphymurium</i>	CECT 443	Agar Nutritivo I	37°	ANF
<i>Salmonella enterica</i> <i>enterica</i> var. <i>paratyphi</i>	CECT 698	Agar Nutritivo I	37°	ANF

<i>Salmonella enterica enterica var. paratyphi</i>	CECT 554	Agar Nutritivo I	37°	ANF
<i>Salmonella enterica enterica var. enteritidis</i>	CECT 556	Agar Nutritivo I	37°	ANF
<i>Salmonella enterica entericavar. infantis</i>	CECT 707	Agar Nutritivo I	37°	ANF
<i>Salmonella enterica enterica var. choleraesuis</i>	CECT 724	Agar Nutritivo I	37°	ANF
<i>Salmonella enterica enterica var. dublin</i>	CECT 4152	Agar Nutritivo I	37°	ANF
<i>Salmonella enterica enterica var. virchow</i>	CECT 4154	Agar Nutritivo I	37°	ANF
<i>Budvicia aquatica</i>	DSM 5075	TSA	26°	A
<i>Buttiauxella agrestis</i>	DSM 4586	Agar Nutritivo I	30°	A
<i>Cedecea davisae</i>	CECT 842T	Agar Nutritivo I	28°	A
<i>Citrobacter youngae</i>	CECT 5335T	LB	37°	A
<i>Edwardsiella tarda</i>	CECT 849T	TSA	26°	ANF
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	CECT 509	Agar Nutritivo	37°	A
<i>Ewingella americana</i>	CECT 859T	TSA	26°	ANF
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CECT 144	Infusión de cerebro-corazón (BHI)	37°	A
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	CECT 862T	Agar Nutritivo I	37°	A
<i>Leclerciaaader carboxylata</i>	DSM 5077	Agar Nutritivo I	37°	A
<i>Leminorella grimontii</i>	DSM 5078	Agar Nutritivo I	37°	A
<i>Morganella morganii</i>	CECT 173T	Agar Nutritivo I	37°	A

<i>Pantoea ananatis</i>	CECT 4858T	TSA	26°	ANF
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	CECT 225T	TSA	26°	A
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	CECT 597	Agar Nutritivo I	37°	A
<i>Proteus vulgaris</i>	CECT 165	Agar Nutritivo I	37°	ANF
<i>Providencia stuartii</i>	CECT 866T	Agar Nutritivo I	37°	A
<i>Rahnella aquatilis</i>	DSM 4594	Agar Nutritivo I	30°	A
<i>Raoultella planticola</i>	CECT 843T	Agar Nutritivo I	30°	A
<i>Serratia marcescens</i>	CECT 854	TSA	26°	A
<i>Shigella flexneri</i>	CECT 585	Agar Nutritivo I	37°	ANF
<i>Shigella boydii</i>	CET 583	Agar Nutritivo I	37°	ANF
<i>Shigella dysenteriae</i>	CECT 584	Agar Nutritivo I	37°	ANF
<i>Tatumella ptyseos</i>	CECT 869T	Infusión de cerebro- corazón (BHI)	30°	A
<i>Hafnia alvei</i>	CECT 157	TSA	30°	A
<i>Yersinia enterocolitica</i>	CECT 4054	Infusión de cerebro- corazón (BHI)	26°	A
<i>Bacillus badius</i>	CECT 17T	Agar Nutritivo I	30°	A
<i>Bacillus pumilus</i>	CECT 29T	Agar Nutritivo I	30°	A
<i>Bacillus subtilis</i>	CECT 35	Agar Nutritivo I	30°	A
<i>Campylobacter coli</i>	ATCC 49941	TSA+ Sangre de cordero desfibrinada	37°	MA
<i>Campylobacter mucosalis</i>	DSM 21682	Columbia Blood	37°	AN

<i>Campylobacter helveticum</i>	ATCC 51209	TSA+ Sangre de cordero desfibrinada	35°	MA
<i>Clostridium botulinum</i>	CECT 551	Liver Broth	37°	AN
<i>Clostridium butyricum</i>	CECT 361T	Liver Broth	37°	AN
<i>Enterobacter aerogenes</i>	CECT 684T	Agar Nutritivo I	30°	ANF
<i>Enterobacter cloacae</i>	CECT 194T	Agar Nutritivo I	30°	ANF
<i>Enterobacter gergoviae</i>	CECT 857T	Agar Nutritivo I	37°	ANF
<i>Escherichia fergusonii</i>	DSM 13698	Agar Nutritivo I	37°	ANF
<i>Escherichia hermannii</i>	DAM 4560	Agar Nutritivo I	37°	ANF
<i>Escherichia intermedia</i>	ATCC 21073	Agar Nutritivo	37°	ANF
<i>Listeria grayi</i>	CECT 931T	Infusión de cerebro- corazón (BHI)	37°	A
<i>Listeria innocua</i>	CECT 910T	Infusión de cerebro- corazón (BHI)	37°	A
<i>Listeria ivanovii</i>	CECT 5379	Infusión de cerebro- corazón (BHI)	37°	A
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CECT 231	Agar Nutritivo I	37°	ANF
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	CECT 4900T	Agar Nutritivo I	37°	ANF
<i>Staphylococcus simulans</i>	CECT 4538T	Agar Nutritivo I	37°	ANF

Tabla 4. Microorganismos que conforman la colección de cepas creadas para este estudio y sus condiciones de cultivo. Leyenda: **A:** Aerobio; **AN:** Anerobio; **ANF:** Anerobio Facultativo; **MA:** Microaerófilo.

- 5 Así mismo, para la detección e identificación de los diferentes microorganismos de este estudio, y adicionalmente a los medios de cultivo listados en la Tabla 4, se han

utilizado medios de cultivo selectivos y otros especiales con condiciones de temperatura y concentración de oxígeno específicas, según se muestra en la Tabla 5.

Medio	Abreviatura	Suplementos	Fabricante	O ₂	Temp. °C
<i>Campylobacter</i> agar según Karmali	CAB+S	Karmali Supplement (SR0167) + <i>Campylobacter</i> Growth Supplement (SR0232E)	OXOID	Microaerofilia	42°
Medio cromogénico para <i>Bacillus cereus</i>	CBC	<i>Bacillus cereus</i> Selective Supplement (SR0230E)	OXOID.	Aerobiosis	37°
Medio cromogénico para <i>Listeria monocytogenes</i>	CLM	Brilliance™ <i>Listeria</i> Differential Supplement (SR0228E)	OXOID	Aerobiosis	37°
Medio cromogénico para <i>Cronobacter sakazakii</i>	CCS	--	MERCK.	Aerobiosis	37°
Agar de hierro de Klieger	KIA	Azul de metileno	MERCK	Anaerobiosis	37°
Agar eosina-azul de metileno	EMB	--	MERCK.	Anaerobiosis	37°
Agar rojo-violeta con sales biliares	VRBA	--	OXOID	Aerobiosis	37°
Agar Baird - Parker	BPA	Emulsión de Yema de Huevo + Telurito Potásico (SR0054C)	OXOID.	Aerobiosis	37°

Agua de peptona tamponada	BPW	Sangre de caballo desfibrinada y hemolisada SR0050C (OXOID)	MERCK	--	--
---------------------------	-----	-------------------------------------------------------------	-------	----	----

Tabla 5. Medios y suplementos utilizados para el cultivo y la identificación de microorganismos patógenos de origen alimentario.

5 La manipulación de todas las cepas, tanto para su recuperación a partir de liofilizados como para el cultivo sucesivo, se llevó a cabo en una cabina de flujo laminar de bioseguridad nivel II Telstar Biolla.

10 La incubación de todos los cultivos fue realizada en estufas Memmert INE500 de temperatura graduable y las condiciones de microaerofilia y anaerobiosis fueron alcanzadas en jarras Anaeropack™ System (Mitsubishi Gas Chemical), de siete litros de volumen, con sobres AnaeroGen™ AN0035A y CampyGen™ CN0035A (Oxoid).

1.2 Conservación de cultivos

15 La conservación en glicerol se ha utilizado para garantizar la disponibilidad en el tiempo de cultivos de cepas estándar, almacenándose alícuotas, por duplicado de cada cepa, en glicerol 50% a -80° C. Para ello una colonia aislada, obtenida a partir de un cultivo por agotamiento en medio sólido, fue inoculada en 5 mL de medio de cultivo líquido e incubada a la temperatura correspondiente por una noche. Luego, se centrifugó este cultivo a 10.000 rpm durante 10 min, se descartó el sobrenadante y el
20 pellet celular se resuspendió en 750 µL de TSB o LB. Se añadieron 750 µL de glicerol 50% y se almacenó en un criovial a -80°C hasta su uso.

La liofilización se ha utilizado para garantizar a muy largo plazo la disponibilidad de las diferentes cepas. El proceso realizado se describe a continuación:

25 - Se cultivaron alícuotas de los diferentes microorganismos, en los medios y condiciones adecuadas.

- Mediante centrifugado, se recolectaron las células y se resuspendió el pellet celular en 4 mL de un medio crioprotector compuesto por: MOPS (0,5%), leche descremada en polvo (2%), trehalosa (1,7%) y agua hasta 50 mL. El pH de este medio
30 crioprotector se ajustó a un valor de 7,5 con KOH.

- La suspensión se congeló a -70° C en viales capsulables de vidrio, manteniéndolos a esta temperatura por una noche.

- A continuación se procedió al liofilizado en un equipo Free Zone 1 Liter Benchtop Freeze Dry System (Labconco), por aproximadamente 24 horas.

5 - Finalmente, una vez sellados los viales, se almacenaron a temperatura ambiente.

1.3. Elaboración de curvas de crecimiento.

10 Para conocer el número de unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en cada inóculo utilizado, se elaboraron curvas de densidad óptica a $\lambda = 600$ nm (DO_{600}) versus el número de UFC, siguiendo los pasos que se indican a continuación:

a) Inocular una colonia aislada, obtenida por cultivo en placa por agotamiento, en 5 mL de medio de cultivo líquido (según Tabla 4).

b) Incubar en las condiciones adecuadas hasta obtener una $DO_{600}=0,4$.

15 c) Hacer diluciones seriadas desde 10^0 hasta 10^{-7} y medir DO_{600} para cada una.

d) Sembrar en placa 100 – 1000 μ L de cada dilución con asa de Digralsky, por cuadruplicado, e incubar durante 24 horas.

e) Contar el número de colonias presentes y representar gráficamente DO_{600} versus número de colonias.

20

Las mediciones de DO_{600} se realizaron en un espectrofotómetro Biophotometer Plus (Eppendorf), en cubetas desechables de plástico Plastibrand (BRAND) con un volumen de 1,5 mL y un paso de luz de 10 mm.

25 1.4. *Spiking* o contaminación artificial de matrices alimentarias.

Para la contaminación artificial de matrices alimentarias se inocularon alícuotas de 10 g, de 20 tipos de matrices diferentes, con 300 UFC de cada cepa en las combinaciones indicadas y por triplicado, tal y como se indica en la Tabla 6. Para ello cada alícuota se introdujo de modo aséptico en una bolsa para muestras con filtro WHIRL-PAK BO1195WA (Nasco) y se le añadió el medio de cultivo GVRUM, hasta alcanzar los 100 g medidos en una balanza de laboratorio MXX-061 (Denver Instrument). Este medio de cultivo GVRUM está compuesto por Agua de Peptona Tamponada y los siguientes ingredientes añadidos:

35 - Sangre de caballo desfibrinada y hemolisada (25 mL sangre/500 mL de medio).

- Manitol 10 g/500 mL de medio.

- Suplemento de crecimiento de *Campylobacter* OXOID # SR0232E (1 vial de 2 mL/500 mL de medio).

Matrices	Inóculos													
Carne fresca roja														
Carne fresca pollo														
Salchichas crudas														
Embutidos														
Pescado Crudo														
Conservas de pescado														
Sopa de pescado														
Leche cruda vaca														
Yogur														
Nata														
Queso														
Postres lácteos	BC	CJ	CP	CS	EB	EC	LM	H7	SH	SE	SA	CJ CS LM SE	BC CP EB EC SA	BC CJ CO CS EB EC LM SA SE
Leche en polvo														
Leche infantil en polvo 1														
Leche infantil en polvo 2														
Huevo crudo														
Huevo manufacturado														
Vegetales crudos														
Miel														
Control Sin Matriz														

5 **Tabla 6.** Matrices y combinaciones de microorganismos usadas en los *spikings*. **BC:** *B. cereus*, **CJ:** *C. jejuni*, **CP:** *C. prefringens*, **CS:** *C. sakazakii*, **EB:** Fam. *Enterobacteriaceae*, **EC:** *E. coli*, **H7:** *E. coli* O157:H7, **LM:** *L. monocytogenes*, **SA:** *S. aureus*, **SE:** *Salmonella spp.*, **SH:** *Shigella spp.*

La muestra se homogenizó en un Stomacher 80 (Seward), por 60 s. Una vez homogenizada la muestra, se inoculó cada bolsa con 300 UFC del microorganismo correspondiente. En los casos en que era necesario un pre-enriquecimiento, esta bolsa se incubó a 37° C durante 24 horas.

5

1.5. Transformación de células competentes.

El protocolo utilizado para la transformación de células competentes de *E. coli* Top 10[®] (Life Technologies) (Genotipo: F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ *araleu*) 7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*) con plásmidos fue el descrito en Sambrook y Russel, 2001.

10

2. Obtención y manipulación de ADN

2.1 Extracción de ADN genómico.

15

a) A partir de cultivos puros de cepas estándar.

A partir de cultivos en medio líquido de una noche de cada cepa estándar de la colección, se extrajo ADN mediante el kit comercial DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN), siguiendo el protocolo incluido en el mismo. Las muestras se almacenaron a -20° C.

20

b) A partir de matrices alimentarias contaminadas artificialmente:

Para la extracción de ADN a partir de *spikings* de los 20 tipos de matrices alimentarias se utilizó el sistema Prepman ULTRA[®] (Life Technologies), para lo cual se siguió el protocolo descrito a continuación:

25

- a) Centrifugar 1 mL del cultivo, a 12.500 rpm durante 1 minuto.
- b) Retirar el sobrenadante y añadir al pellet celular 100 μ L de Prepman ULTRA[®].
- c) Agitar en vórtex durante 30 s e incubar a 100° C en bloque seco durante 10 minutos.
- d) Enfriar a temperatura ambiente y centrifugar a 12.500 rpm durante 2 minutos.
- e) Transferir 50 μ L del sobrenadante a un tubo de microcentrifuga.
- f) Almacenar a -20° C.

30

El centrifugado de las muestras se realizó en una microcentrifuga 5424 (Eppendorf), la agitación en un vórtex Wizard X (Velp Scientifica) y la incubación a 100° C en un bloque térmico AccuBlock[™] (LabNet Biotécnica).

35

2.2 Aislamiento de ADN plasmídico

Para el aislamiento de ADN plasmídico se usó el kit comercial StrataPrep® Plasmid Miniprep Kit (Agilent Technologies), siguiendo el protocolo incluido en el mismo. Para la clonación de fragmentos romos obtenidos por PCR se ha utilizado el vector pCRBlunt (Life Technologies), el cual presenta las siguientes características: promotor *lac*; *lacZα-ccdB*; MCS; promotor T7; sitios de anillamiento para los cebadores T7/M13 up/rp; *Kan^R*; origen de replicación en *E. coli* colE1.

10 2.3. Electroforesis de ADN

a) Electroforesis horizontal en gel de agarosa

La separación de fragmentos de ADN se realizó en geles de agarosa con concentraciones desde 0,7% a 5% en tampón TBE 1X (Tris 0,9 M; Ácido Bórico 0,9 M y EDTA 20 mM pH=8), en cubetas de electroforesis horizontal KuroGel Midi 13 (VWR) a 170 V durante 40 minutos y con fuentes de energía EV265 (Consort).

b) Electroforesis capilar

Los amplicones de ADN, provenientes de reacciones de PCR en múltiplex, fueron analizados mediante electroforesis capilar realizada en un Bioanalyzer 2100® con cartuchos DNA1000® y sus correspondientes reactivos (Agilent Technologies). El protocolo utilizado con el programa *Expert 2100* se describe a continuación:

- a) Colocar el cartucho en la “*priming station*”, según las indicaciones del fabricante para el tipo de cartucho correspondiente (en este caso “DNA chip”), y colocar la jeringa en posición de 1 mL. Cerrar la unidad.
- b) Anadir 9 µL de “*gel matrix mix*” en el pocillo marcado “G” con fondo oscuro.
- c) Desplazar el émbolo de la jeringa desde la posición 1 hasta la posición 0 y bloquearlo con el gatillo.
- d) Esperar 60 s exactos.
- e) Liberar el gatillo, esperar 5 s y luego desplazar el émbolo hasta la posición 1.
- f) Cargar 9 µL de “*gel matrix mix*” en cada uno de los dos pocillos marcados “G”. (sin fondo oscuro).
- g) Añadir a todos los pocillos 5 µL de “*marker*”.
- h) Añadir al pocillo marcado, 1 µL del *DNA ladder*.
- i) Cargar 1 µL de la muestra en el pocillo correspondiente, hasta completar 11, dejando el pocillo 12 libre para añadir 1 µL de agua destilada como control.

- j) Colocar el cartucho en el vórtex y agitar por 1 minuto a 2000 rpm (cuidando de que no se pierda por salpicadura el volumen cargado).
- k) Colocar el cartucho en el compartimiento del equipo y seleccionar en el software el tipo de cartucho.
- 5 l) Iniciar la carrera.

2.4. Purificación de fragmentos de ADN

En los casos en los que fue requerido, se purificaron fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa, usando el kit comercial StrataPrep® Gel Extraction Kit; o a partir de productos de PCR, utilizando en kit StrataPrep® PCR Purification Kit, ambos de la casa comercial Agilent Technologies. Los productos de estas purificaciones fueron eluídos en agua Milli-Q esterilizada en autoclave.

2.5 Ligación de fragmentos de ADN en vectores plásmídicos para la transformación de células competentes de *Escherichia coli*

La enzima T4 DNA ligasa (5 U/μL) (Fermentas) y su respectivo tampón fue usada para ligar fragmentos romos de ADN en vectores plasmídicos. Para esto se elaboraron mezclas de ligación en un volumen final de 10 μL cuya composición estándar se muestra en la Tabla 7.

Estas ligaciones de extremos romos se incubaron durante una noche y a temperatura ambiente.

Componente	Concentración
Fragmento o inserto de ADN	300 ng
Vector	100 ng
T DNA ligasa	5u
Tampón ligasa 10X	1X

Tabla 7. Composición de una mezcla para la ligación de fragmentos de ADN en plásmidos.

2.6 Secuenciación y análisis de secuencias

La secuenciación automática fluorescente fue realizada en un analizador genético ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems), con el Big Dye 3.1 Terminator System (Applied Biosystems), en la Unidad de Secuenciación de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo.

Las secuencias fueron analizadas y editadas mediante la aplicación bioinformática BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999). Las mismas fueron alineadas a otras secuencias de ADN con la aplicación ClustalW2 (EMBL-EBI).

5 **3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

3.1 Diseño de cebadores y sondas.

Tanto para PCR convencional o a tiempo final, como para PCR cuantitativa a tiempo real (qRTi-PCR), se diseñaron cebadores para amplificar secuencias de ADN específicas a cada microorganismo de interés. Para esto se seleccionaron, dianas genéticas con alta especificidad y conservación. Las secuencias de nucleótidos de ADN y de proteínas correspondientes a estas dianas fueron obtenidas a partir de la base de datos GenBank (NCBI). Se llevaron luego a cabo alineamientos entre éstas y el resto de secuencias depositadas en GenBank mediante las aplicaciones BLAST-n y BLAST-p, disponibles en la *web* del NCBI. Las regiones correspondientes a dominios conservados entre cepas de la misma especie fueron seleccionadas para el diseño de los cebadores, el cual se realizó con la aplicación *online* Primer3 (Rozen *et al.* 1998) y con el programa FastPCR® V.6.0.138 beta 2 (Kalendar *et al.*, 2009), para el caso de la PCR convencional.

Para la detección y cuantificación por qRTi-PCR de cuatro microorganismos y una familia de patógenos de origen alimentario se diseñaron cebadores y sondas TaqMan® (a partir de las dianas genéticas seleccionadas previamente) con el programa informático Primer Express Version 3.0 (Life Technologies).

Todos los cebadores fueron sintetizados por Thermo-Fisher Scientific y disueltos en tampón TE 1X (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA.Na₂) a una concentración inicial de 100 pmol/μL. Las sondas TaqMan® fueron sintetizadas por Applied Biosystems y recibidas en solución a una concentración de 100 pmol/μL en tampón TE 1X.

30 **3.2. PCR convencional**

Todas las reacciones de amplificación, tanto uniplex como múltiplex, se llevaron a cabo en un termociclador Veriti® 96 WellThermal-Cycler de Applied Biosystems, con la mezcla AmpliTaq Gold 360 PCR Master Mix (Applied Biosystems) la cual incluye una enzima ADN polimerasa y su tampón, MgCl₂ a una concentración no indicada por el fabricante, y los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) requeridos.

a) Uniplex

Se realizaron reacciones uniplex de PCR en un termociclador Veriti® 96 Well Thermal-Cycler (Applied Biosystems) para confirmar la obtención de ADN amplificable de los microorganismos en estudio a partir de los cultivos provenientes de *spikings* de matrices alimentarias, así como en cultivos puros o estándar. Para esto se utilizaron en modo uniplex los cebadores diseñados en mezclas de reacción bajo las condiciones indicadas por el fabricante de la mezcla que incluye la enzima polimerasa.

b) Múltiplex

Se llevaron a cabo PCRs en modo múltiplex para la detección múltiple de diez microorganismos y una familia de patógenos de origen alimentario, empleando los cebadores diseñados. Para ello se prepararon dos mezclas iniciales de cebadores a una concentración definida, partiendo de la concentración almacén de 100 pmol/ μ L de cada uno de ellos, y de las concentraciones de reactivos y condiciones de amplificación recomendadas por el fabricante.

3.3. PCR cuantitativa a Tiempo Real (qRTi-PCR)

Para aquellos ensayos de qRTi-PCR en los que se utilizaron sondas cuyos fluoróforos eran NED, VIC y 6-FAM, se empleó el termociclador HT7900 Real Time PCR (Applied Biosystems) de la Unidad de Secuenciación de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo; mientras que para aquellos ensayos en los que se utilizaron sondas cuyo fluoróforo era Cy5, se utilizó un equipo 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) de la empresa ALCE CALIDAD S.L. (Llanera, Asturias).

Para el análisis de los resultados se usaron las aplicaciones informáticas 7900 HT Sequence Detection Systems (SDS) versión 2.3 y 7500 Real-Time PCR System Sequence Detection Software, versión 1.4, ambos de Applied Biosystems.

Así mismo, en todos los ensayos se usó la mezcla comercial (*master mix*) de reacción TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems), la cual contiene la enzima ADN polimerasa, desoxirribonucleótidos trifosfato, tampón de reacción, Mg^{+2} y además el fluoróforo ROX como referencia pasiva.

a) Elaboración de recta estándar para cuantificación.

Para la cuantificación del número de copias de cada diana genética presente en las muestras de los cuatro microorganismos y una familia de patógenos utilizados en estos experimentos, se elaboraron rectas estándar de cuantificación en cada grupo de

reacciones. Para ello, se prepararon cultivos de cada microorganismo, con una $DO_{600}=0,4$, calculándose el número de UFC presentes mediante las ecuaciones de las curvas de crecimiento previamente elaboradas. A partir de estos cultivos se realizaron diluciones decimales seriadas a partir de las cuales se extrajo ADN con el sistema comercial PrepMan[®] (Life Technologies).

Una vez extraído el ADN, según el protocolo ya descrito incluido en el reactivo, se procedió a eliminar el ARN presente en cada extracto mediante un tratamiento durante 2 horas a 37° C, con 10 µL de RNAsa A de páncreas bovino (ROCHE) y 2 µL de ARNsa T1 de *Aspergillus oryzae* (SIGMA)

La concentración de cada muestra se determinó por espectrofotometría a $\lambda= 260$ nm, en un Biophotometer Plus (Eppendorf), considerando que una unidad de absorbancia corresponde a 50 µg/mL de ADN de doble cadena (Factor 50) calculándose el número de copias de cada diana según la siguiente ecuación:

$$cn = \frac{(m * 6,02 \times 10^{23})}{(bp * 1 \times 10^9 * 650)}$$

En donde :

cn = número de copias

m = masa de la muestra de ADN de doble cadena, en ng.

bp = longitud de la diana en pares de bases (bp).

20

El trazado de la recta fue realizado por el software de análisis correspondiente a cada equipo de qRTi-PCR, considerándose solamente aquellas rectas con un $R^2 \geq 0,98$.

b) Construcción de un control interno de amplificación (IAC)

25

Para descartar falsos negativos en la detección y verificar el correcto funcionamiento de las reacciones de qRTi-PCR, se diseñó y construyó un control interno de amplificación (IAC) conformado por una secuencia de ADN exógena a los microorganismos utilizados y a las secuencias correspondientes a los sitios de anillamiento de los cebadores diseñados para las reacciones de qRTi-PCR.

30

La secuencia exógena seleccionada corresponde a un fragmento de 120 pb del gen de la cinamoil-CoA-reductasa de *Eucalyptus globulus* (GenBank AY656818). Para crear nuevas versiones de este fragmento de ADN que contuviesen añadidas en cada extremo del mismo las secuencias de anillamiento de los cebadores *upstream* (up) y

reverse (rp) usados para las reacciones de qRTi-PCR de cada uno de los cinco tipos de patógenos a cuantificar, se diseñaron a su vez nuevos cebadores que anillasen sobre la secuencia de este gen exógeno y que en los extremos 5' incorporasen las secuencias correspondientes a los sitios de anillamiento de los cebadores para cada una de las cinco dianas genéticas específicas a los patógenos a cuantificar. Se generó así el fragmento a usar como IAC quimérico.

Para la detección de la amplificación del IAC, se diseñó una sonda TaqMan® específica (TaqMan-GVR-IAC), con tres versiones diferentes que incorporan cada una un fluoróforo distinto, de forma que se hiciese posible cualquiera de las combinaciones dúplex de estos cinco tipos de patógenos.

c) qRTi-PCR uniplex.

Se realizaron ensayos de qRTi-PCR en modo uniplex, en las cuales se añadió solo una pareja de cebadores (up/rp) y una sonda específicos para un microorganismo dado. Inicialmente se llevaron a cabo reacciones con diluciones seriadas de ADNg de cada microorganismo, sus cebadores y sonda correspondiente.

Posteriormente se elaboró una recta patrón de cuantificación en cada placa de reacción, para cada microorganismo, con cinco diluciones decimales seriadas, por triplicado, del ADNg estándar ya descrito. Las concentraciones de los reactivos empleados y las condiciones de reacción inicialmente utilizadas fueron las indicadas por el fabricante de la mezcla maestra utilizada (**Tablas 8 y 9**).

Recta Patrón de Cuantificación		
COMPONENTE	CONC. INICIAL	CONC. FINAL en la reacción
qPCR Master Mix	2X	1X
Cebador up	20 µM	A optimizar
Cebador rp	20 µM	
SondaTaqMan	2,5 mM	
ADNg Estándar	Diluciones decimales seriadas	Diluciones decimales seriadas
H₂O	0	0

Tabla 8. Mezcla de reacción para la elaboración de recta patrón de cuantificación de microorganismos por qRTi-PCR.

Paso	Temperatura	Duración	Repeticiones
Desnaturalización/activación polimerasa	50° C	120 s	1
	95° C	600 s	1
Desnaturalización	95° C	15 s	40 ciclos
Anillamiento	60° C	60 s	

5 **Tabla 9.** Condiciones de amplificación para muestras a cuantificar por qRTi-PCR uniplex.

d) qRTi-PCR dúplex.

10 Se llevaron a cabo ensayos de qRTi-PCR en modo múltiplex, para la detección simultánea de dos microorganismos patógenos. Para ello se incluyó en cada reacción el par de cebadores y la sonda TaqMan® específica a cada uno de estos dos patógenos, añadiendo además el IAC con su respectiva sonda. Se pusieron a punto todas las combinaciones posibles de sondas TaqMan® correspondientes a los cinco patógenos y al IAC (Tabla 10).

15

M1	Sonda	F	M2	Sonda	F	Sonda IAC	F
<i>C. perfringens</i>	TaqMan-GVR-CP	VIC	<i>E. coli</i>	TaqMan-GVR-EC	NED	TaqMan-GVR-IAC3	FAM
			<i>S. aureus</i>	TaqMan-GVR-SA	FAM	TaqMan-GVR-IAC2	NED
			<i>B. cereus</i>	TaqMan-GVR-BC	FAM	TaqMan-GVR-IAC2	NED
<i>E. coli</i>	TaqMan-GVR-EC	NED	<i>S. aureus</i>	TaqMan-GVR-SA	FAM	TaqMan-GVR-IAC1	VIC
			<i>B. cereus</i>	TaqMan-GVR-BC	FAM	TaqMan-GVR-IAC2	NED

S. aureus	TaqMan-GVR-SA	FAM	<i>B. cereus</i>	TaqMan-GVR-BC	VIC	TaqMan-GVR-IAC2	NED
Fam. Enterobacteriaceae	TaqMan-GVR-EB	Cy5	<i>C. perfringens</i>	TaqMan-GVR-CP	VIC	TaqMan-GVR-IAC2	NED
			<i>E. coli</i>	TaqMan-GVR-EC	NED	TaqMan-GVR-IAC1	VIC
			<i>S. aureus</i>	TaqMan-GVR-SA	FAM	TaqMan-GVR-IAC2	NED
			<i>B. cereus</i>	TaqMan-GVR-BC	FAM	TaqMan-GVR-IAC2	NED

Tabla 10. Combinaciones de sondas TaqMan® para microorganismos e IAC, en reacciones de qRTi-PCR dúplex. **M1:** microorganismo 1; **M2:** microorganismo 2, **F:** fluoróforo o *reporter* de la sonda TaqMan.

5 Las condiciones usadas inicialmente en la detección dúplex se muestran en las Tablas 9 y 11.

COMPONENTE	CONC.INICIAL	CONC.FINAL EN RXN
qPCR Master Mix	2X	1X
Cebador up 1	20 µM	A optimizar
Cebador rp 1	20 µM	
Cebador up 2	20 µM	
Cebador rp 2	20 µM	
Sonda TaqMan 1	20 mM	
Sonda TaqMan 1	20 mM	
Sonda TaqMan IAC	20 mM	
gADN 1	Desconocida	Desconocida
gADN 2	Desconocida	Desconocida
IAC		
H ₂ O _d	0	0

Tabla 11. Mezcla de reacción para la cuantificación de microorganismos por qRTi-PCR

RESULTADOS

5 **1. Diseño y optimización de un método de PCR múltiplex (mPCR) para la detección simultánea de siete especies, dos géneros, una familia y una cepa de bacterias patógenas de transmisión alimentaria.**

10 **1.1. Selección de dianas genéticas y diseño de cebadores para su detección por PCR múltiplex.**

Para cada microorganismo abordado en esta invención, se seleccionó una diana genética con el objetivo de su amplificación posterior con una pareja de cebadores específicos para la misma, y detectar así el microorganismo en cuestión.

15 Se escogieron dianas que se correspondiesen a genes con un alto grado de conservación en la especie tratada, con el fin de evitar variaciones entre serovariedades o cepas del microorganismo correspondiente. De igual forma, todas estas dianas se eligieron de modo que no existiesen en otras especies emparentadas, como las interferentes usadas aquí como control negativo.

20 Así mismo se evitó el uso de genes que codificasen toxinas presentes solamente en algunas variantes de una misma especie, para evitar que otras variedades sin esas toxinas quedasen fuera del rango de detección y se produjesen por tanto falsos negativos.

25 Una vez escogidas las dianas genéticas específicas para cada patógeno (Tabla 12), se obtuvo su secuencia proteica desde bases de datos como GenBank, y la misma fue analizada con la herramienta BlastP, con el fin de identificar las zonas conservadas de cada proteína dentro de la misma especie, género o familia
30 abordados y así proceder al diseño de cebadores específicos sobre esas zonas que mejor cumpliesen nuestros requerimientos en cada caso.

Microorganismo	Siglas	Gen diana	Número de acceso
<i>B. cereus</i>	BC	<i>cerA-B</i>	M24149
<i>C. jejuni</i>	CJ	<i>pldA</i>	WP002923613
<i>C. perfringens</i>	CP	<i>rpls</i>	WP011592605.1
<i>C. sakazakii</i>	CS	<i>kpsT</i>	WP_007898503.1
<i>E. coli</i>	EC	<i>uidA</i>	EOX2196.1

<i>E. coli</i> O157:H7	H7	<i>stx2A</i>	AB168105.1
Fam. <i>Enterobacteriaceae</i>	EB	<i>16S rRNA</i>	AJ62919.1
<i>L. monocytogenes</i>	LM	<i>hly</i>	ABG8185.1
<i>Salmonella spp.</i>	SE	<i>invA</i>	ABY21687.1
<i>Shigella spp.</i>	SH	<i>ipaA</i>	ABB64682.1
<i>S. aureus</i>	SA	<i>coa</i>	CA36434.1

Tabla 12. Dianas genéticas seleccionadas, y sus números de acceso en GenBank, para cada uno de los patógenos utilizados en esta invención.

5 A partir de las secuencias de las dianas mostradas en la Tabla 12, se diseñaron parejas de cebadores para la amplificación de una región específica de ese ADN de cada microorganismo patógeno. Las diferentes regiones de amplificación seleccionadas difieren de modo premeditado en su longitud, de tal forma que los productos de amplificación generados en la PCR múltiplex puedan diferenciarse fácilmente por medio de electroforesis capilar o en gel de agarosa.

10

El diseño de cada uno de estos amplicones de forma individual para cada diana se realizó mediante el programa Primer3, indicando las longitudes mínima, óptima y máxima que se deseaba obtener y consiguiendo de esta forma parejas de cebadores que generasen amplicones con tamaños con al menos 10 pb de diferencia entre distintos patógenos.

15

La lista completa de la secuencia de los cebadores obtenidos y el tamaño de los productos de amplificación generados para cada microorganismo patógeno se muestran en la **Tabla 1**.

20

Microorganismo	Cebador	Secuencia (5' - 3')	Ampli- cón (pb)
<i>Bacillus cereus</i>	GVR-BC-Mpx-up (SEQ ID NO: 1)	GCGTACTGAGTTAGAGAACGGT	132
	GVR-BC-Mpx-rp (SEQ ID NO: 2)	TTTGCTTGCTTTGCATACGGA	
<i>Campylobacter jejuni</i>	GVR-CJ-Mpx-up (SEQ ID NO: 3)	GAGTGAGGCGAAATTCCAAC	251
	GVR-CJ-Mpx-rp	TCTCATCTCCCTTGCCATTG	

	(SEQ ID NO: 4)		
<i>Clostridium perfringens</i>	GVR-CP-Mpx-up (SEQ ID NO: 5)	TGGGAAAGTTCTTTCAACACC	116
	GVR-CP-Mpx-rp (SEQ ID NO: 6)	GAGAAAGAATCCAAGTATTCGAAG G	
<i>Cronobacter sakazakii</i>	GVR-CS-Mpx-up (SEQ ID NO: 7)	TGGCATCATCAACACTTTTCGT	207
	GVR-CS-Mpx-rp (SEQ ID NO: 8)	TCGACTACTACCTGGTGGACG	
<i>Escherichia coli</i>	GVR-EC-Mpx-up (SEQ ID NO: 9)	GTTGGTGGGAAAGCGCGTTACA	70
	GVR-EC-Mpx-rp (SEQ ID NO: 10)	CGTTAAACTGCCTGGCACAG	
Cepa enterohemorrágica de <i>E. coli</i>	GVR-H7-Mpx-up (SEQ ID NO: 11)	TGGGTA CTGTGCCTGTTACTG	216
	GVR-H7-Mpx-rp (SEQ ID NO: 12)	AAGCCCTCGTATATCCACAGC	
Fam. <i>Enterobacteriaceae</i>	GVR-EB-Mpx-up (SEQ ID NO: 13)	TCAGAGTTC CCGAAGGCACTC	77
	GVR-EB-Mpx-rp (SEQ ID NO: 14)	GCAACGCGAAGAACCTTACCT	
<i>Listeria monocytogenes</i>	GVR-LM-Mpx-up (SEQ ID NO: 15)	TGACGAAATGGCTTACAGTGA	163
	GVR-LM-Mpx-rp (SEQ ID NO: 16)	GCCGAAGTTTACATTCAAGCT	
<i>Salmonella spp.</i>	GVR-SE-	CCCGATTTTCTCTGGATGGT	176

	Mpx-up (SEQ ID NO: 17)		
	GVR-SE- Mpx-rp (SEQ ID NO: 18)	GGCAATAGCGTCACCTTTGA	
<i>Shigella spp.</i>	GVR-SH- Mpx-up (SEQ ID NO: 19)	TCAAACACATTGATGAGTATCAG G	150
	GVR-SH- Mpx-rp (SEQ ID NO: 20)	TACATCTTTTTGACCGGACTTCTTA	
<i>Staphylococcus aureus</i>	GVR-SA- Mpx-up (SEQ ID NO: 21)	GCAACTGAAACAACAGAAGCT	101
	GVR-SA- Mpx-rp (SEQ ID NO: 22)	TCACGGATACCTGTACCAGCA	

Tabla 1. Parejas de cebadores diseñados para la detección múltiplex de ocho microorganismos, dos géneros y una familia de patógenos alimentarios. La T_m teórica de amplificación en todos los casos es de 56° C.

- 5 Todas las parejas de cebadores en conjunto fueron evaluadas mediante la función *Primer Test* del programa FastPCR, de tal forma que se garantizase la compatibilidad teórica de dichas parejas en las reacciones múltiplex. De esta manera se garantizaba, al menos *in silico*, que los cebadores hibridasen lo menos posible entre ellos o sobre ellos mismos y en consecuencia se reducía la probabilidad de formar dímeros de cebadores y otras estructuras no deseadas.
- 10

Cada pareja de cebadores fue probada primero individualmente en reacciones uniplex, en las cuales se utilizó como molde el ADN genómico (ANDg) del microorganismo al que correspondían los cebadores, comprobándose de esta forma el

15 correcto funcionamiento y la producción de amplicones con el tamaño correspondiente. Este tipo de pruebas fueron visualizadas en geles de agarosa al 5% de concentración. La composición de las mezclas de reacción y las condiciones de reacción se muestran en las Tablas 13 y 14.

Componente	Concentración Inicial	Concentración Final
AmpliAq Gold 360 Master Mix	2X	1X
Cebador UP	20 μ M	1 μ M
Cebador RP	20 μ M	1 μ M
ADNg	Desconocida	Desconocida
H₂O	0	0

Tabla 13. Mezcla de reacción para PCR convencional uniplex.

Paso	Temperatura	Duración	Ciclos
Desnaturalización	95° C	180 segundos	1
Desnaturalización	95° C	30 segundos	35
Anillamiento	56° C	60 segundos	
Extensión	72° C	90 segundos	
Extensión final	72° C	420 segundos	1

5 **Tabla 14.** Condiciones de reacción usadas en PCR convencional uniplex.

A partir de estos geles de agarosa se purificaron los amplicones obtenidos para su secuenciación posterior, y se comprobó que en todos los casos el amplicón secuenciado correspondía a la región esperada de amplificación.

10

De forma similar, para cada pareja de cebadores se comprobó de forma individual si eran capaces de amplificar alguna región usando como molde el ADNg de las diferentes especies de microorganismos interferentes listadas en la Tabla 4. En todos los casos, el experimento de PCR no generó ninguna banda de amplificación, lo que demostraba en principio que no eran esperables falsos positivos obtenidos por amplificación desde otras especies emparentadas filogenéticamente con los 11 tipos de patógenos ensayados.

15

Como excepciones a esto hay que aclarar que en el caso de la pareja de cebadores diseñada para detección de miembros de la Familia *Enterobacteriaceae*, se obtuvo amplificación a partir de *C. sakazakii*, *E. coli*, *E. coli* 0157:H7, las cuatro especies de *Shigella spp.* ensayadas, los 13 tipos de *Salmonella spp.* ensayados, y las otras 24

20

especies de la Familia *Enterobacteriaceae* de la colección representada en la Tabla 4. Además, en el caso de la pareja de cebadores para el género *Salmonella*, todas las especies y serovariedades del mismo (en total 13 tipos) presentes en la Tabla 4 arrojaron amplificación correcta. Por último, en el caso de la pareja de cebadores para el género *Shigella*, las 4 especies presentes en la Tabla 4 arrojaron amplificación correcta.

1.2 Optimización del método para PCR múltiplex

Una vez comprobado el funcionamiento de los cebadores mediante estas reacciones uniplex sobre ADNg de cada patógeno de forma individual, se procedió a optimizar las concentraciones de cada cebador y la Tm de la reacción para conseguir la amplificación de todas las dianas en reacciones múltiplex. Para esto, se comenzó con la optimización individual de cada par de cebadores ensayando 16 combinaciones de concentración del cebador up y el rp, así como cinco temperaturas de hibridación diferentes para cada una de esas 16 combinaciones (Tabla 15).

Tm (°C)	Nº Combinación	Concentración cebador Up (µM)	Concentración cebador Rp (µM)
52°, 54°, 56°, 58° y 60°	1	0,4	0,4
	2		0,6
	3		0,8
	4		1,0
	5	0,6	0,4
	6		0,6
	7		0,8
	8		1,0
	9	0,8	0,4
	10		0,6
	11		0,8
	12		1,0
	13	1	0,4
	14		0,6
	15		0,8
	16		1,0

Tabla 15. Condiciones de optimización individual para las 11 parejas de cebadores.

Cada reacción fue visualizada en geles de agarosa al 5%, y los resultados se muestran en las Figuras 1 a la 11.

5 A partir de estas pruebas se identificaron las temperaturas y concentraciones óptimas de cada cebador en las cuales se había obtenido la mayor concentración del amplicón correspondiente. En la Tabla 16 se indican las combinaciones de concentración y temperatura que mostraron mayor rendimiento en las pruebas ya comentadas.

Parejas de cebadores	Combinación de cebadores	T _m (°C)
GVR-BC-Mpx-up/rp	13, 14, 15 y 16	56
GVR-Cj-Mpx-up /rp	16	56, 58 y 60
GVR- CP-MPX -up/rp	15 y 16	54, 56 , 58 y 60
GVR-CS-Mpx-up/rp	15 y 16	56 y 58
GVR-EC-Mpx-up/rp	15 y 16	52, 54, 56, 58 y 60
GVR-H7-Mpx-up/rp	1-16	56-60
GVR-EB-Mpx-up/rp	16	54, 56 y 58
GVR-LM-Mpx-up/rp	13, 14,15 y 16	50, 52 , 56, 58 y 60
GVR-SE-Mpx-up/rp	15 y 16	52, 54 , 56 , 58 y 60
GVR-SH-Mpx-up/rp	15 y 16	54, 56 , 58 y 60
GVR-SA-Mpx-up/rp	15 y 16	56 , 58 y 60

10 **Tabla 16.** Combinaciones de parejas de cebadores y temperaturas de hibridación que generaron los mejores resultados en la optimización individual de las parejas de cebadores. En negritas se indican las temperaturas en las cuales la intensidad de la banda observada en agarosa, y correspondiente al amplicón deseado, era más intensa. Las concentraciones de cebadores se describen en la Tabla 15.

15 A continuación, usando como referencia los resultados de la optimización individual de cada par de cebadores, se procedió a la optimización de las concentraciones y temperaturas para las reacciones múltiplex. Estos experimentos se iniciaron con los cebadores correspondientes a *Salmonella spp.* y a *Shigella spp.*. A cada par de cebadores se le asignó una concentración de las escogidas y se combinaron en todas
20 las formas posibles con dos temperaturas de hibridación: 56° C y 58° C. En las pruebas iniciales, la visualización se llevó a cabo en geles de agarosa al 5% y a medida que el número de amplicones a obtener fue aumentando, estas visualizaciones se realizaron por electroforesis capilar en el sistema Bioanalyzer 2100.

Las combinaciones 15/15, 15/16, 16/15 y 16/16 (ver Tabla 15) para los cebadores de ambos microorganismos mostraron una eficiencia bastante similar en cuanto a intensidad de bandas de amplificación se refiere. Ante la necesidad de escoger una combinación para continuar con el proceso de amplificación, se decidió mantener la combinación 16/16 de ambas parejas de cebadores y a partir de ésta, añadir una nueva pareja de cebadores, compuesta por GVR-LM-Mpx-up/rp, específicos para *L. monocytogenes*, ensayando con las mismas combinaciones de la amplificación anterior y las mismas temperaturas de hibridación.

Una vez llevada a cabo esta nueva reacción de PCR, se observó que se generaban los amplicones esperados en las combinaciones ensayadas, siendo más uniformes las bandas obtenidas para los tres microorganismos, cuando se aplicó la combinación 16 (1 µM/1 µM) en las tres parejas de cebadores a una temperatura de 56° C. En estas reacciones se incluyeron muestras en las cuales se hallaba presente el ADNg de cada microorganismo de forma independiente, con el fin de facilitar la identificación de los amplicones por comparación.

Se prosiguió a continuación con la optimización añadiendo en una nueva reacción de mPCR los cebadores correspondientes a *S. aureus*: GVR-SA-Mpx-up/rp, y simultáneamente en otra reacción distinta, el par de cebadores diseñado para *E. coli* O157:H7, y por último en una tercera reacción ambos pares. En estos tres casos se mantuvieron los tres pares de cebadores anteriores ya optimizados (SE, SH y LM) con la combinación 16 ya descrita. En estas tres nuevas reacciones de mPCR se ensayaron las combinaciones 15 y 16 de cada nuevo par de cebadores, a 56° C y 58° C.

A partir de este ensayo no fue ya posible seguir visualizando los amplicones mediante electroforesis en gel de agarosa al 5%, por lo que estas comprobaciones se llevaron a cabo a través de electroforesis capilar, utilizando el sistema Bioanalyzer 2100.

Con este ensayo se consiguió obtener amplicones para los cinco microorganismos deseados, con los cinco pares de cebadores correspondientes. Las dos combinaciones evaluadas para el par de cebadores específicos para *E. coli* O157:H7 y las utilizadas para los demás no parecieron generar grandes diferencias en los productos de amplificación en general. Pero cuando estas concentraciones fueron

combinadas con diferentes temperaturas de hibridación, se favorecieron los picos correspondientes a *Shigella spp.* y a *L. monocytogenes*, específicamente con la combinación 15 para *E. coli* O157:H7 a 56° C. A pesar de esto y como la diferencia no fue muy marcada, se continuó el proceso de optimización añadiendo los cebadores correspondientes a *E. coli*, probándose estos con las combinaciones 15 y 16 y a 56° C y 58° C, manteniendo los demás cebadores con la combinación 16.

Esta misma estrategia fue mantenida en la incorporación de cada uno de los pares de cebadores restantes, ajustando al alza o a la baja, en función de los resultados observados en cada caso, la concentración de aquellos cebadores que generaron picos más reducidos o aquellos con picos más elevados, regulando de esta manera el rendimiento de los mismos en la reacción.

Finalmente, después de un extenso número de experimentos, se consiguió obtener amplificación para las dianas genéticas seleccionadas para *B. cereus*, *C. jejuni*, *C. perfringens*, *C. sakazakii*, *E. coli*, *E. coli* O157:H7, Familia *Enterobacteriaceae*, *L. monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* y *S. aureus*, utilizando los cebadores diseñados para tal fin. Las condiciones de esta amplificación múltiple completa se describen en las Tablas 17 y 18 siguientes.

20

Componente	Conc. Inicial	Conc. Final
H ₂ O _d	0	0
AmpliTaq Gold 360 PCR Master Mix	2X	1X
GVR-CJ-Mpx-up/rp		2,5 µM
GVR-H7-Mpx-up/rp		0,1 µM
GVR-CS-Mpx-up/rp		0,5 µM
GVR-BC-Mpx-up/rp		1 µM
GVR-CP-Mpx-up/rp		2 µM
GVR-SH-Mpx-up/rp		0,4 µM
GVR-SA-Mpx-up/rp		0,5 µM
GVR-LM-Mpx-up/rp		1 µM
GVR-EB-Mpx-up/rp		0,3 µM
GVR-SE-Mpx-up/rp		0,5 µM
GVR-EC-Mpx-up/rp		0,4 µM
ADNg	Desconocida	Desconocida

Tabla 17. Mezcla de reacción usada para la amplificación PCR múltiple de siete especies, dos géneros, una familia y una cepa de patógenos alimentarios.

Paso	Temperatura	Duración	Ciclos
Desnaturalización	95° C	180 segundos	1
Desnaturalización	95° C	30 segundos	35
Anillamiento	56° C	60 segundos	
Extensión	72 ° C	90 segundos	
Extensión final	72 ° C	420 segundos	1

Tabla 18. Condiciones de reacción usadas para la amplificación PCR múltiplex de siete especies, dos géneros, una familia y una cepa de patógenos alimentarios.

Los resultados obtenidos se muestran en el electroferograma de la Figura 12.

5

Adicionalmente se llevaron a cabo otras reacciones de PCR múltiplex separando a los microorganismos en dos grupos en función a su pertenencia o no a la Familia *Enterobacteriaceae*. En el primer grupo se encuentran *C. sakazakii*, *E. coli* y *E. coli* O157:H7, *Salmonella spp.* y *Shigella spp.*, y, todos ellos enterobacterias. En el segundo grupo se encuentran *B. cereus*, *C. jejuni*, *C. perfringens*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*,

10

Se realizó una reacción para cada grupo, en la que se encontraba presente sólo el ADN_g de cada uno de los microorganismos que conformaban dicho grupo y los cebadores específicos para todos los 11 microorganismos, en las condiciones de concentración y temperatura aplicadas para la PCR múltiplex ya descritas (Figuras 13A-B).

15

Así mismo, este procedimiento se llevó a cabo con el ADN_g de cada microorganismo por separado, para mostrar por separado cada amplicón y garantizar que los obtenidos en modo múltiplex se correspondían con estos (Figuras 14A-K).

20

2. Diseño y optimización de un método de PCR Cuantitativa a Tiempo Real (qRTi-PCR) para la cuantificación de cuatro microorganismos y una familia de patógenos de origen alimentario.

25

2.1 Selección de dianas genéticas y diseño de cebadores y sondas para qRTi-PCR.

A partir de la información obtenida en los resultados del apartado 1.1, se escogieron dianas genéticas específicas para el diseño de pares de cebadores y sondas

30

TaqMan™ específicas para cada uno de los amplicones esperados. El uso de estas sondas TaqMan™ permite evitar la generación de falsos resultados positivos (como los generables en ocasiones al usar SYBR GREEN u otros compuestos fluorescentes intercalantes en el ADNbc), ya que sólo se detecta fluorescencia a partir de sondas TaqMan hidrolizadas de forma específica por la ADN polimerasa durante la reacción de amplificación.

Con todos estos componentes se diseñaron experimentos con los que llevar a cabo la cuantificación por qRTi-PCR de cuatro microorganismos y una familia de patógenos de origen alimentario. Las dianas escogidas se muestran en la Tabla 19.

Microorganismo	Siglas	Diana	Número de acceso
<i>B. cereus</i>	BC	<i>cerA-B</i>	M24149
<i>C. perfringens</i>	CP	<i>rpls</i>	WP011592605.1
Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	EB	<i>16s rRNA</i>	AJ62919.1
<i>E. coli</i>	EC	<i>uidA</i>	EOX2196.1
<i>S. aureus</i>	SA	<i>coa</i>	CA36434.1

Tabla 19. Dianas genéticas seleccionadas para la cuantificación por qRTi-PCR de cuatro microorganismos y una familia de patógenos de origen alimentario.

Una vez seleccionadas la dianas y obtenidas sus secuencias en GenBank, se procedió al diseño de las parejas de cebadores y sondas TaqMan™, mediante el programa informático Primer Express 3.0. La lista completa de cebadores y sondas se muestra en las Tablas 2 y 3.

Microorganismo	Cebador	Secuencia (5´ - 3´)	Tm (°C)
<i>B. cereus</i>	RT-GVR-BC-up (SEQ ID NO: 23)	GGTCGTAGTAGTGGAAGCGAATG	60
	RT-GVR-BC-rp (SEQ ID NO: 24)	AACGTTAGGAAACTATTCATC	
<i>C. perfringens</i>	RT-GVR-CP-up (SEQ ID NO: 25)	TGGGAAAGTTCTTTCAACACC	
	RT-GVR-CP-rp (SEQ ID NO: 26)	AAAAACAAAACGGTGGATTAAGAG	
Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	RT-GVR-EB-up (SEQ ID NO: 27)	CGCGAAGAACCTTACCTACTCTTG	
	RT-GVR-EB-rp (SEQ ID NO: 28)	TCCCGAAGGCACTCCTCTATC	
<i>E. coli</i>	RT-GVR-EC-up (SEQ ID NO: 29)	TGGTGATTACCGACGAAAACG	

	RT-GVR-EC-rp (SEQ ID NO: 30)	CCGGCGTAGTTAAAGAAATCATG	
<i>S. aureus</i>	RT-GVR-SA-up (SEQ ID NO: 31)	CCGCAATTTAACAAAACACC	
	RT-GVR-SA-rp (SEQ ID NO: 32)	TGGTCTCGCTTCATATCCAA	

Tabla 2: parejas de cebadores empleados en la cuantificación de *B. cereus*, *C. perfringens*, un microorganismo de la Familia *Enterobacteriaceae*, *E. coli* y/o *S. aureus*.

Microorganismo	Sonda	Secuencia (5' - 3')	Fluoróforo	Tm (°C)
<i>B. cereus</i>	TaqMan-GVR-BC1 (SEQ ID NO: 33)	AACGTTAGGAAACTATTCATC	6-FAM	60
	TaqMan-GVR-BC2 (SEQ ID NO: 34)	AACGTTAGGAAACTATTCATC	VIC	
<i>C. perfringens</i>	TaqMan-GVR-CP (SEQ ID NO: 35)	TAActCAATTCAACATAGGTGACA	VIC	
Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	TaqMan-GVR-EB (SEQ ID NO: 36)	CATCCAGAGAATCCTTT	Cy5	
<i>E. coli</i>	TaqMan-GVR-EC (SEQ ID NO: 37)	CAAGAAAAAGCAGTCTTAC	NED	
<i>S. aureus</i>	TaqMan-GVR-SA (SEQ ID NO: 38)	CGTGAATACAACGATGGAACA	FAM	
Control Interno de Amplificación (IAC)	TaqMan-GVR-IAC1 (SEQ ID NO: 39)	AACCGTCAGGAACCCAGAC	NED	
	TaqMan-GVR-IAC2 (SEQ ID NO: 40)	AACCGTCAGGAACCCAGAC	VIC	
	TaqMan-GVR-IAC3 (SEQ ID NO: 41)	AACCGTCAGGAACCCAGAC	FAM	

5 **Tabla 3:** sondas empleadas en la cuantificación de *B. cereus*, *C. perfringens*, un microorganismo de la Familia *Enterobacteriaceae*, *E. coli* y/o *S. aureus*.

Se realizaron PCRs convencionales utilizando estas nuevas parejas diseñadas de cebadores y el ADNg de cada microorganismo, con el objeto de obtener amplicones que posteriormente fueron clonados en el vector comercial PCR-Blunt para poder así secuenciarlos, y comprobar la coincidencia de éstos amplicones generados con las dianas genéticas teóricas.

2.2 Optimización de pares de cebadores y sondas TaqMan™.

Se llevó a cabo la optimización de la concentración de cada pareja de cebadores y de cada sonda TaqMan, para poder conseguir el mejor rendimiento en cada reacción de qRTi-PCR. Para este proceso se siguieron las indicaciones suministradas por el proveedor de las sondas (Applied Biosystems), las cuales consistieron en la realización de ensayos con diferentes combinaciones de concentración del cebador up y el cebador rp (Tabla 20) a una concentración fija de la sonda, que en este caso fue de 250 nM. Con estas concentraciones se prepararon las reacciones y en función de la calidad de la señal de amplificación obtenida se escogió la que sería empleada en la segunda fase de optimización.

Combinación	Cebador <i>up</i>	Cebador <i>rp</i>
1	0,9 µM	0,9 µM
2		0,3 µM
3		0,05 µM
4	0,3 µM	0,9 µM
5		0,3 µM
6		0,05 µM
7	0,05 µM	0,9 µM
8		0,3 µM
9		0,05 µM

Tabla 20. Combinaciones de concentración probadas para la optimización de las parejas de cebadores usadas en qRTi-PCR

20

Las condiciones en que fueron realizadas las amplificaciones correspondían a las recomendadas por Applied Biosystems para ensayos de variación en el número de copias y se muestran a continuación (Tabla 21):

25

COMPONENTE	CONC.INICIAL	CONC.FINAL en la reacción
qPCR Master Mix	2X	1X
Cebador up	20 µM	0,9 µM
Cebador rp	20 µM	0,9 µM
SondaTaqMan	2,5 mM	0,25 mM
ADNg	Desconocida	Desconocida
H ₂ O	0	0

Tabla 21. Combinaciones de concentración recomendadas por Applied Biosystems para parejas de cebadores y sondas TaqMan usadas en qRTi-PCR.

5 La combinación de cebadores escogida para llevar a cabo las reacciones de qRTi-PCR fue la nº 1 de la Tabla 20 (0,9 µM / 0,9 µM), prosiguiendo a continuación con la optimización de cada sonda TaqMan, para las cuales se ensayaron las concentraciones 2,5 µM; 0,25 µM y 0,05 µM.

10 Una vez realizadas todas estas pruebas y con base en los resultados obtenidos, se escogió como concentración de trabajo 0,05 µM para cada sonda TaqMan.

2.3. qRTi-PCR uniplex.

15 Ya con las concentraciones de cebadores y sondas TaqMan definidas, se procedió a realizar pruebas con diluciones decimales seriadas del ADNg de referencia stock de cada microorganismo, cuantificado por espectrofotometría, con el fin de determinar el umbral mínimo de detección de cada tipo de reacción, expresado en términos de equivalentes genómicos del microorganismo. Los mismos fueron calculados a partir de la masa de ADNg en pg, obtenida por espectrofotometría, y el número de pares de bases del genoma de cada microorganismo, utilizando la siguiente ecuación:

$$Genoma (pb) = masa (pg) \cdot 0,978 \times 10^9$$

25 De esta forma, es posible conocer la masa correspondiente a 1 genoma de cada una de las especies tratadas, y convertir datos de masa de ADNg de cada muestra en número de genomas (Tabla 22).

Microorganismo	Genoma (Mb)	Masa (pg) x genoma (GE)
<i>B. cereus</i>	5,4	0,0055214
<i>E. coli</i>	5,6	0,0057259
<i>Fam. Enterobacteriaceae</i>	5,6	0,0057259
<i>C. perfringens</i>	3,3	0,0033742
<i>S. aureus</i>	2,9	0,0029652

Tabla 22. Masa de un genoma (o genomas equivalentes, GE) para los cinco microorganismos cuantificables por qRTi-PCR. Fuente: genomes online.

5 Como se evidencia en las Figuras 15A-B y 16A-C, ha sido posible obtener amplificación significativa en las diluciones ensayadas, siendo entonces los umbrales mínimos detectables en cada caso los que se muestran en la Tabla 23.

Microorganismo	Umbral	Masa en pg
<i>E. coli</i>	1 GE	5,57259E-3
<i>B. cereus</i>	1 GE	5,5214E-3
<i>C. perfringens</i>	1 GE	3,33742E-3
<i>F. enterobacteriaceae</i>	5 GE	5,57259E-3*
<i>S. aureus</i>	1 GE	2,9652E-3

Tabla 23. Umbral de detección, expresado en genomas equivalentes (GE) para cada uno de los microorganismos sujetos a cuantificación por qRTi-PCR. (*) Obtenido usando como referencia en genoma de *E. coli*.

10

2.4. qRTi-PCR en modo dúplex.

15

Los valores de concentración resultantes en esta optimización, tanto para parejas de cebadores como de sondas TaqMan, fueron aplicados en reacciones dúplex de qRTi-PCR en las que se encontraban presentes ADNg de dos microorganismos y los cebadores y sondas TaqMan específicos a cada uno de ellos. Las condiciones de reacción, ciclos y temperaturas usadas en esta optimización de las reacciones qRTi-PCR dúplex fueron como las que se indican en las **Tablas 15 y 16**.

20

Los resultados de estos ensayos se muestran en las Figuras 17A-C, 18A-C, 19A-B, 20 y 21A-D, en las que se incorpora también el control interno de amplificación (IAC) diseñado.

25

2.5. Diseño y construcción de un control interno de amplificación quimérico.

Con el fin de evitar la obtención de falsos resultados negativos y de confirmar el correcto funcionamiento de las reacciones de qRTi-PCR, se diseñó un control interno de amplificación quimérico (QIAC), el cual estaba conformado por una secuencia de ADN heteróloga a las dianas seleccionadas para detección y cuantificación, así como a todos los microorganismos de la colección: un fragmento interno al gen de la cinamoil-CoA reductasa de *Eucalyptus globulus* (GenBank AY656818).

La construcción de este QIAC fue llevada a cabo mediante la adición progresiva de los sitios de anillamiento de los cebadores diseñados para qRTi-PCR, por medio de reacciones de PCR en las cuales se incorporaron cebadores de gran longitud, diseñados manualmente (Tabla 24).

Cebador	Secuencia	Tm (°C)
GVR-QIAC1-up	SEQ ID NO: 42	55
GVR-QIAC1-rp	SEQ ID NO: 43	
GVR-QIAC2-up	SEQ ID NO: 44	60
GVR-QIAC2-rp	SEQ ID NO: 45	
GVR-QIAC3-up	SEQ ID NO: 46	60
GVR-QIAC3-rp	SEQ ID NO: 47	

Tabla 24. Cebadores utilizados para la construcción del IAC quimérico (QIAC). Cada pareja añade progresivamente un grupo de sitios de anillamiento para los cebadores específicos a cada microorganismo.

SEQ ID NO: 42

AAAATGGGAAAGTTCTTTCAACACCAAGCGGGACTTAACCCAACATTTTCACAAAGGATTGTCAA
GCTGCTCCTC

SEQ ID NO: 43

AAAATGGTCTCGCTTCATATCCAAAACCGGCGTAGTTAAAGAAATCATGAAGCTCCGTCCAGCT
CTCTC

SEQ ID NO: 44

AAAACCGCAATTTAACAAAACACCAAGGTCGTAGTAGTGGAAGCGAATGAATGGGAAAGTTCTT
TCAACACC

SEQ ID NO: 45:

AAAAAAAAACAAAACGGTGGATTAAGAGAAGCAACGCCACCATCTTCAGAATGGTCTCGCTTCA
TATCCAA

SEQ ID NO: 46

AAAAAAGCTTTGGTGATTACCGACGAAAACGAACCGCAATTTAACAAAACACC

SEQ ID NO: 47

AAAAGGATCCATGCAACGCGAAGAACCTTACCTAAAAAACAAAACGGTGGATTAAGAG

5 La inserción de las diversas secuencias de anillamiento fue realizada en tres etapas (Figura 22):

a) Se diseñó una primera pareja de cebadores (GVR-QIAC1-up/rp) que hibridaba en los extremos de la secuencia de 120 bp del gen de *E. globulus* y añadía al amplicón resultante las secuencias de hibridación para los cebadores up de la familia *Enterobacteriaceae* y *C. perfringens*, y para los cebadores rp de *S. aureus* y *E. coli*.

b) En un segundo paso, se diseñó un segundo par de cebadores (GVT-QIAC2-up/rp), que añadía al producto de PCR generado en la etapa previa, los sitios de hibridación para los cebadores up de *S. aureus*, *B. cereus* y *C. perfringens*, y para los cebadores rp de los anteriores microorganismos, pero en orden inverso.

c) Finalmente, se diseñó un tercer par de cebadores (GVR-QIAC3-up/rp), que añadía los sitios de hibridación para los cebadores up de *E. coli* y *S. aureus*, y para los cebadores rp de la familia *Enterobacteriaceae* y *C. perfringens*. En el extremo 5' de GVR-QIAC3-up, se añadió un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *HindIII*, mientras que en el del cebador rp, otro para la enzima *BamHI* para facilitar la comprobación de la orientación del fragmento después de la clonación del mismo.

Finalmente se obtuvo un inserto de aproximadamente 360 bp que fue ligado en el vector PCR-Blunt, obteniéndose una forma del QIAC estable y fácil de mantener y utilizar.

El orden de las secuencias de hibridación de los cebadores específicos para cada microorganismo en este QIAC se estableció teniendo como objetivo generar amplicones, durante las reacciones de qRTi-PCR, con un tamaño muy similar entre las diferentes parejas de cebadores para cada microorganismo patógeno, a fin de disminuir o eliminar las diferencias en la eficiencia de amplificación entre los mismos. La estructura final de este QIAC, pGVR-QIAC, se representa en la Figura 23 .

Para la detección de este QIAC durante las reacciones de qRTi-PCR, se diseñaron y ensayaron tres sondas TaqMan™ distintas (TaqMan-IAC1, TaqMan-IAC2 y TaqMan-

IAC3), marcadas con tres fluoróforos diferentes (NED, VIC y FAM respectivamente) para poder ser compatibles con las sondas específicas a los microorganismos ensayados en cada caso. El funcionamiento de estas sondas TaqMan fue evaluado en reacciones llevadas a cabo con el cebador up para *Enterobacteriaceae* y el cebador rp para *E. coli*, ambos flanqueantes a la secuencia heteróloga contenida de la quimera, y diluciones decimales seriadas del ADN de referencia stock de este plásmido pGVR-QIAC (Figuras 17A-C).

Una vez confirmado el funcionamiento de las tres sondas específicas para el QIAC diseñado y construido, se procedió a incorporarlo en reacciones de qRTi-PCR uniplex y dúplex con ADNg, cebadores y sondas para los cinco tipos de microorganismos tratados y en todas las combinaciones posibles de los mismos, tal y como se describe en la Tabla 10. Los resultados obtenidos en estos ensayos se muestran en las Figuras 18A-C, 19A-B, 20 y 21A-D.

Tanto en las reacciones uniplex como para las reacciones dúplex descritas, se obtuvo amplificación conjunta de la diana genética de cada microorganismo y del QIAC, en las condiciones de concentración de cebadores y sonda previamente optimizadas.

3.6 Ensayos de cuantificación con cuatro microorganismos y una familia de patógenos de transmisión alimentaria, para su comparación con recuentos realizados en placas de medio sólido.

Se llevaron a cabo ensayos de cuantificación con muestras de ADNg obtenidas a partir de cultivos de *B. cereus*, *C. perfringens*, *E.coli*, Familia enterobacteriaceae (*E. coli*) y *S. aureus*. Para esto se inocularon tubos con 5 mL de medio TSB, con 10 μ L del stock en glicerol de cada uno de los microorganismos, incubándose a 37° C y en agitación (250 rpm) hasta obtener una D.O.₆₀₀ \approx 0,6 (crecimiento exponencial). A partir de cada uno de estos cultivos se prepararon diluciones decimales seriadas desde 10⁰ hasta 10⁻⁶, con el fin de llevar a cabo un recuento en placas de medio sólido, en los respectivos medios diferenciales para cada uno de los cinco tipos de patógenos alimentarios. Las Tablas 25A y 25B muestra los resultados obtenidos en estos recuentos.

35

Microorganismo	Dil. 0	Dil. 1	Dil. 2
<i>B. cereus</i>	2,9E+01	2,9	N/D
<i>Enterobacteriaceae</i>	9,9E+07	9,9E+06	9,9E+05
<i>E. coli</i>	9,9E+07	9,9E+06	9,9E+05
<i>C. perfringens</i>	4,36E+07	4,36E+06	4,36E+05
<i>S. aureus</i>	3,51E+05	3,51E+04	3,51E+03

Tabla 25A – Recuento en placas de medios selectivos de las diluciones (Dil.) 0, 1 y 2 de los cinco microorganismos cuantificados por qRTi-PCR.

Microorganismo	Dil. 3	Dil. 4	Dil. 5	Dil. 6
<i>B. cereus</i>	N/D	N/D	N/D	N/D
<i>Enterobacteriaceae</i>	9,9E+04	9,9E+03	9,9E+02	9,9E+01
<i>E. coli</i>	9,9E+04	9,9E+03	9,9E+02	9,9E+01
<i>C. perfringens</i>	4,36E+04	4,36E+03	4,36E+02	4,36E+01
<i>S. aureus</i>	3,51E+02	3,51E+02	3,51	N/D

Tabla 25B – Recuento en placas de medios selectivos de las diluciones (Dil.) 3, 4, 5 y 6 de los cinco microorganismos cuantificados por qRTi-PCR.

5

Se prepararon además estándares de ADNg para cada microorganismo a partir de ADNg extraído previamente. Para esto se realizaron diluciones seriadas desde 10^0 hasta 10^{-4} , cuantificando por espectrofotometría la concentración del ADN presente.

10

Una vez hecho esto se realizaron reacciones de qRTi-PCR para determinar el número de UFC/mL presente en los cultivos de cada microorganismo. Los resultados de estos ensayos se muestran en las Tablas 26, 27, 28, 29 y 30.

Muestra	Sonda	Tarea	Ct	Cantidad	Media	UFC/g				
STBC0	TaqMan-GVR-BC(VIC)	Estándar	Excl,	5,44E+06	N/A	N/A				
STBC0			20,383839							
STBC0			20,411688							
STBC1			23,831049	5,44E+05						
STBC1			23,562721							
STBC1			23,575003							
STBC2			Excl,	5,44E+04						
STBC2			Excl,							
STBC2			27,420425							
STBC3			30,751421	5,44E+03						
STBC3			Excl,							
STBC3			30,736341							
STDBC4			33,973705	5,44E+02						
STDBC4			34,06501							
STDBC4			Excl,							
BC0				o e s u c			22,849108	1,01E+06	9,93E+05	2,48E+07

BC0			22,90403	9,75E+05		
BC1			26,038698	1,20E+05	1,03E+05	2,57E+06
BC1			26,539566	8,55E+04		
BC2			30,933254	4,51E+03	4,27E+03	1,07E+05
BC2			31,106642	4,02E+03		
BC3			34,76712	3,46E+02	3,38E+02	8,45E+03
BC3			34,841778	3,30E+02		
BC4			37,499996	5,56E+01	5,85E+01	1,46E+03
BC4			37,35071	6,14E+01		
BC5			Indeterminado	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
BC5			Indeterminado	0,00E+00		
BC6			Indeterminado	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
BC6			Indeterminado	0,00E+00		
CPOS		Control Positivo	20,243607	5,79E+06	5,93E+06	1,48E+08
CPOS			20,174883	6,06E+06		
CNEG		Control Negativo	39,58717			
CNEG			Indeterminado			

Tabla 26. Resultados obtenidos en la cuantificación por qRTi-PCR de muestras obtenidas a partir de la contaminación de matrices alimentarias, con *B. cereus* CECT 131. Cebadores: GVR-RT-BC-up/rp; Sonda=TaqMan-GVR-BC (VIC). Como control positivo se ha utilizado el ADNg estándar en su dilución 0. Como control negativo, H₂Od. Recta: $y=-3,438433x+47,89$. $R^2= 0,9993086$. Leyenda: STBC= ADN estándar. BC= muestra desconocida. CPOS= Control positivo. CNEG= Control negativo. N/A= No analizado.

Muestra	Sonda	Tarea	Ct	Cantidad	Media	UFC/g
ST0	TaqMan-GVR-EB (Cy5)	Estándar	21,3258	4,20E+07	N/A	N/A
ST0			21,1196			
ST0			21,1807			
ST1			24,9857	4,20E+06		
ST1			25,0623			
ST1			25,4212			
ST2			28,9943	4,20E+05		
ST2			28,7962			
ST2			28,7993			
ST3			32,6861	4,20E+04		
ST3			32,5433			
ST3			32,6531			
ST4			36,4406	4,20E+03		
ST4			36,5297			

ST4			36,7414			
EB0	Muestra desconocida		20,9711	4,96E+0 7	4,36E+7	2,18E+1 0
			21,4251	3,77E+0 7		
EB1			21,9758	2,71E+0 7	2,61E+0 7	1,31E+1 0
			22,0933	2,52E+0 7		
EB2			25,677	2,91E+0 6	4,36E+0 7	2,18E+1 0
			25,5102	3,21E+0 6		
EB3			28,7143	4,66E+0 5	3,35E+0 5	1,68E+0 8
			30,08	2,04E+0 5		
EB4			32,7493	4,09E+0 4	4,95E+0 4	2,48E+0 7
			32,168	5,80E+0 4		
EB5			35,5001	7,79E+0 3	7,75E+0 3	3,88E+0 6
			35,5176	7,71E+0 3		
EB6		39,3756	746,750	746,873	3,73E+0 5	
		39,3886	746,997			
CPOS	Control Positivo		21,3559	3,93E+0 7	4,06E+0 7	2,03E+1 0
			21,2511	4,19E+0 7		
CNEG	Control Negativo		Indetermina- do			
			Indeterminado			

Tabla 27. Resultados obtenidos en la cuantificación por qRTi-PCR de muestras obtenidas a partir de la contaminación de matrices alimentarias, con *E. coli* CECT 4267. Cebadores: GVR-RT-EB-up/rp; Sonda=TaqMan-GVR-EB. Como control positivo se ha utilizado el ADN estándar en su dilución 0. Como control negativo, H₂O. 5. Leyenda: STEB= ADN estándar. EB= muestra desconocida. CPOS= Control positivo. CNEG= Control negativo. N/A= No analizado.

Muestra	Sonda	Tarea	Ct	Cantidad	Media	UFC/g
STDEC0	TaqMan-GVR- EC (NED)	Estándar	16,95955	1,82E+09	N/A	N/A
STDEC0			17,380789	1,82E+09		
STDEC0			17,46127	1,82E+09		
STDEC1			19,155218	1,82E+08		
STDEC1			18,585754	1,82E+08		

STDEC1			19,12859	1,82E+08			
STDEC2			22,003311	1,82E+07			
STDEC2			21,571875	1,82E+07			
STDEC2			22,184483	1,82E+07			
STDEC3			25,694881	1820000			
STDEC3			25,060093	1820000			
STDEC3			25,363134	1820000			
STDEC4			28,735554	182000			
STDEC4			28,653055	182000			
STDEC4			28,79233	182000			
EC0		Muestra desconocida	21,73268	3,19E+07	2,46E+07	6,15E+08	
EC0			22,511106	1,73E+07			
EC1			23,991905	5,42E+06	5,43E+06	1,36E+08	
EC1			23,985111	5,45E+06			
EC2			28,203949	1,99E+05	2,67E+05	6,68E+06	
EC2			27,534796	3,36E+05			
EC3			31,795872	1,18E+04	1,86E+04	4,65E+05	
EC3			30,826706	2,54E+04			
EC4			35,072266	9,05E+02	5,45E+02	1,36E+04	
EC4			37,090187	1,86E+02			
EC5			37,05248	1,91E+02	1,90E+02	4,75E+03	
EC5			37,0644	1,90E+02			
EC6			Indeterminado	0	0	0	
EC6			Indeterminado	0	0	0	
CPOS			Control Positivo	16,839546	1,49E+09	1,85E+09	
CPOS				16,33351	2,21E+09	1,85E+09	
CNEG		Control Negativo	Indeterminado				
CNEG			Indeterminado				

Tabla 28. Resultados obtenidos en la cuantificación por qRTi-PCR de muestras obtenidas a partir de la contaminación de matrices alimentarias, con *E.coli* CECT 4267. Cebadores: GVR-RT-EC-up/rp; Sonda=TaqMan-GVR-EC. Como control positivo se ha utilizado el ADNg estándar en su dilución 0. Como control negativo, H₂Od. Recta: $y=-3,271674x+24,632421$. $R^2= 0,9830289$. Leyenda: STEC= ADN estándar. EC= muestra desconocida. CPOS= Control positivo. CNEG= Control negativo. N/A= No analizado.

5

Muestra	Sonda	Tarea	Ct	Cantidad	Media	UFC/g
STDCP0	TaqMan-GVR-CP (VIC)	Estándar	16,126587	2,48E+09	N/A	N/A
STDCP0			15,979957			
STDCP0			16,012886			
STDCP1			18,53924	2,48E+08		

STDCP1			18,629654				
STDCP1			18,595198				
STDCP2			21,740528				
STDCP2			21,663828	2,48E+07			
STDCP2			21,90039				
STDCP3			25,137846				
STDCP3			25,242737	2,48E+6			
STDCP3			25,138357				
STDCP4			28,349356				
STDCP4			28,466436	2,48E+5			
STDCP4			28,753202				
CP0		Muestra desconocida	19,969278	1,10E+08	1,12E+08	2,80E+09	
CP0			19,92844	1,13E+08			
CP1			22,73689	1,46E+07	1,58E+07	3,95E+08	
CP1			22,537806	1,69E+07			
CP2			26,513725	9,26E+05	9,56E+05	2,39E+07	
CP2			26,428482	9,85E+05			
CP3			29,132566	1,37E+05	1,33E+05	3,33E+06	
CP3			29,220282	1,28E+05			
CP4			29,331213	1,18E+05	1,01E+05	2,53E+06	
CP4			29,806509	8,37E+04			
CP5			30,796593	4,06E+04	3,61E+04	9,03E+05	
CP5			31,146183	3,15E+04			
CP6			31,956453	1,74E+04	1,77E+04	4,43E+05	
CP6			31,912092	1,80E+04			
CPOS			Control Positivo	16,162477	1,77E+09	1,12E+08	2,80E+09
CPOS				16,095114	1,86E+09		
CNEG		Control Negativo	Indeterminado				
CNEG				Indeterminado			

5 **Tabla 29.** Resultados obtenidos en la cuantificación por qRTi-PCR de muestras obtenidas a partir de la contaminación de matrices alimentarias, con *C. perfringens* CECT 376. Cebadores: GVR-RT-CP-up/rp; Sonda= TaqMan-GVR-CP. Como control positivo se ha utilizado el ADN estándar en su dilución 0. Como control negativo, H₂Od. Recta: $y = -2,933408x + 4374556$. $R^2 = 0,9830289$. Leyenda: STCP= ADN estándar. CP= muestra desconocida. CPOS= Control positivo. CNEG= Control negativo. N/A= No analizado.

Muestra	Sonda	Tarea	Ct	Cantidad	Media	UFC/g
STDSA 0	TaqMan-GVR-SA	Estándar	15,466928	6,10E+07	N/A	N/A
STDSA 0			15,418978			
STDSA 0			15,61989			
STDSA 1			18,244524	6,10E+06		
STDSA 1			18,42763			
STDSA 1			18,438675			
STDSA 2			21,974424	6,10E+05		
STDSA 2			21,760775			
STDSA 2			21,645763			
STDSA 3			25,494719	6,10E+04		
STDSA 3			24,889164			
STDSA 3			25,229448			
STDSA 4			28,396624	6,10E+03		
STDSA 4			28,629251			
STDSA 4			28,620834			
SA0	Muestra desconocida		25,32422	5,50E+04	5,54E+04	1,38E+06
SA0			25,305664	5,57E+04		
SA1			28,266785	7,03E+03	6,78E+03	1,69E+05
SA1			28,374033	6,52E+03		
SA2			31,332685	8,24E+02	4,46E+02	1,12E+04
SA2			34,89109	6,84E+01		
SA3			34,985207	6,41E+01	8,71E+01	2,18E+03
SA3			34,20919	1,10E+02		
SA4			36,154125	2,83E+01	2,98E+01	7,46E+02
SA4			36,005795	3,14E+01		
SA5			36,39117	2,40E+01	1,98E+01	4,96E+02
SA5			36,99764	1,57E+01		
SA6			38,132076	7,09E+00	1,31E+01	3,27E+02
SA6			36,718838	1,91E+01		
CPOS			Control Positivo		15,310203	6,05E+07
CPOS	15,297749	6,10E+07				
CNEG	Control		Indeterminad			

		Negati- vo	o	
CNEG			Indeterminad o	

Tabla 30. Resultados obtenidos en la cuantificación por qRTi-PCR de muestras obtenidas a partir de la contaminación de matrices alimentarias, con *S. aureus* CECT 240. Cebadores: GVR-RT-SA-up/rp; Sonda=TaqMan-GVR-SA. Como control positivo se ha utilizado el ADNg estándar en su dilución 0. Como control negativo, H₂Od. Recta: $y=-3,2919998x+40,3933903$. $R^2= 0,998031$ Leyenda: STSA= ADN estándar. SA= muestra desconocida. CPOS= Control positivo. CNEG= Control negativo. N/A= No analizado.

4. Validación de los métodos de detección por mPCR y de cuantificación por qRTi-PCR, en matrices alimentarias contaminadas artificialmente con los microorganismos relativos a este estudio.

Se llevó a cabo un proceso de validación de los métodos de detección por PCR múltiplex y de cuantificación por qRTi-PCR desarrollados en esta invención, mediante la comparación del método de la invención con los métodos clásicos aplicados habitualmente en el ámbito de la industria alimentaria, y que consisten habitualmente en el recuento de colonias en placas de medios sólidos o en sistemas similares semiautomatizados o spiking.

Para esto, se llevaron a cabo contaminaciones artificiales de diversas matrices alimentarias en el laboratorio del grupo de investigación Biotecnología y Terapia experimental basada en Nutracéuticos (BITTEN) (IUOPA, Universidad de Oviedo), y en la empresa Alce Calidad S.L.

Para estas contaminaciones artificiales se seleccionaron cinco tipos de matrices alimentarias: Cárnicos: hamburguesa de ternera; Lácteos: leche en polvo; Comidas preparadas: fabada enlatada; Pescados y derivados: sardinas en lata; Productos de pastelería: bizcocho.

Diez réplicas de 10 g de cada una de estas matrices fueron introducidas de modo aséptico en bolsas para muestras con filtro WHIRL-PAK BO1195WA (Nasco) y se les añadió a cada una el medio de cultivo universal desarrollado GVRUM hasta alcanzar los 100 g medidos en una balanza de laboratorio MXX-061 (Denver Instrument). Estas

muestras fueron homogenizadas en un Stomacher 80 (Seward), durante 60 s, y a continuación fueron inoculadas con 300 UFC/ml de cada cepa. En los casos en que era necesario un pre-enriquecimiento, esta bolsa se incubó a 37° C durante 24 horas.

5 Las muestras de 1 mL tomadas a partir de las contaminaciones artificiales realizadas en Alce Calidad S.L., se mantuvieron congeladas a -20° C en esta empresa hasta su traslado a las instalaciones de la Universidad de Oviedo, en donde se llevó a cabo la extracción del ADNg.

10 Por otra parte, los microorganismos y matrices alimentarias que iban a ser usadas en los experimentos de contaminación artificial en Silliker Ibérica S.A., fueron enviados desde la Universidad de Oviedo a la sede de esta empresa en Barcelona. Silliker Ibérica S.A., por su parte, una vez obtenidas las muestras de 1 mL de matrices contaminadas en este medio de cultivo, las envió por servicio de mensajería de vuelta
15 a Oviedo, para la extracción de ADNg.

La extracción de este ADNg, para ser usado tanto en reacciones de mPCR como de qRTi-PCR, se realizó siguiendo el protocolo con PrepMan Ultra ya indicado en el apartado 2.1, b).

20

Las muestras de ADNg de todos los tipos fueron sometidas a reacciones de PCR múltiplex (por duplicado para cada muestra) para la detección de los microorganismos correspondientes, según se ha descrito en los apartados anteriores.

25 Las muestras de ADNg procedentes de las contaminaciones artificiales con cinco microorganismos (*B. cereus*, *C. perfringens*, *E. coli*, Familia *Enterobacteriaceae* y *S. aureus*) fueron sometidas a reacciones de cuantificación (por duplicado para cada muestra) mediante qRTi-PCR, siguiendo el protocolo desarrollado en apartados anteriores.

30

Los resultados obtenidos a partir de la detección clásica y mPCR de los once tipos de patógenos se muestran en las Tablas 31A y 31B. Los datos obtenidos en los recuentos según el método clásico y por qRTi-PCR, se muestran en las Tablas 32A a 32E.

35

Producto	Nº	BC		CJ		CP		CS		EC		EB		LM		SA		SE		
		C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	
Cármicos	1	P	P	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
	2	P	P	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
	3	P	P	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
	4	P	P	A	A	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	P	P	P	P	
	5	P	P	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	
	6	P	P	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P
	7	P	P	A	A	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	8	P	P	A	A	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	9	P	P	A	A	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	P	P	P	P	A
	10	P	P	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Preparados	1	P	P	A	A	P	P	P	P	P	A	P	A	P	P	A	A	A	A	
	2	P	P	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	A	A	A	
	3	P	P	A	A	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	A	P	A	P	
	4	P	P	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	A	A	
	5	P	P	A	A	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	A	P	A	P	
	6	P	P	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	A	P	
	7	P	P	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	A	A	
	8	P	P	A	A	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	A	P	A	P	
	9	P	P	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	A	P	
	10	P	P	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	A	A	
Pescado	1	P	P	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	
	2	P	P	A	A	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	A	P	P	A	
	3	P	P	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P	A	
	4	P	P	A	A	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	P	P	P	A	
	5	P	P	A	A	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	P	P	P	A	
	6	P	P	A	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	A	P	A	
	7	P	P	A	A	P	P	P	P	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	
	8	P	P	A	A	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	A	P	P	P	
	9	P	P	A	A	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	A	P	P	A	
	10	P	P	A	A	P	P	P	P	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	

Tabla 31A. Resultados obtenidos en la detección en placas de medio de cultivo sólido y mPCR, de siete especies, un género y una familia de patógenos alimentarios. Leyenda: BC= *B. cereus*; CJ= *C. jejuni*; CP= *C. perfringens*; CS= *C. sakazakii*; EC= *E. coli*; EB= *Enterobacteriaceae*; LM= *L. monocytogenes*; SA= *S. aureus* y SE= *Salmonella*. P= Presencia; A= Ausencia. C= Método clásico en Placa y M= mPCR.

5

Producto	N°	BC		CJ		CP		CS		EC		EB		LM		SA		SE	
		C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M
Pastelería	1	P	P	P	A	A	P	P	A	P	A	P	A	P	A	A	A	P	A
	2	A	P	P	A	A	P	P	A	P	A	P	P	P	P	A	P	P	P
	3	P	P	A	A	A	A	P	A	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P
	4	P	P	A	A	P	P	P	A	P	P	P	P	P	A	A	A	P	A
	5	A	P	A	A	P	P	P	A	P	P	P	P	P	A	A	A	P	A
	6	P	P	A	A	P	A	P	A	P	A	P	P	P	A	A	A	P	P
	7	P	A	A	A	P	A	P	A	P	P	P	A	P	A	A	A	P	A
	8	A	P	A	A	P	P	P	A	P	P	P	P	P	P	A	P	P	A
	9	P	P	A	A	A	P	P	A	P	A	P	A	P	P	A	P	P	A
	10	P	P	A	A	P	P	P	A	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P
Lácteos	1	P	P	A	A	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	P	P	P	P
	2	P	P	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	A
	3	P	P	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	A
	4	P	P	A	A	P	P	P	A	P	A	P	P	P	P	P	A	P	A
	5	P	P	A	A	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	P	A	P	A
	6	P	P	A	A	P	P	P	A	P	P	P	P	P	P	P	A	P	A
	7	P	P	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P
	8	P	P	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	A
	9	P	P	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	A
	10	P	P	A	A	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	P	A	P	A

Tabla 31B. Resultados obtenidos en la detección en placas de medio de cultivo sólido y mPCR, de siete especies, un género y una familia de patógenos alimentarios. Leyenda: BC= *B. cereus*; CJ= *C. jejuni*; CP= *C. perfringens*; CS= *C. sakazakii*; EC= *E. coli*; EB= *Enterobacteriaceae*; LM= *L. monocytogenes*; SA= *S. aureus* y SE= *Salmonella*. P= Presencia; A= Ausencia. C= Método clásico en Placa y M= mPCR.

	BC				CP				EB				EC				SA	
	C	Q1	Q2	C	Q1	Q2												
	9,9E+1	1,3E+5	9,5E+3	2,0E+2	1,1E+5	3,0E+3	1,5E+4	7,4E+6	1,7E+7	1,7E+4	5,6E+7	4,9E+7	3,7E+3	8,6E+3	9,2E+3			
	9,9E+1	6,2E+3	1,5E+4	1,3E+2	5,3E+4	4,2E+4	1,2E+4	5,1E+6	7,6E+6	2,5E+4	3,0E+7	4,1E+7	2,9E+3	6,3E+3	7,2E+3			
	9,9E+1	1,4E+4	9,3E+3	2,7E+2	1,3E+4	3,3E+4	3,0E+4	7,1E+6	1,6E+7	1,7E+4	7,0E+7	3,7E+7	1,7E+3	6,6E+3	6,5E+3			
	9,9E+1	7,1E+3	3,1E+3	1,7E+2	6,2E+4	4,4E+4	2,1E+4	1,9E+7	1,3E+7	1,5E+4	6,5E+7	2,3E+7	3,1E+3	7,2E+3	7,9E+3			
	9,9E+1	6,3E+4	6,9E+4	1,5E+2	4,8E+5	3,0E+5	1,5E+4	1,1E+7	1,2E+7	2,5E+4	2,8E+7	4,1E+7	3,4E+3	8,1E+3	7,0E+3			
	9,9E+1	4,9E+4	1,1E+5	1,7E+2	2,8E+5	2,0E+5	2,1E+4	8,6E+6	8,4E+6	1,7E+4	3,2E+7	3,6E+7	2,2E+3	5,5E+3	8,8E+3			
	9,9E+1	2,4E+4	6,5E+4	2,3E+2	2,5E+5	4,0E+4	1,7E+4	9,9E+6	1,2E+7	1,7E+4	3,1E+7	3,8E+7	2,3E+3	9,2E+3	6,9E+3			
	9,9E+1	3,5E+3	4,4E+3	2,1E+2	2,0E+4	1,2E+5	1,1E+4	5,9E+6	7,1E+6	3,0E+4	3,5E+7	2,0E+7	3,4E+3	6,9E+3	7,0E+3			
	9,9E+1	8,7E+3	1,2E+4	1,4E+2	5,4E+4	2,3E+4	1,2E+4	3,0E+6	8,6E+6	1,2E+4	4,3E+7	4,0E+7	2,9E+3	7,9E+3	8,0E+3			
	9,9E+1	7,3E+3	5,4E+3	1,6E+2	1,8E+4	5,5E+3	1,1E+4	6,5E+6	9,3E+6	9,1E+3	2,9E+7	2,3E+7	1,7E+3	7,4E+3	6,0E+3			
X	9,9E+1	3,1E+4	3,0E+4	1,8E+2	1,3E+5	8,1E+4	1,7E+4	8,3E+6	1,1E+7	1,8E+4	4,2E+7	3,5E+7	2,7E+3	7,3E+3	7,4E+3			
σ	0,0E+0	3,9E+4	3,6E+4	4,4E+1	1,5E+5	9,8E+4	6,0E+3	4,3E+6	3,5E+6	6,4E+3	1,6E+7	9,4E+6	7,2E+2	1,1E+3	1,0E+3			

CÁRNICOS

Tabla 32A

	BC		CP		EB		EC		SA		BC		CP		EB		EC		SA				
	C	Q1	Q2	C	Q1	Q2	C	Q1	Q2	C	Q1	C	Q1	Q2	C	Q1	Q2	C	Q1	Q2	C	Q1	
	1,7E+2	2,2E+3	2,7E+3	3,9E+1	5,7E+4	5,8E+4	6,3E+2	0,0E+0	0,0E+0	9,1E+3	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	3,2E+1	0,0E+0								
	9,9E+1	2,7E+3	2,2E+3	9,0E+0	5,3E+4	4,1E+4	4,4E+2	1,2E+7	0,0E+0	6,8E+2	4,3E+3	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	3,5E+5								
	6,0E+2	3,0E+3	3,8E+3	3,9E+1	7,4E+4	6,6E+4	8,3E+2	0,0E+0	0,0E+0	4,3E+2	0,0E+0												
	9,0E+2	5,7E+3	6,3E+3	5,0E+1	1,3E+5	1,2E+5	4,8E+2	0,0E+0	3,9E+4	4,6E+2	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	5,4E+1	3,6E+5	3,5E+5							
	9,9E+1	1,8E+4	1,8E+4	9,0E+1	4,1E+5	6,2E+4	3,6E+2	3,9E+3	0,0E+0	9,5E+2	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	2,1E+1	0,0E+0								
	4,0E+2	4,1E+3	4,1E+3	5,0E+1	8,4E+4	9,2E+4	7,3E+2	0,0E+0	0,0E+0	4,3E+2	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	4,4E+1	0,0E+0								
	1,0E+2	7,0E+3	8,1E+3	8,0E+1	1,5E+5	1,5E+5	3,9E+2	0,0E+0	0,0E+0	4,8E+2	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	3,3E+1	0,0E+0								
	9,9E+1	5,5E+3	4,9E+3	6,0E+1	8,0E+4	8,9E+4	5,7E+2	0,0E+0	0,0E+0	8,1E+2	0,0E+0												
	1,0E+2	1,1E+3	9,2E+2	3,9E+1	2,1E+4	2,8E+4	4,2E+2	0,0E+0	1,1E+5	6,4E+2	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	6,5E+4	3,7E+5							
	1,0E+2	5,8E+3	7,6E+3	4,0E+1	4,4E+4	4,8E+4	3,6E+2	0,0E+0	0,0E+0	6,4E+2	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	1,0E+1	0,0E+0								
X	2,7E+2	5,5E+3	5,8E+3	5,0E+1	1,1E+5	7,5E+4	5,2E+2	1,2E+6	1,5E+4	1,5E+3	4,3E+2	4,2E+2	1,9E+1	7,8E+4	1,1E+5								
σ	2,8E+2	4,8E+3	4,9E+3	2,3E+1	1,1E+5	3,7E+4	1,6E+2	3,6E+6	3,5E+4	2,7E+3	1,4E+3	1,3E+3	2,0E+1	1,5E+5	1,7E+5								

PESCADO
TABLA 32B

EC	CP		EB		EC		SA		BC		CP		EB		EC		SA	
	C	Q1	Q2	C	Q1	Q2	C	Q1	C	Q1	C	Q1	Q2	C	Q1	C	Q1	
9,9E+1	1,4E+3	1,3E+3	3,8E+2	3,8E+2	5,8E+3	7,2E+3	1,7E+2	1,5E+7	1,3E+7	5,2E+2	3,5E+2	1,6E+2	0,0E+0	2,1E+4	2,4E+4			
9,9E+1	1,8E+3	1,5E+3	3,1E+2	4,4E+3	4,0E+3	4,0E+3	1,2E+2	8,0E+6	8,3E+6	2,1E+2	4,8E+2	6,6E+2	0,0E+0	2,6E+4	2,3E+4			
9,9E+1	2,8E+4	4,7E+4	2,5E+2	1,2E+5	1,1E+5	1,1E+5	5,4E+1	9,4E+6	1,1E+7	1,3E+2	5,5E+2	1,7E+2	0,0E+0	2,3E+4	3,2E+4			
9,9E+1	7,0E+2	7,7E+2	3,4E+2	7,0E+3	5,5E+3	5,5E+3	1,7E+2	6,7E+6	7,9E+6	9,3E+1	8,7E+2	1,4E+2	0,0E+0	6,1E+3	3,6E+4			
9,9E+1	5,4E+3	5,5E+3	2,9E+2	2,4E+5	2,2E+4	2,2E+4	1,8E+2	6,8E+6	7,1E+6	1,4E+2	1,7E+2	1,3E+2	0,0E+0	4,1E+4	3,5E+4			
9,9E+1	3,7E+3	3,7E+3	4,0E+2	1,6E+4	1,8E+4	1,8E+4	2,0E+2	8,6E+6	8,9E+6	2,2E+2	7,4E+1	3,6E+2	0,0E+0	5,0E+4	3,9E+4			
9,9E+1	6,6E+3	6,2E+3	3,4E+2	2,5E+4	2,5E+4	2,5E+4	2,1E+2	6,8E+6	6,6E+6	1,7E+2	8,8E+2	7,0E+2	0,0E+0	4,9E+4	3,8E+4			
9,9E+1	1,4E+4	1,2E+4	3,2E+2	5,3E+4	5,2E+4	5,2E+4	1,2E+2	7,6E+6	8,7E+6	1,0E+2	2,2E+2	6,6E+2	0,0E+0	4,7E+4	2,3E+4			
9,9E+1	5,0E+3	4,1E+3	2,9E+2	1,6E+4	1,8E+4	1,8E+4	3,0E+2	7,4E+6	8,8E+6	1,6E+2	8,4E+2	5,0E+2	0,0E+0	4,4E+4	4,1E+4			
9,9E+1	1,7E+4	8,8E+3	2,9E+2	2,8E+4	4,2E+4	4,2E+4	1,5E+2	6,1E+6	5,8E+6	1,8E+2	4,9E+2	3,0E+2	0,0E+0	4,7E+4	5,0E+4			
9,9E+1	8,4E+3	9,1E+3	3,2E+2	5,1E+4	3,1E+4	3,1E+4	1,7E+2	8,2E+6	8,5E+6	1,9E+2	4,9E+2	3,7E+2	0,0E+0	3,5E+4	3,4E+4			
0,0E+0	8,8E+3	1,4E+4	4,5E+1	7,5E+4	3,3E+4	3,3E+4	6,5E+1	2,4E+6	2,0E+6	1,2E+2	3,0E+2	2,3E+2	0,0E+0	1,5E+4	8,9E+3			

PREPARADOS

X

σ

TABLA 32C

BC	CP		EB		EC		SA		BC		CP		EB		EC		SA	
	C	Q1	Q2	C	Q1	Q2	C	Q1	C	Q1	Q2	C	Q1	C	Q1	Q2	C	Q1
9,9E+1	2,3E+3	2,6E+3	1,6E+2	4,5E+3	5,7E+3	9,0E+2	0,0E+0	1,6E+2	0,0E+0									
9,9E+1	2,8E+4	3,0E+4	1,3E+2	1,2E+5	1,2E+5	7,1E+2	1,1E+5	4,1E+3	0,0E+0									
9,9E+1	2,0E+4	1,9E+4	7,0E+1	8,0E+4	8,5E+4	1,7E+3	3,8E+4	5,5E+3	3,5E+3	3,1E+3	0,0E+0	5,4E+3	6,1E+3					
9,9E+1	9,1E+3	9,3E+3	7,0E+1	3,3E+4	4,1E+4	5,1E+2	6,4E+4	1,5E+4	4,4E+3	4,6E+3	0,0E+0	3,7E+5	3,8E+5					
9,9E+1	6,4E+3	5,6E+3	6,0E+1	2,6E+4	2,9E+4	5,6E+2	0,0E+0	6,0E+3	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0					
9,9E+1	1,2E+4	1,6E+4	1,0E+2	4,5E+4	5,2E+4	3,9E+2	0,0E+0	3,9E+3	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0					
9,9E+1	1,1E+4	1,3E+4	5,0E+1	5,0E+4	5,3E+4	7,1E+2	5,7E+4	9,1E+3	0,0E+0	4,6E+8	0,0E+0	3,8E+5	4,0E+5					
9,9E+1	4,6E+3	5,2E+3	1,0E+2	2,4E+4	2,3E+4	7,3E+2	7,4E+4	5,3E+3	2,2E+8	0,0E+0	0,0E+0	1,0E+5	0,0E+0					
9,9E+1	1,2E+4	1,5E+4	7,0E+1	6,1E+4	6,9E+4	6,1E+2	1,2E+5	6,0E+3	3,7E+3	2,5E+3	0,0E+0	3,1E+5	2,8E+5					
9,9E+1	1,4E+4	1,4E+4	1,0E+2	7,6E+4	7,3E+4	5,7E+2	0,0E+0	3,1E+3	0,0E+0	6,9E+2	0,0E+0	3,1E+5	0,0E+0					
9,9E+1	1,2E+4	1,3E+4	9,1E+1	5,1E+4	5,5E+4	7,4E+2	4,6E+4	5,8E+3	2,2E+7	4,6E+7	0,0E+0	1,5E+5	1,1E+5					
0,0E+0	7,6E+3	8,1E+3	3,4E+1	3,3E+4	3,2E+4	3,7E+2	4,6E+4	4,0E+3	7,1E+7	1,4E+8	0,0E+0	1,7E+5	1,7E+5					
PASTELERIA																		
X																		
σ																		

TABLA 32D

C	BC		CP		EB		EC		SA		BC		CP		EB		EC		SA	
	Q1	Q2	Q1	Q2	Q1	Q2	C	C	Q1	Q2	C	C	Q1	Q2	Q1	Q2	C	C	Q1	Q2
9,9E+1	2,5E+3	2,5E+3	2,9E+2	2,9E+2	6,7E+3	3,4E+4	5,2E+3	1,4E+5	2,4E+5	6,9E+2	1,4E+5	1,1E+5	3,3E+1	6,7E+3	5,6E+3					
9,9E+1	1,2E+4	1,3E+4	2,5E+2	2,5E+2	4,4E+4	10E+4	3,7E+3	2,2E+5	2,9E+5	6,2E+2	7,2E+4	4,5E+4	5,9E+1	6,3E+3	6,1E+3					
9,9E+1	4,1E+3	4,4E+3	2,6E+2	2,6E+2	0,0E+0	4,5E+4	3,7E+3	3,1E+5	1,2E+6	6,3E+2	2,6E+5	2,5E+5	1,3E+2	9,7E+3	8,3E+3					
9,9E+1	9,4E+3	1,1E+4	1,0E+2	1,0E+2	4,2E+4	3,2E+4	3,1E+3	3,6E+4	5,4E+4	6,4E+2	3,0E+4	1,9E+4	1,5E+2	8,5E+3	5,9E+3					
9,9E+1	6,8E+3	6,1E+3	9,0E+1	9,0E+1	3,4E+4	1,5E+4	6,0E+3	9,4E+4	1,3E+5	8,1E+2	8,6E+4	1,6E+5	1,3E+2	7,1E+3	9,8E+3					
9,9E+1	4,8E+3	5,3E+3	4,0E+1	4,0E+1	1,8E+4	1,1E+4	4,0E+3	1,1E+5	3,6E+4	7,1E+2	3,0E+4	4,8E+4	2,3E+2	1,6E+4	1,5E+4					
9,9E+1	1,9E+3	3,0E+1	1,9E+2	1,9E+2	8,4E+3	2,7E+4	4,0E+3	4,3E+4	6,7E+4	1,2E+3	2,7E+4	3,8E+4	5,0E+3	1,2E+4	4,3E+4					
9,9E+1	9,5E+2	9,9E+2	3,0E+2	3,0E+2	2,3E+4	2,1E+3	4,8E+3	1,4E+5	1,3E+5	1,1E+3	2,5E+5	2,3E+5	2,8E+2	1,6E+4	3,1E+4					
9,9E+1	3,0E+2	2,4E+2	2,7E+2	2,7E+2	2,1E+3	1,1E+4	2,9E+3	1,5E+4	2,5E+4	1,0E+3	1,4E+4	1,5E+4	1,7E+2	1,9E+4	1,8E+4					
2,0E+2	1,5E+3	1,8E+3	3,0E+2	3,0E+2	1,5E+4	1,4E+4	6,7E+3	8,5E+4	2,0E+5	7,3E+2	6,5E+4	7,4E+4	8,6E+1	2,1E+4	1,9E+4					
X	1,1E+2	4,5E+3	4,6E+3	2,1E+2	1,9E+4	2,0E+4	4,4E+3	1,2E+5	2,3E+5	8,1E+2	9,7E+4	9,8E+4	6,3E+2	1,2E+4	1,6E+4					
σ	3,2E+1	3,9E+3	4,5E+3	9,8E+1	1,6E+4	1,3E+4	1,2E+3	8,9E+4	3,4E+5	2,1E+2	9,0E+4	8,5E+4	1,5E+3	5,4E+3	1,2E+4					

Tabla 32E

Tablas 32A- 32E Resultados obtenidos en la cuantificación en placas de medio de cultivo sólido y qRTi-PCR, de cuatro especies y una familia de patógenos alimentarios.

Leyenda: BC= *B. cereus*; CP= *C. perfringens*; EC= *E. coli*; EB= *Enterobacteriaceae* y

5 SA= *S. aureus*. C= Método clásico en Placa y Q=qRTi-PCR.

5. Cultivo y enriquecimiento de microorganismos.

5.1 Rectas de crecimiento.

Se obtuvieron curvas de DO_{600} versus número de UFC/mL para cada microorganismo patógeno, tal y como se describe en la sección de Material y Métodos, utilizando el medio de cultivo correspondiente indicado en la Tabla 4. En la Figuras 24A-H se muestran las curvas obtenidas con sus respectivas ecuaciones.

Todos los datos se han representado mediante gráficos de regresión lineal realizados en la aplicación ofimática Excel 2007 (Microsoft).

10

Para cada microorganismo se ha obtenido una recta de regresión lineal cuya ecuación se ha utilizado en el cálculo de las UFC/mL presentes en los inóculos usados. De esta forma solamente con la determinación experimental de la DO_{600} del mencionado inóculo, es posible establecer la concentración celular. En la Tabla 35 se hace un resumen de las rectas obtenidas para cada microorganismo.

15

Microorganismo	Ecuación	R^2
<i>E. coli</i>	$y = 4 \cdot 10^{-2}x + 0,0067$	0,993
<i>Enterobacteriaceae</i>		
<i>Shigella spp.</i>		
<i>S. aureus</i>	$y = 6 \cdot 10^{-9}x + 0,0008$	0,999
<i>C. perfringens</i>	$y = 6 \cdot 10^{-12}x + 0,0279$	0.991
<i>B. cereus</i>	$y = 7 \cdot 10^{-14}x + 0,0424$	0.985
<i>L. monocytogenes</i>	$y = 1 \cdot 10^{-5}x + 0,0182$	0.947
<i>Salmonella spp.</i>	$y = 2 \cdot 10^{-6}x + 0,0092$	0.985
<i>C. sakazakii</i>	$y = 1 \cdot 10^{-6}x - 0.0011$	0.999
<i>C. jejuni</i>	$y = 3 \cdot 10^{-9}x - 1 \cdot 10^{-6}$	1

Tabla 33. Ecuaciones de la recta de regresión lineal UFC/mL versus DO_{600} , para los microorganismos relativos a este estudio.

20

5.2 Desarrollo de un medio universal de pre-enriquecimiento para microorganismos.

Todos los ensayos de detección por PCR, tanto uniplex como múltiplex, requieren un paso previo de pre-enriquecimiento para favorecer el crecimiento y la detección de los patógenos inoculados artificialmente en las matrices alimentarias, cuando se trata de

25

patógenos en los que no se permite legalmente su presencia en el alimento correspondiente. Para esto se ha desarrollado un medio de enriquecimiento no selectivo y universal, el cual es capaz de cubrir las necesidades nutricionales de todos los microorganismos involucrados en este trabajo. El medio GVRUM está compuesto por agua de peptona tamponada (Merck) (20 g/L), sangre desfibrinada y hemolisada de caballo (Oxoid) (50 mL/L), manitol (20 g/L) y suplemento para crecimiento de *Campylobacter* (Oxoid, #SR0232E) (2 viales de 2mL/L).

Para comprobar en primer lugar la capacidad de recuperación de células viables y ADNg de los microorganismos inoculados de forma individual en las matrices procesadas con este medio, se llevaron a cabo experimentos de contaminación artificial según se describe en el apartado “Material y Métodos”, sección 1.4. Para ello se sembraron en placas del medio selectivo correspondiente a cada patógeno (Tabla 5) nueve diluciones decimales de una alícuota de 1 mL del homogenizado de cada matriz inoculada en este medio universal de pre-enriquecimiento. Adicionalmente, 1 mL de cada homogenizado fue utilizado para la extracción de ADN, el cual fue sometido a reacciones de PCR con los cebadores diseñados para las reacciones de PCR múltiplex (Tabla 1). Los amplicones que se obtienen con cada pareja de cebadores específicos para cada microorganismo se indican en dicha Tabla 1.

Para los ocho microorganismos, los dos géneros bacterianos y la familia de patógenos de origen alimentario, se obtuvo amplificación positiva en las matrices contaminadas artificialmente y pre-enriquecidas con el medio universal diseñado. Los resultados se encuentran en las Figuras 25, 26A-C, 27A-D y 28A-B.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para la detección simultánea de *Campylobacter jejuni*,
5 *Cronobacter sakazakii*, una cepa enterohemorrágica de *Escherichia coli*, *Listeria*
monocytogenes, *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* en una muestra que comprende:
- a) Aislar el ADN de dicha muestra,
- b) Llevar a cabo una PCR multiplex sobre el ADN aislado en la etapa a)
mediante el empleo de las siguientes parejas de cebadores:
- 10 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que
comprende la secuencia SEQ ID NO: 3 y el oligonucleótido que
comprende la secuencia SEQ ID NO: 4 diseñados para amplificar *C.*
jejuni,
 - 15 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que
comprende la secuencia SEQ ID NO: 7 y el oligonucleótido que
comprende la secuencia SEQ ID NO: 8 diseñados para amplificar *C.*
sakazakii,
 - 20 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que
comprende la secuencia SEQ ID NO: 11 y el oligonucleótido que
comprende la secuencia SEQ ID NO: 12 diseñados para amplificar
una cepa hemorrágica de *E. coli*,
 - 25 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que
comprende la secuencia SEQ ID NO: 15 y el oligonucleótido que
comprende la secuencia SEQ ID NO: 16 diseñados para amplificar *L.*
monocytogenes,
 - 30 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que
comprende la secuencia SEQ ID NO: 17 y el oligonucleótido que
comprende la secuencia SEQ ID NO: 18 diseñados para amplificar
Salmonella spp.
 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que
comprende la secuencia SEQ ID NO: 19 y el oligonucleótido que
comprende la secuencia SEQ ID NO: 20 diseñados para amplificar
Shigella spp. y
- c) Detectar los productos de amplificación obtenidos en la etapa b).

2. Método según la reivindicación 1, en el que la cepa enterohemorrágica de *E. coli* es *E. coli* O157:H7, la especie de *Salmonella spp.* es *Salmonella enterica* y/o la especie de *Shigella spp.* es *Shigella dysenteriae*.

5 3. Método según la reivindicación 1 ó 2, que adicionalmente comprende la detección simultánea de al menos 1, preferiblemente 2, 3, 4 o 5 de los microorganismos seleccionados de la lista que consiste en *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, un microorganismo de la familia *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* mediante el empleo de las siguientes parejas de
10 cebadores:

- La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 2 diseñados para amplificar *B. cereus*,

15 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 5 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 6 diseñados para amplificar *C. perfringens*,

20 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 13 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 14 diseñados para amplificar la familia *Enterobacteriaceae*,

25 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 9 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 10 diseñados para amplificar *E. coli*, o

30 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 21 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 22 diseñada para amplificar *S. aureus*.

4. Método según la reivindicación 3, que adicionalmente comprende, previamente a la etapa a), la homogeneización de la muestra y la posterior extracción de dos o más alícuotas de la muestra homogeneizada, en donde, una de las alícuotas es
35 empleada en la etapa a) y la otra es empleada en caso de que se quiera cuantificar los microorganismos detectados en la muestra.

5. Método según la reivindicación 4, en el que si *B. cereus*, *C. perfringens*, un microorganismo de la Familia *Enterobacteriaceae*, *E. coli* y/o *S. aureus* son detectados en la etapa c), entonces, el método comprende adicionalmente las siguientes etapas:

d) Aislar el ADN de una de las alícuotas obtenidas previamente a la etapa a),

e) Llevar a cabo una PCR a Tiempo Real del ADN aislado en la etapa d) de dichos microorganismos con las siguientes parejas de cebadores y sondas:

- La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 23 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 24, y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 34 si el microorganismo a detectar es *B. cereus*,

- La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 25 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 26, y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID NO: 35 si el microorganismo a detectar es *C. perfringens*,

- La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 27 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 28, y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID NO: 36 si el microorganismo a detectar es de la familia *Enterobacteriaceae*,

- La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 29 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 30, y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID NO: 37 si el microorganismo a detectar es *E. coli*, y/o

- La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 31 y el oligonucleótido que comprende la SEQ ID NO: 32, y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID NO: 38 si el microorganismo a detectar es *S. aureus*, y

f) cuantificar los productos amplificados en la etapa e).

6. Método según la reivindicación 5, en el que la qRTi-PCR comprende al menos una sonda para el control interno de amplificación, seleccionada de la lista que consiste en:

- La sonda de ácido nucleico que comprende el oligonucleótido SEQ ID NO: 39 en el caso de que el microorganismo cuantificado sea *E. coli*, uno de la Familia *Enterobacteriaceae* o *S. aureus*,
 - 5 - La sonda de ácido nucleico que comprende el oligonucleótido SEQ ID NO: 41 en caso de que el microorganismo cuantificado sea *C. perfringens* o *E.coli*,
 - La sonda de ácido nucleico que comprende el oligonucleótido SEQ ID NO: 40 en caso de que el microorganismo cuantificado sea *B. cereus*, *C. perfringens*, *E. coli*, uno de la Familia *Enterobacteriaceae*, o *S.*
10 *aureus*, y
 - Combinaciones de las mismas.
7. Método según la reivindicación 5 ó 6, en el que las sondas están marcadas en uno de sus extremos.
- 15
8. Método según la reivindicación 7, en el que el marcaje es con un fluoróforo.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que previamente a la etapa a), el método comprende el cultivo de la muestra en un medio de
20 enriquecimiento.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en el que la alícuota empleada en la etapa a) es cultivada en un medio de enriquecimiento.
- 25
11. Método según la reivindicación 9 ó 10, en el que el tiempo de incubación de la muestra en el medio de cultivo de enriquecimiento es de entre 16 y 48 horas,
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el medio de cultivo de enriquecimiento comprende Agua de Peptona Tamponada, Sangre de
30 caballo desfibrinada y hemolisada, Manitol y Suplemento de crecimiento de *Campylobacter*.
13. Método según la reivindicación 12, en el que el medio de enriquecimiento comprende
- 35
- Entre 5-100 mL de sangre de caballo desfibrinada y hemolisada por cada 500 mL de medio,

- Entre 2,5-80 g de manitol por cada 500 mL de medio, y/o
- Entre 1-8 mL de suplemento de crecimiento de *Campylobacter* por cada 500 mL de medio.

5 14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la muestra es una muestra de alimento.

10 15. Método según la reivindicación 14, en el que alimento es un producto lácteo, un producto cárnico, pescado, huevo, un ovoderivado, un vegetal, un producto de pastelería, una comida preparada, o una bebida.

16. Un conjunto de parejas de cebadores que comprende:

- 15 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 3 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 4 diseñados para amplificar *C. jejuni*,
- La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 7 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 8 diseñados para amplificar *C. sakazakii*,
- 20 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 11 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 12 diseñados para amplificar una cepa enterohemorrágica de *E. coli*,
- La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 15 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 16 diseñados para amplificar *L. monocytogenes*,
- 25 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 17 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 18 diseñados para amplificar *Salmonella spp.*,
- 30 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 19 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 20 diseñados para amplificar *Shigella spp.*, y

35 17. Conjunto de parejas de cebadores según la reivindicación 16, en el que la cepa hemorrágica de *E. coli* es *E. coli* O157:H7, la especie de *Salmonella spp.* es *Salmonella enterica* y/o la especie de *Shigella spp.* es *Shigella dysenteriae*.

18. Conjunto de parejas de cebadores según la reivindicación 16 o 17, que además comprende 1, preferiblemente 2, 3, 4 ó 5 de las parejas de cebadores seleccionadas de la lista que consiste en:

- 5 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 5 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 6 diseñados para amplificar *C. perfringens*,
- La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 13 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 14 diseñados para amplificar la familia *Enterobacteriaceae*,
- 10 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 9 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 10 diseñados para amplificar *E. coli*,
- La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 21 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 22 diseñada para amplificar *S. aureus*, y
- 15 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 2 diseñados para amplificar *B. cereus*.

20 19. Conjunto de parejas de cebadores según la reivindicación 18, que comprende, además, al menos 1, preferiblemente 2, 3, 4 o 5, de las parejas de cebadores y sondas seleccionadas del grupo que consiste en:

- 25 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 23 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 24, y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 34 si el microorganismo a detectar es *B. cereus*,
- La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 25 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 26, y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID NO: 35 si el microorganismo a detectar es *C. perfringens*,
- 30 - La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 27 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 28, y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID NO: 36 si el microorganismo a detectar es de la familia *Enterobacteriaceae*,
- 35

- La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 29 y el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 30, y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID NO: 37 si el microorganismo a detectar es *E. coli*, y
- 5
- La pareja de cebadores formada por el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 31 y el oligonucleótido que comprende la SEQ ID NO: 32, y la sonda que comprende la secuencia SEQ ID NO: 38 si el microorganismo a detectar es *S. aureus*.
- 10
20. Conjunto de parejas de cebadores según la reivindicación 19, que comprende además un control interno de amplificación de la qRTi-PCR seleccionado del grupo que consiste en
- La sonda de ácido nucleico que comprende el oligonucleótido SEQ ID NO: 39 en el caso de que el microorganismo cuantificado sea *E. coli*, uno de la Familia *Enterobacteriaceae* o *S. aureus*,
- 15
- La sonda de ácido nucleico que comprende el oligonucleótido SEQ ID NO: 41 en caso de que el microorganismo cuantificado sea *C. perfringens* o *E.coli*, y
 - La sonda de ácido nucleico que comprende el oligonucleótido SEQ ID NO: 40 en caso de que el microorganismo cuantificado sea *B. cereus*, *C. perfringens*, *E. coli*, uno de la Familia *Enterobacteriaceae*, o *S. aureus*.
- 20
21. Conjunto de parejas de cebadores según la reivindicación 19 ó 20, en el que las sondas están marcadas en uno de sus extremos.
- 25
22. Conjunto de parejas de cebadores según la reivindicación 21, en el que el marcaje es con un fluoróforo.
- 30
23. Uso *in vitro* de un conjunto de parejas de cebadores según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22, para la detección simultánea de *C. jejuni*, *C. sakazakii*, una cepa enterohemorrágica de *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella spp.* y *Shigella spp.*

24. Uso según la reivindicación 23, en el que la cepa hemorrágica de *E. coli* es *E. coli* O157:H7, la especie de *Salmonella spp.* es *Salmonella enterica* y/o la especie de *Shigella spp.* es *Shigella dysenteriae*.
- 5 25. Uso según la reivindicación 23 o 24, que comprende además la detección simultánea de al menos 1, preferiblemente 2, 3, 4 o 5 de los microorganismos seleccionados de la lista que consiste en *B. cereus*, *C. perfringens*, un microorganismo de la familia *Enterobacteriaceae*, *E. coli* y *S. aureus*.
- 10 26. Un kit que comprende un conjunto de parejas de cebadores según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22.
27. Uso de un kit según la reivindicación 26, para la detección simultánea de *C. jejuni*, *C. sakazakii*, una cepa enterohemorrágica de *E. coli*, *L. monocytogenes*,
15 *Salmonella spp.* y *Shigella spp.*.
28. Uso según la reivindicación 27, en el que la cepa hemorrágica de *E. coli* es *E. coli* O157:H7, la especie de *Salmonella spp.* es *Salmonella enterica* y/o la especie de *Shigella spp.* es *Shigella dysenteriae*
20
29. Uso según la reivindicación 28, que comprende además la detección simultánea de al menos 1, preferiblemente 2, 3, 4 o 5 de los microorganismos seleccionados de la lista que consiste en *B. cereus*, *C. perfringens*, un microorganismo de la familia *Enterobacteriaceae*, *E. coli* y *S. aureus*.
25

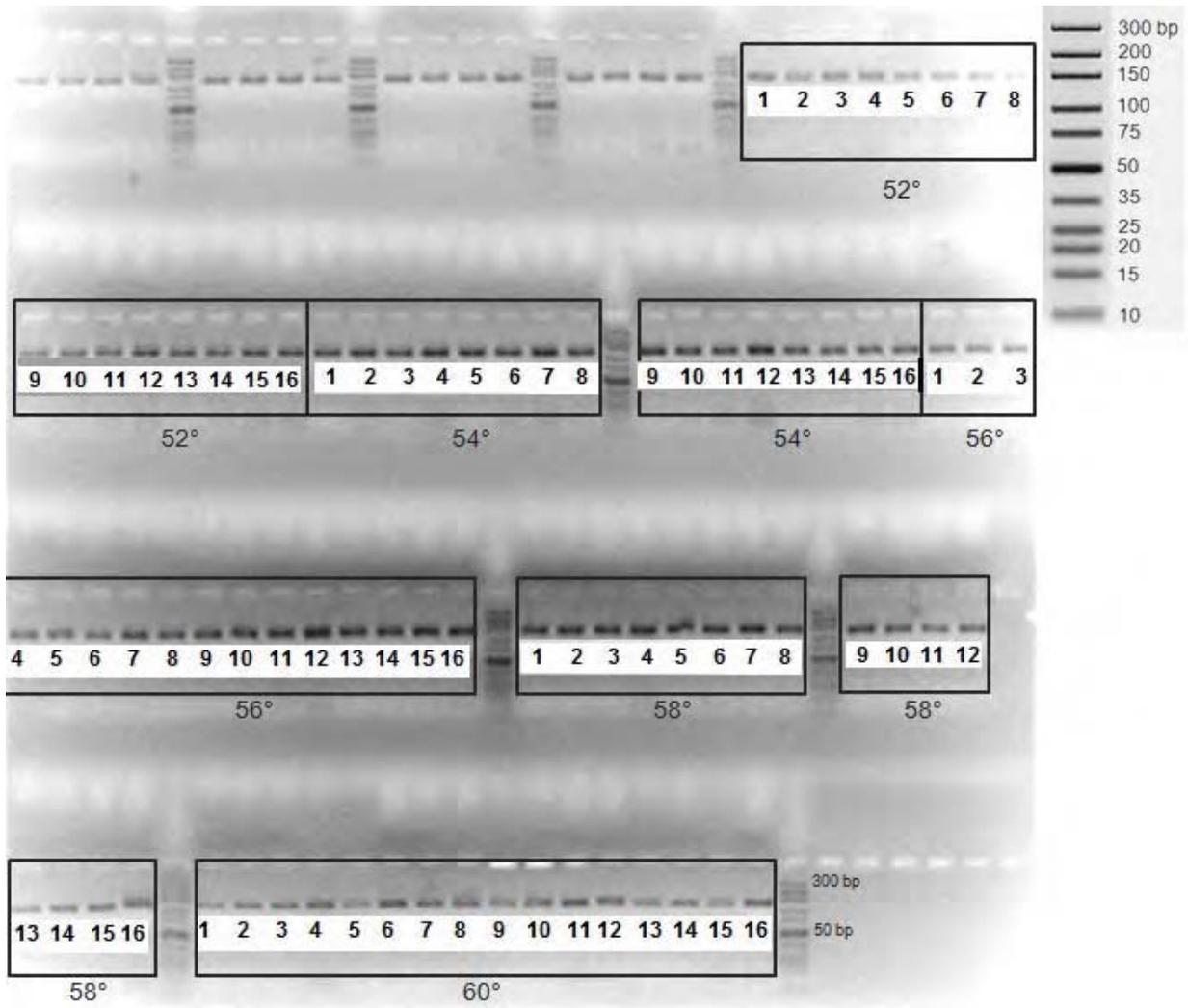


FIG. 1

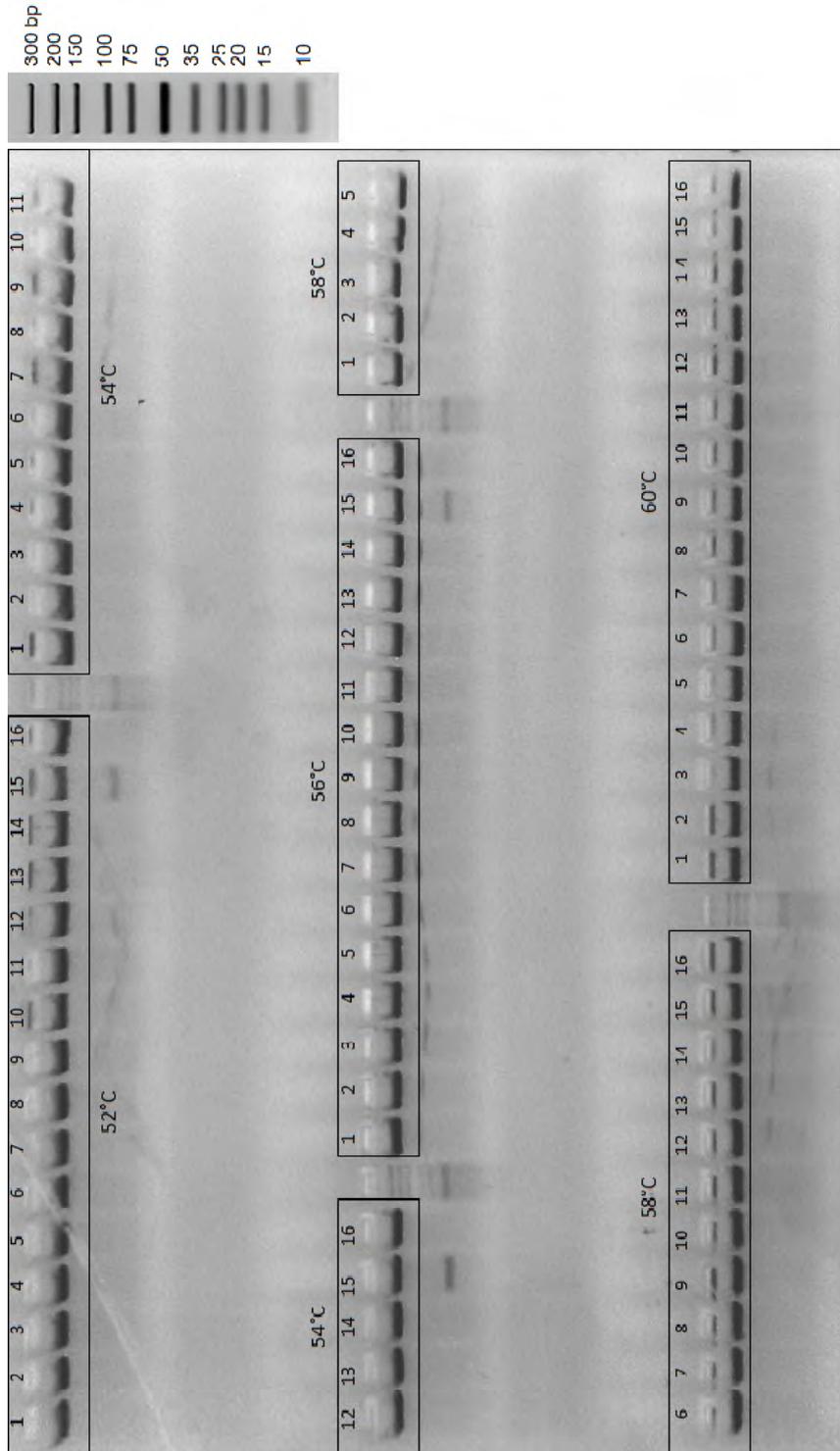


FIG. 2

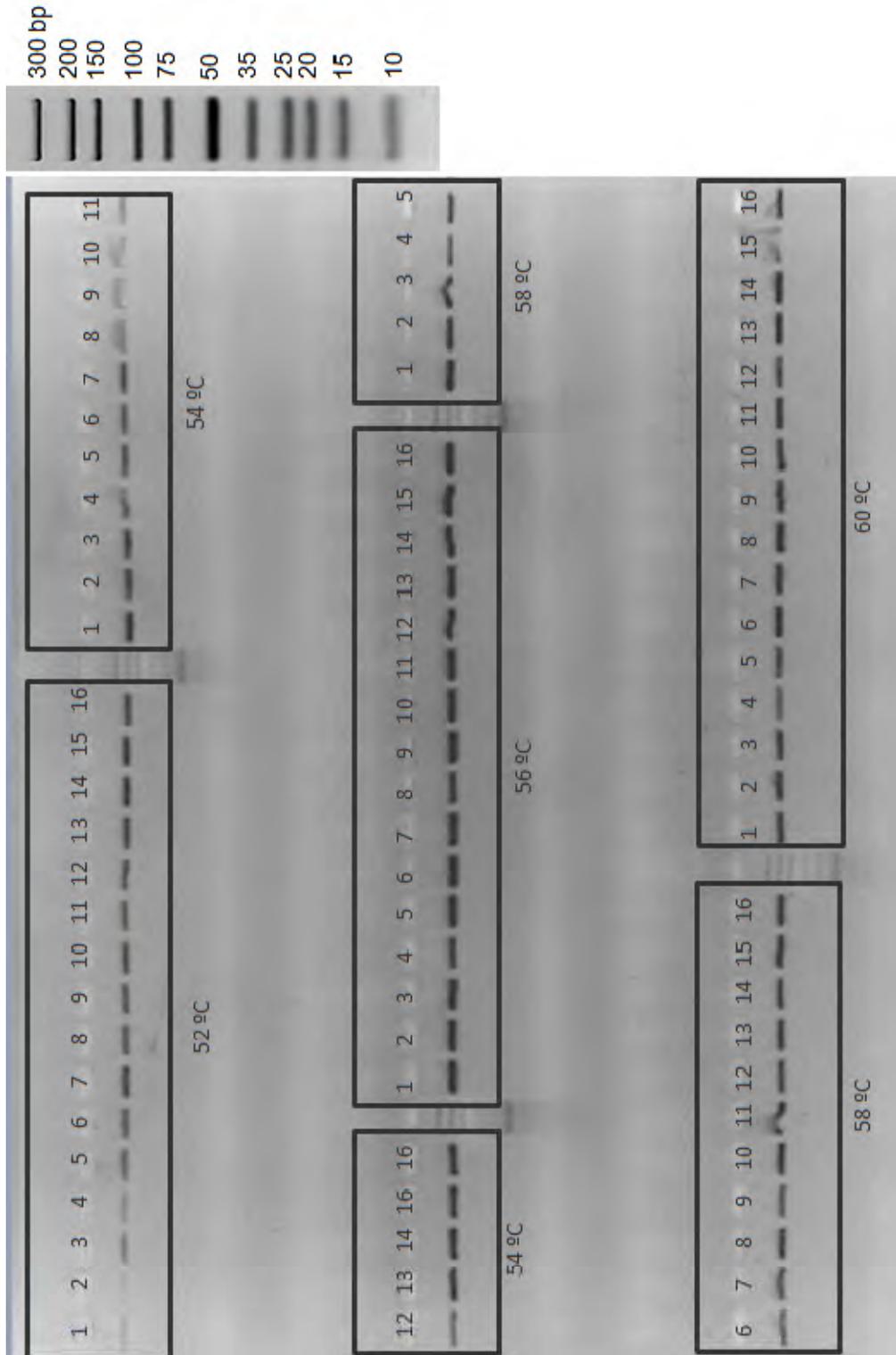


FIG. 3

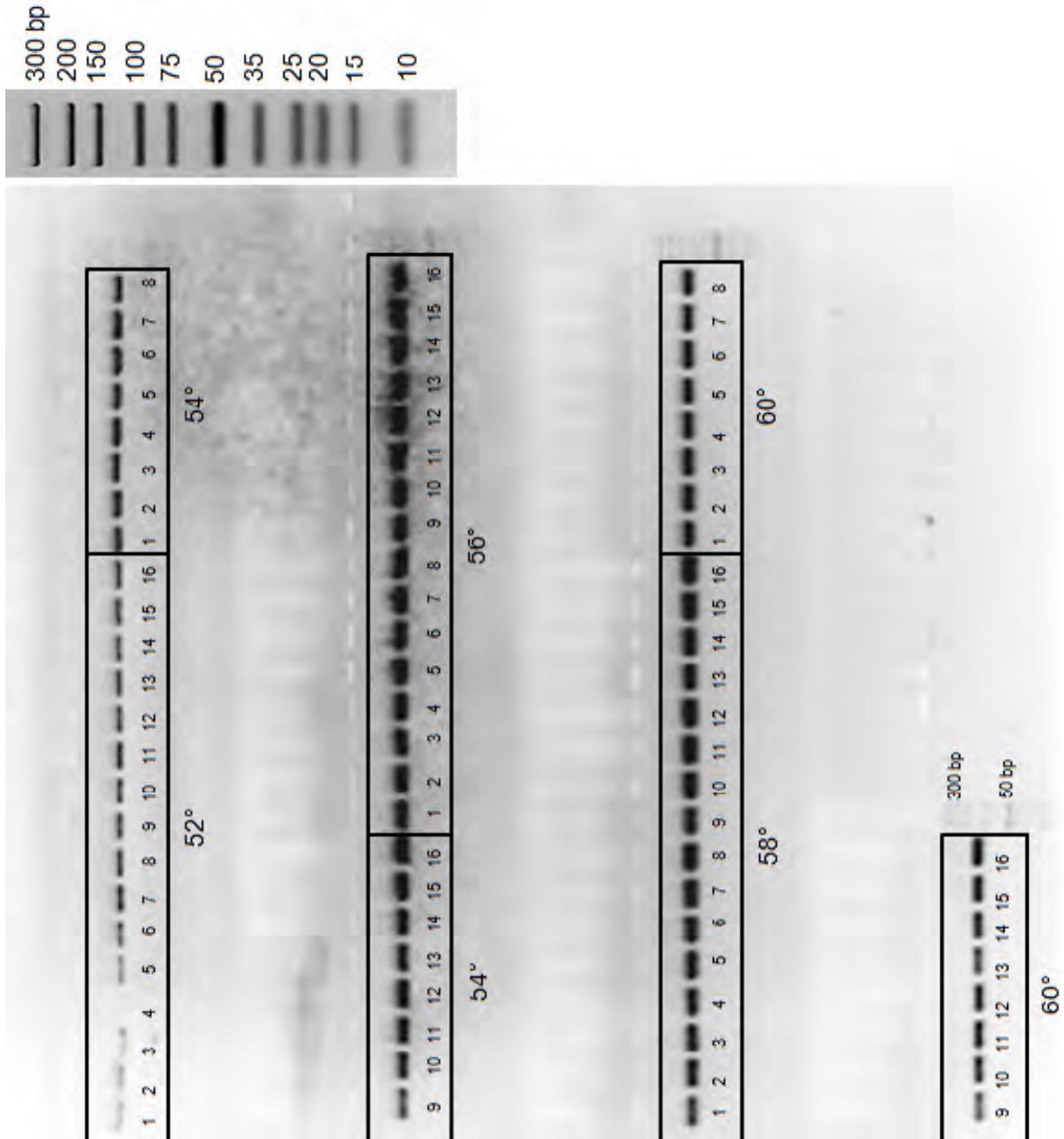


FIG. 4

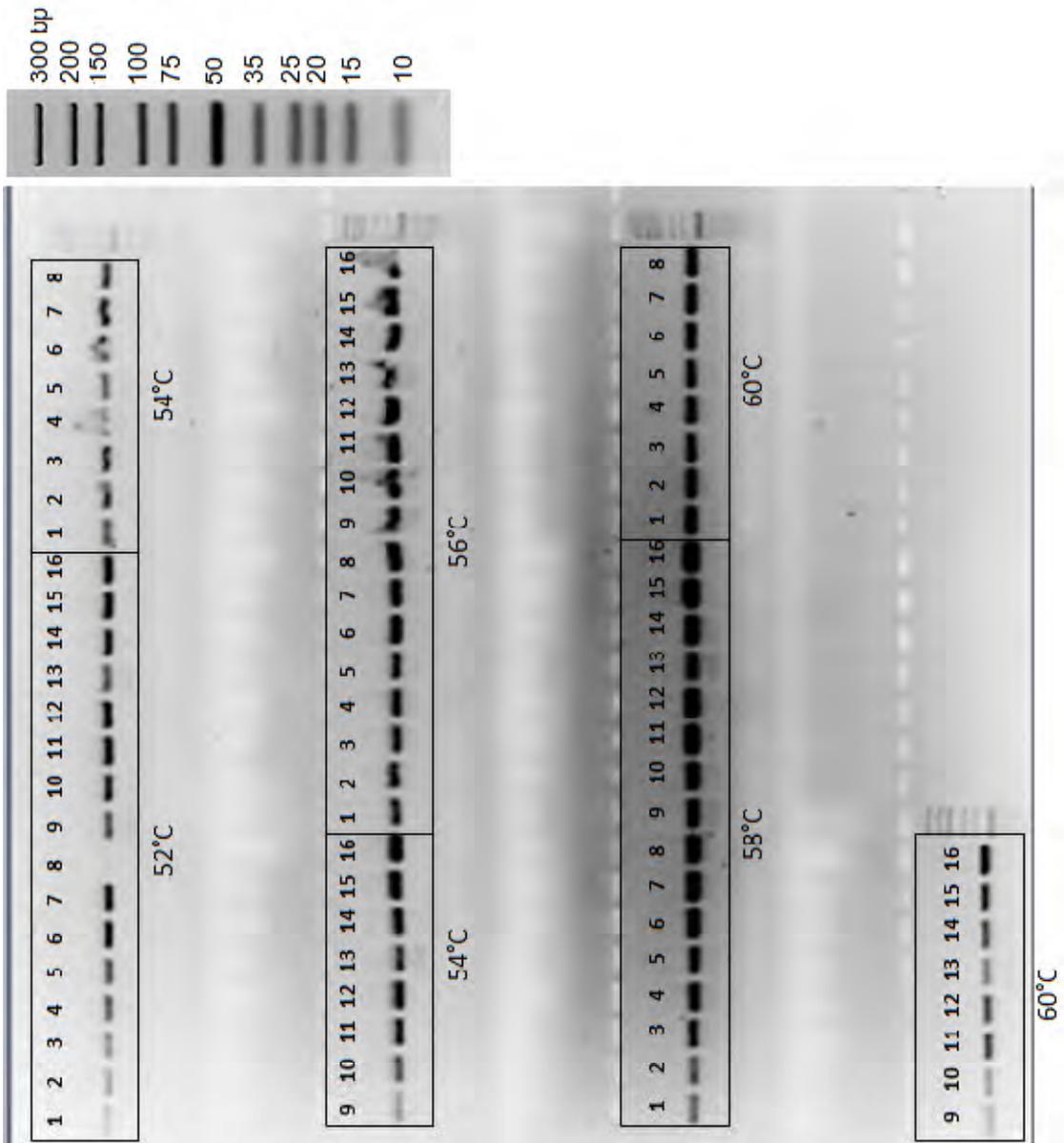


FIG. 5

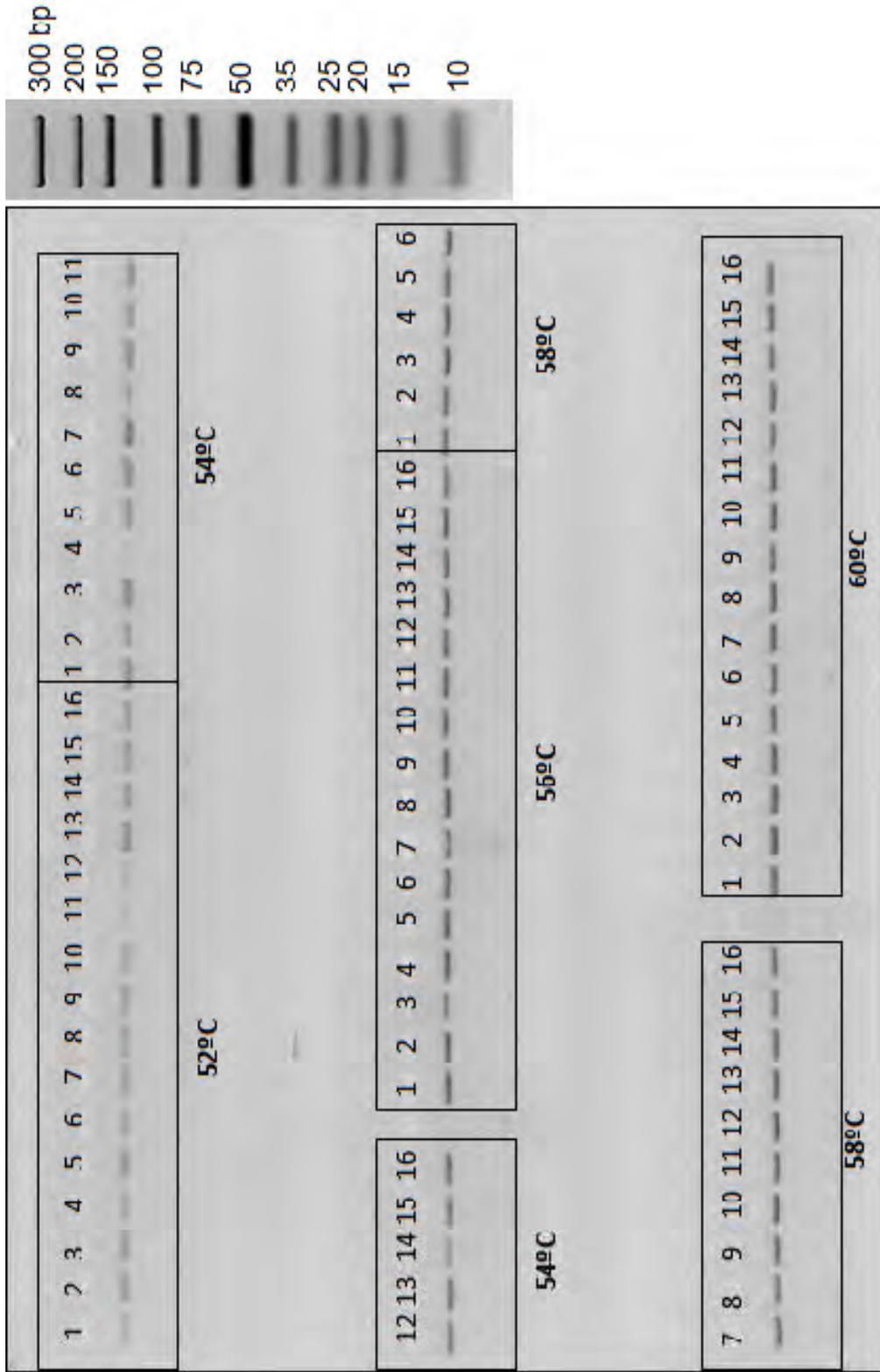


FIG. 6

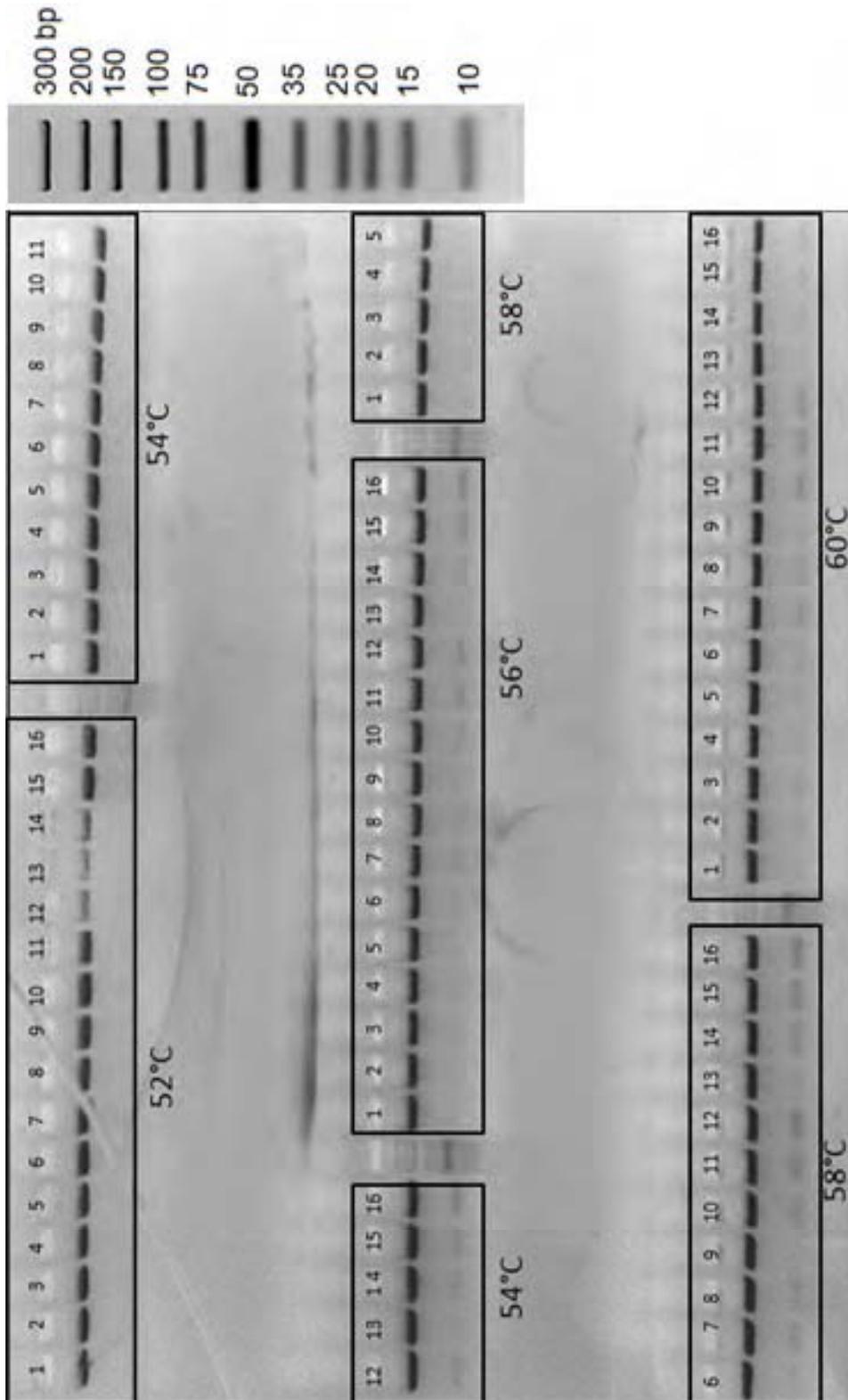


FIG. 7

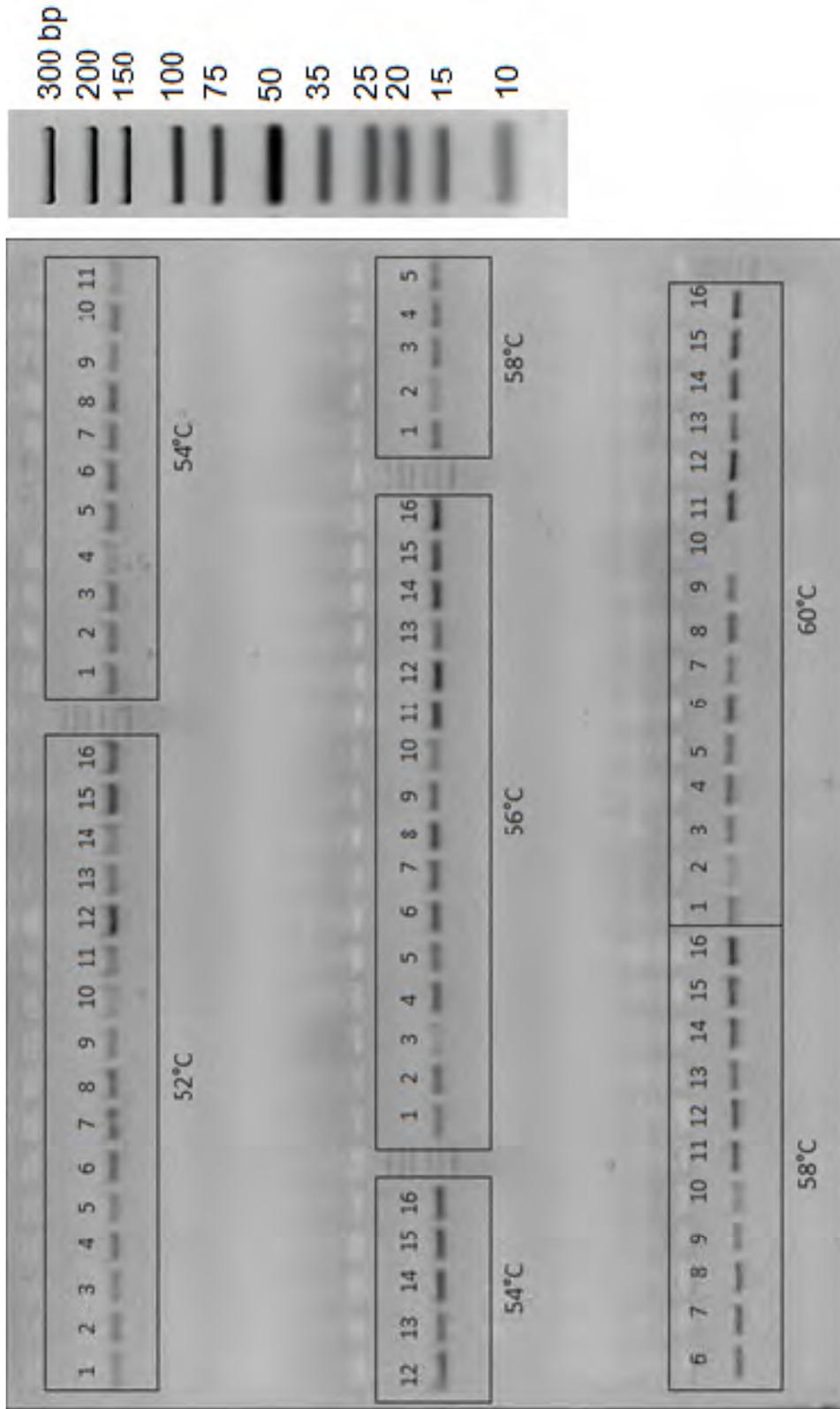


FIG. 8

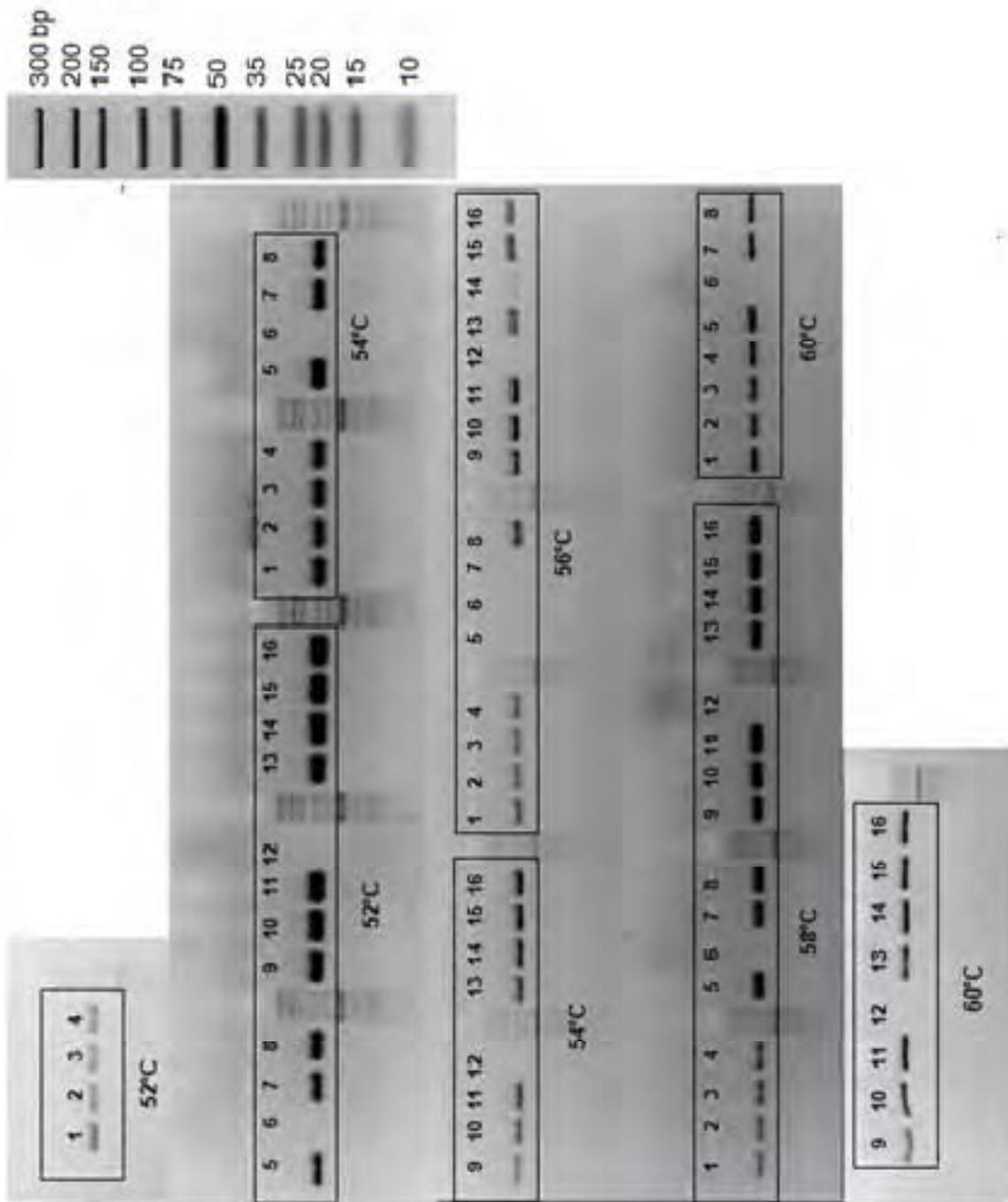


FIG. 9

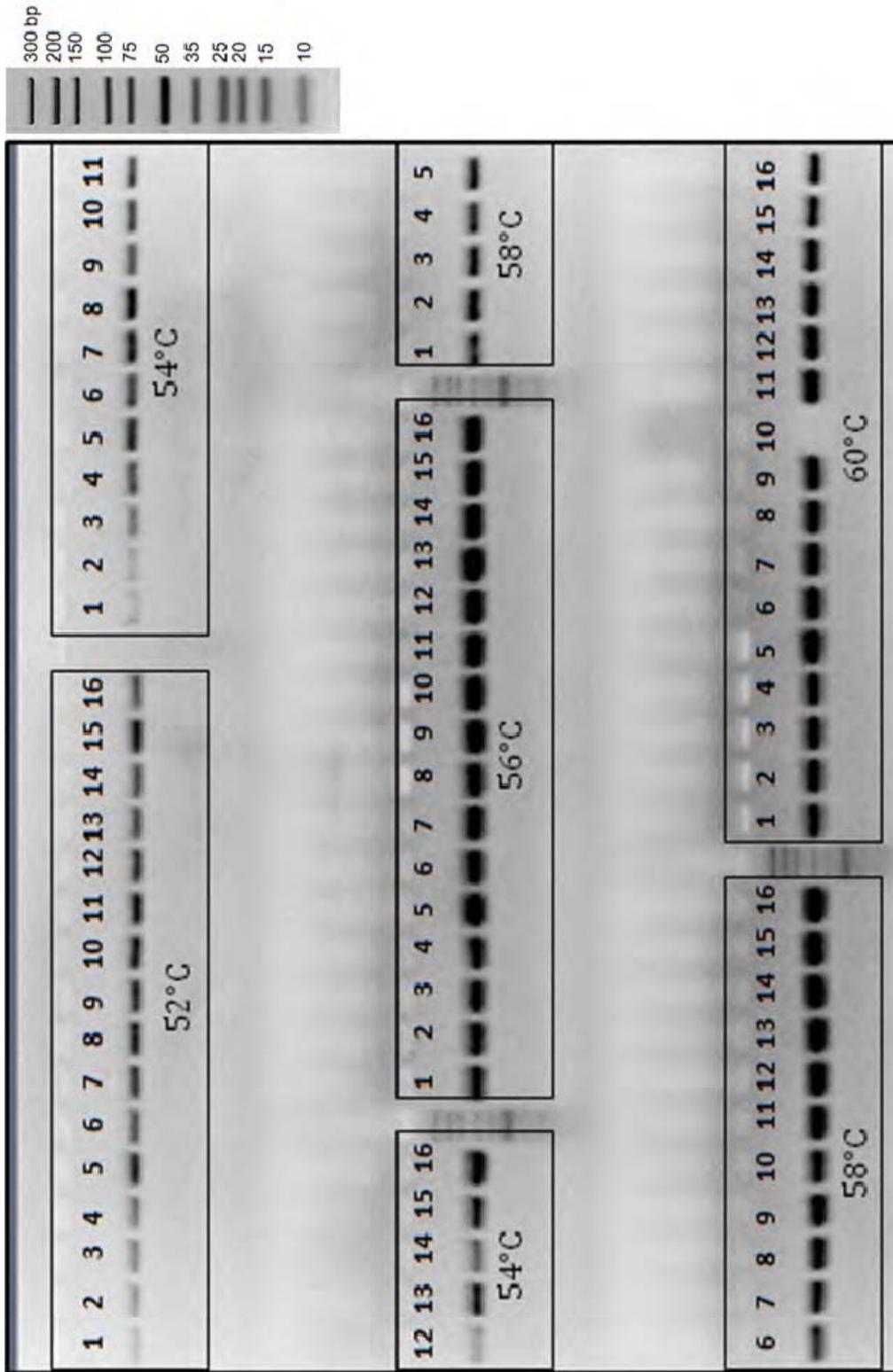


FIG. 10

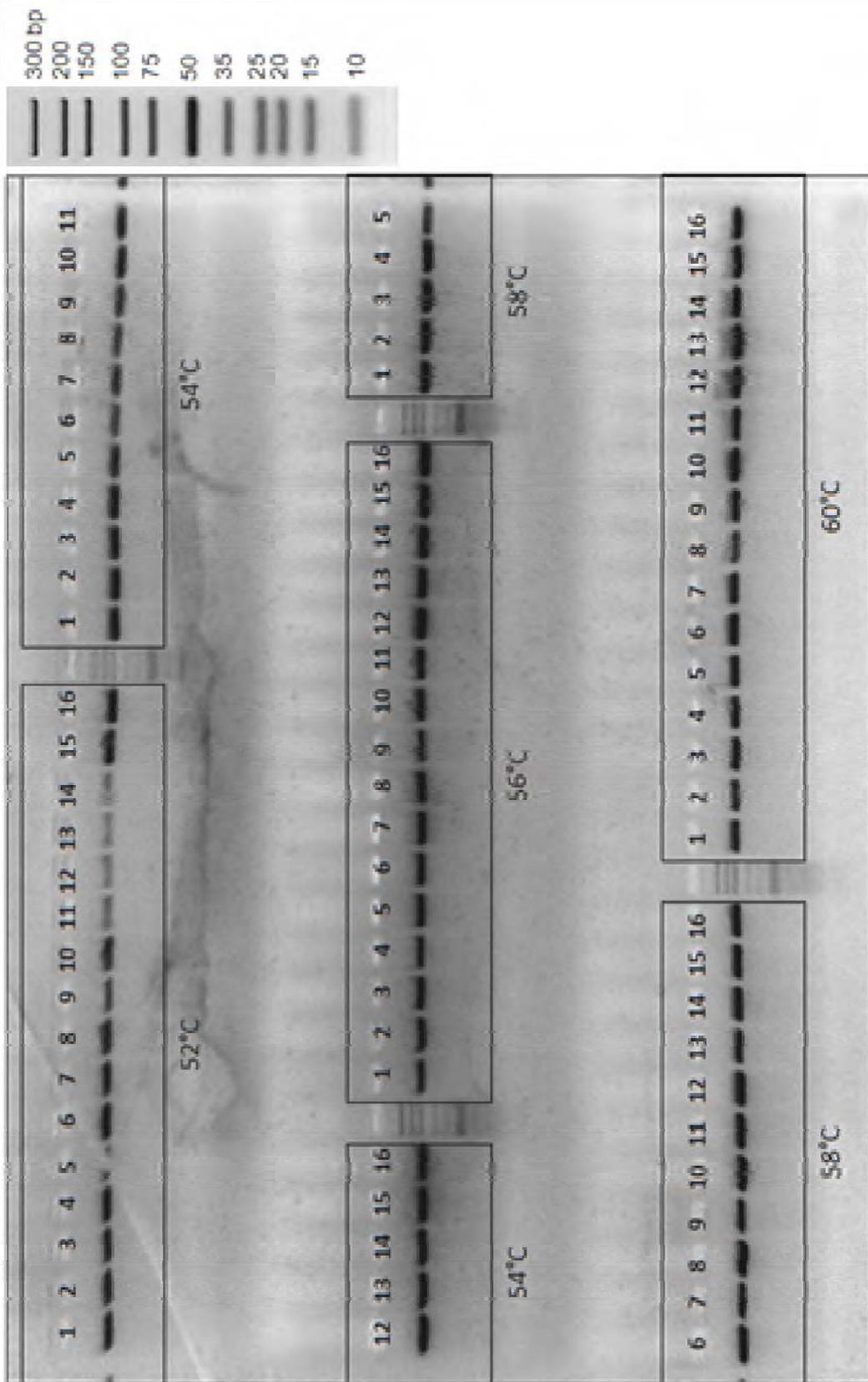


FIG. 11

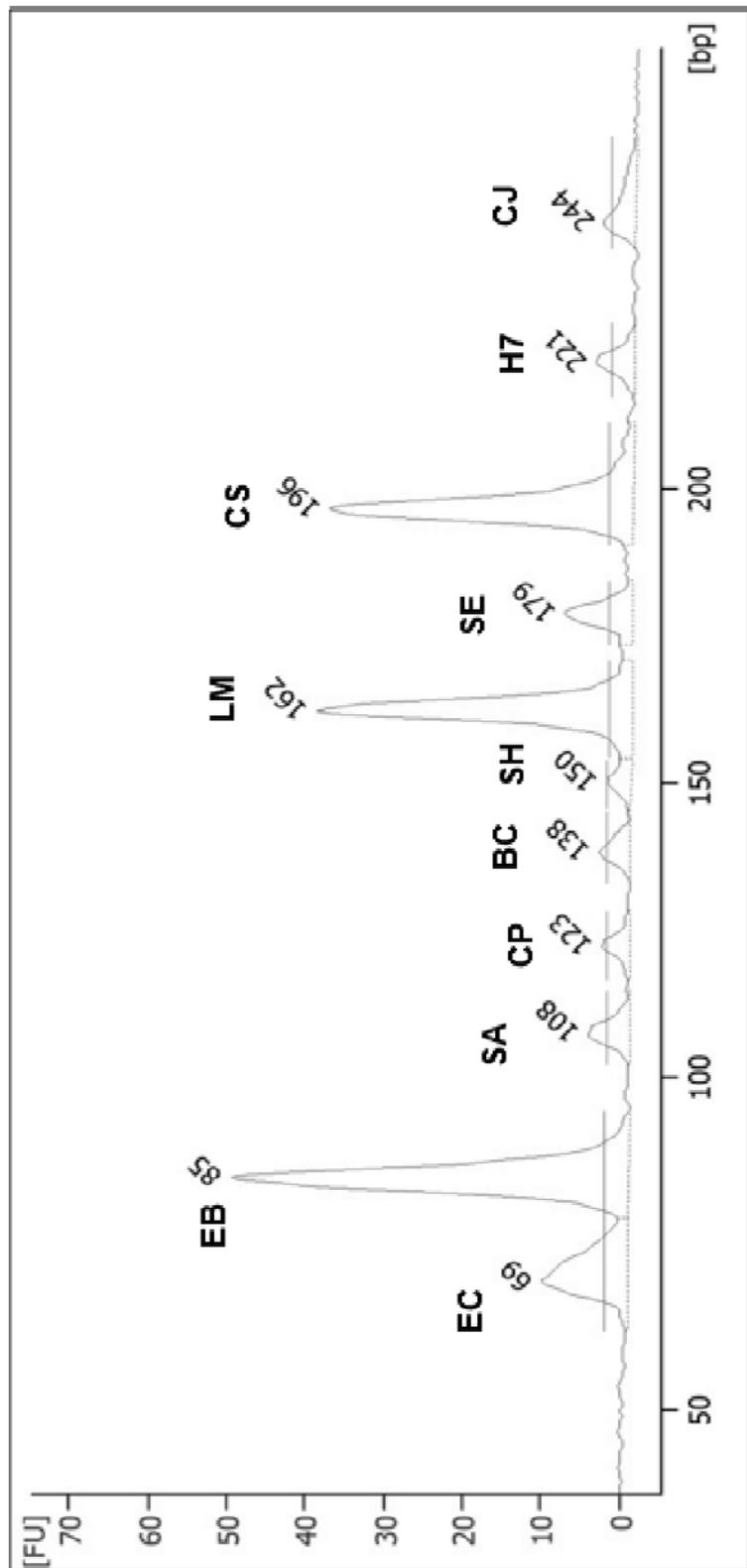


FIG. 12

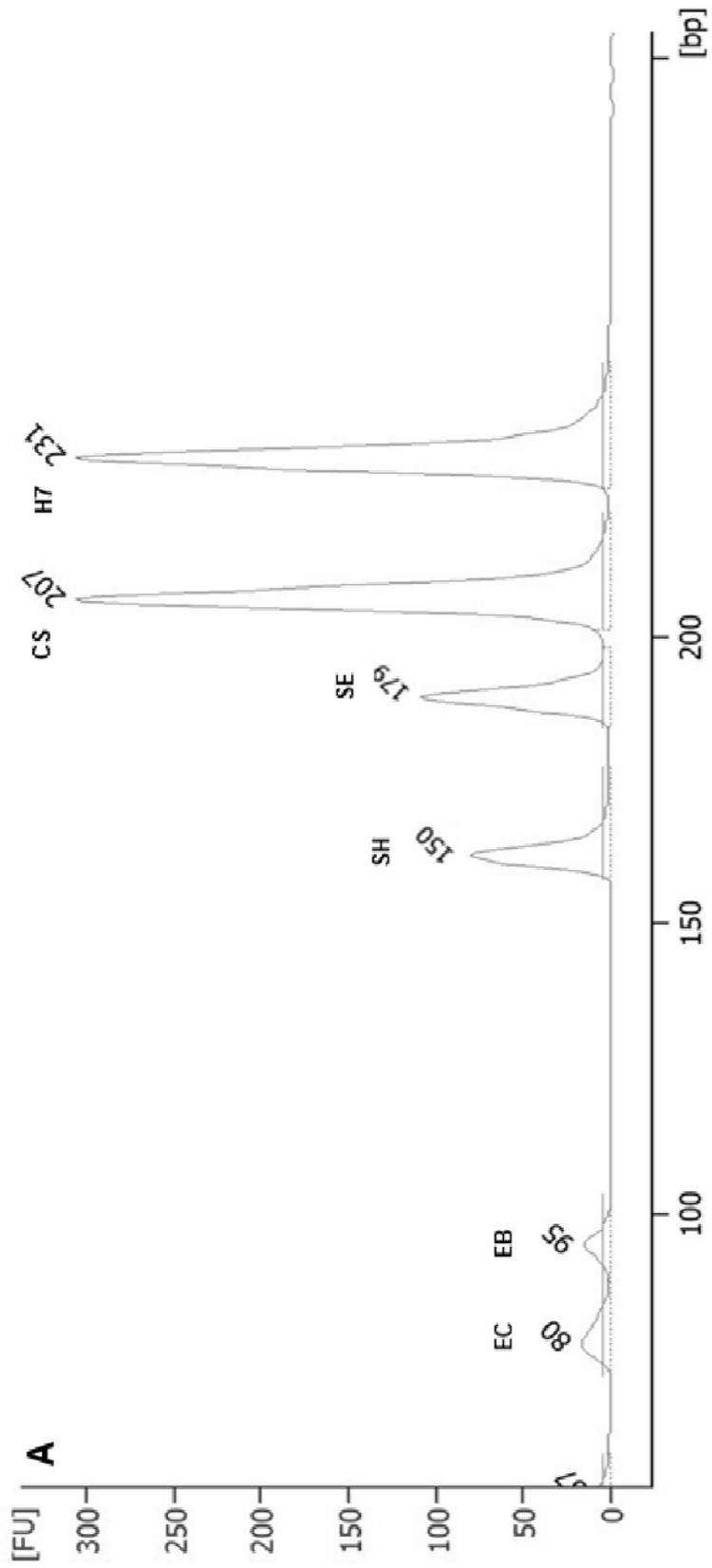


FIG.13A

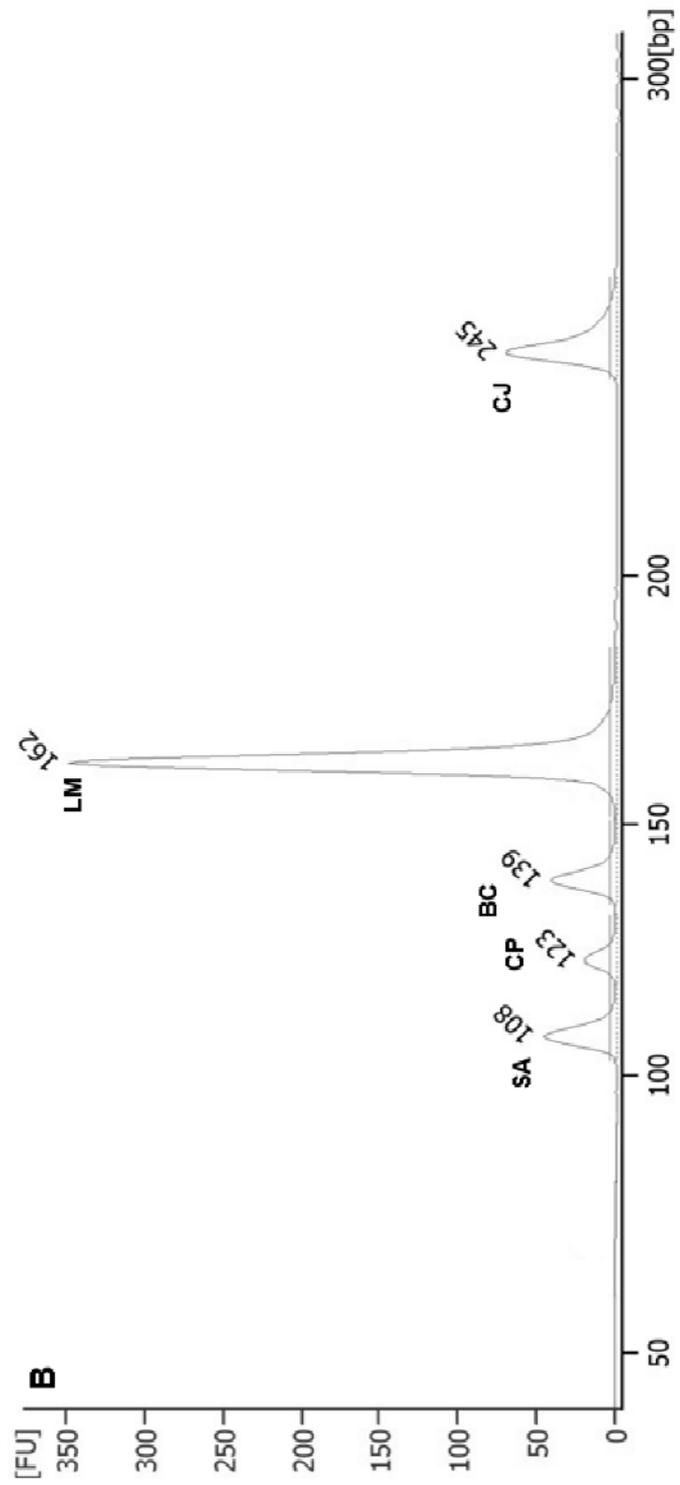


FIG. 13B

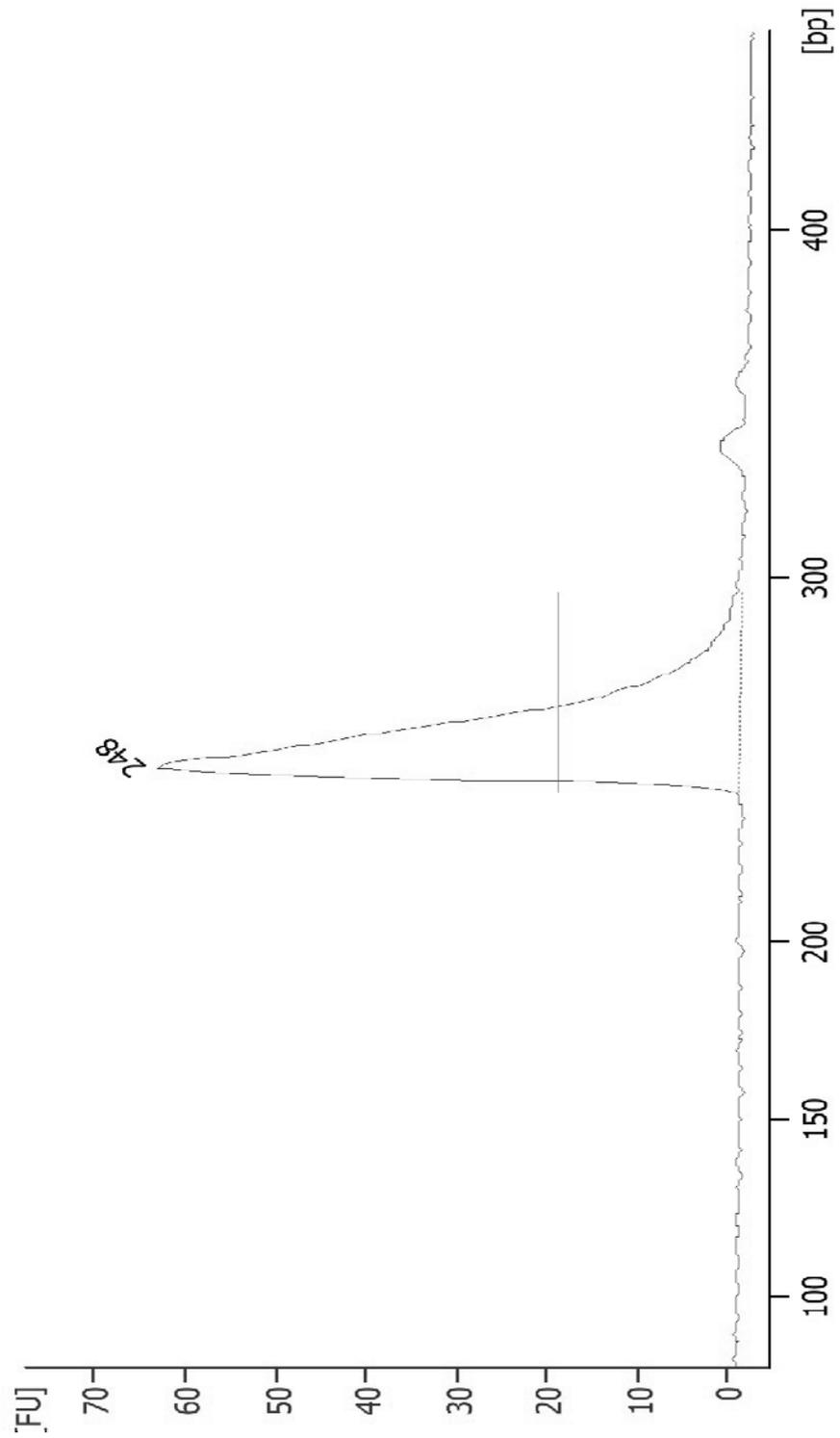


FIG. 14A

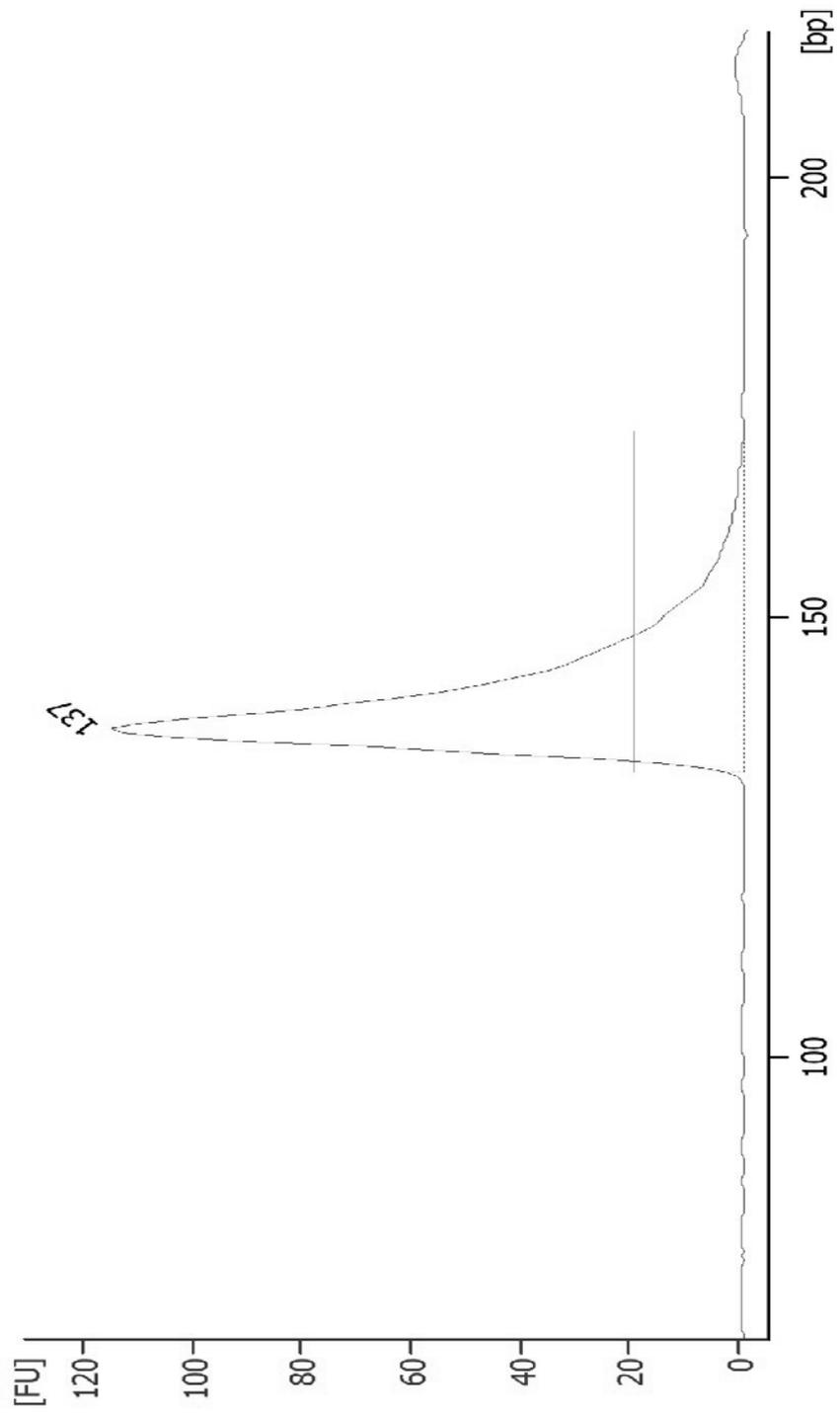


FIG. 14B

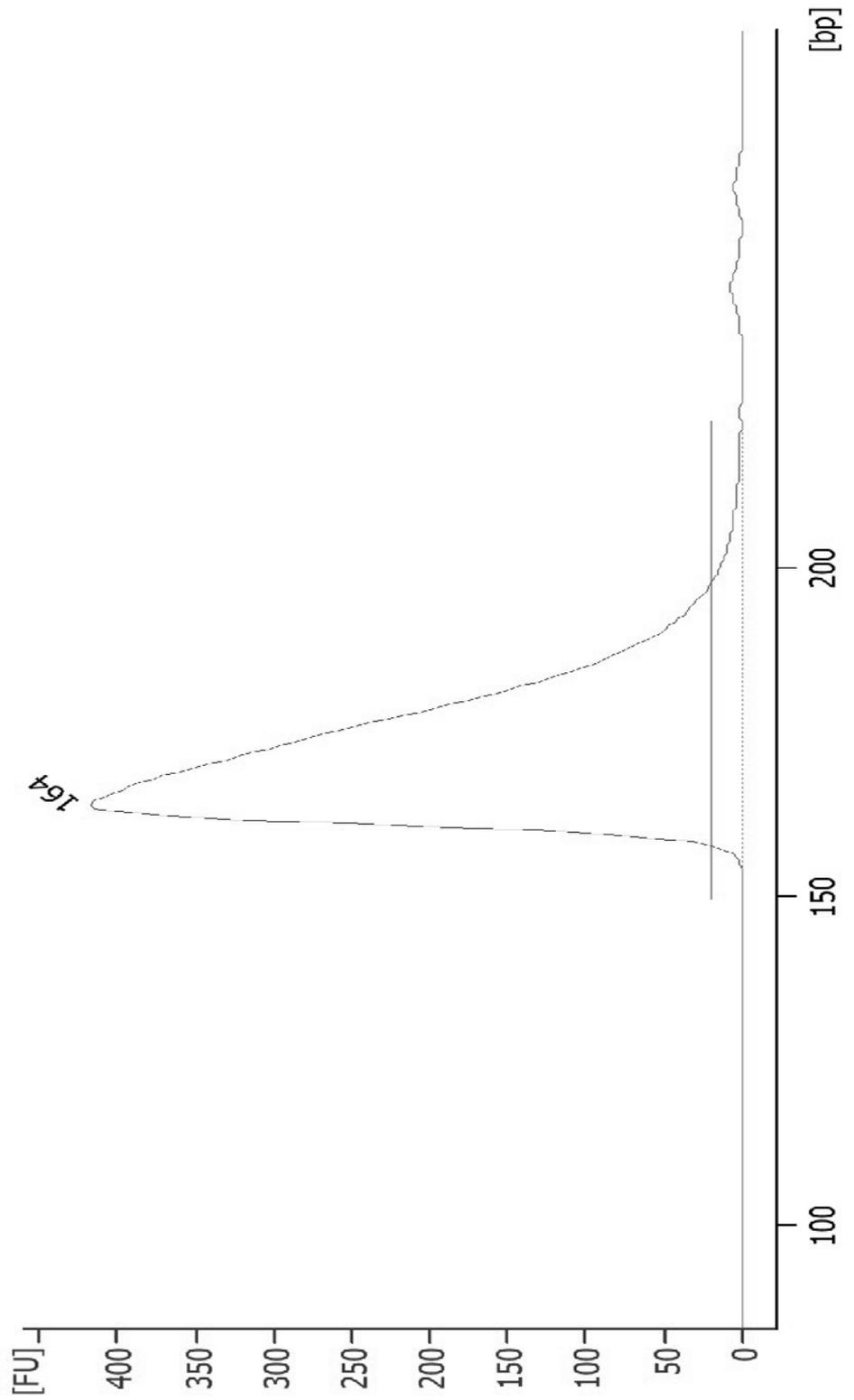


FIG. 14C

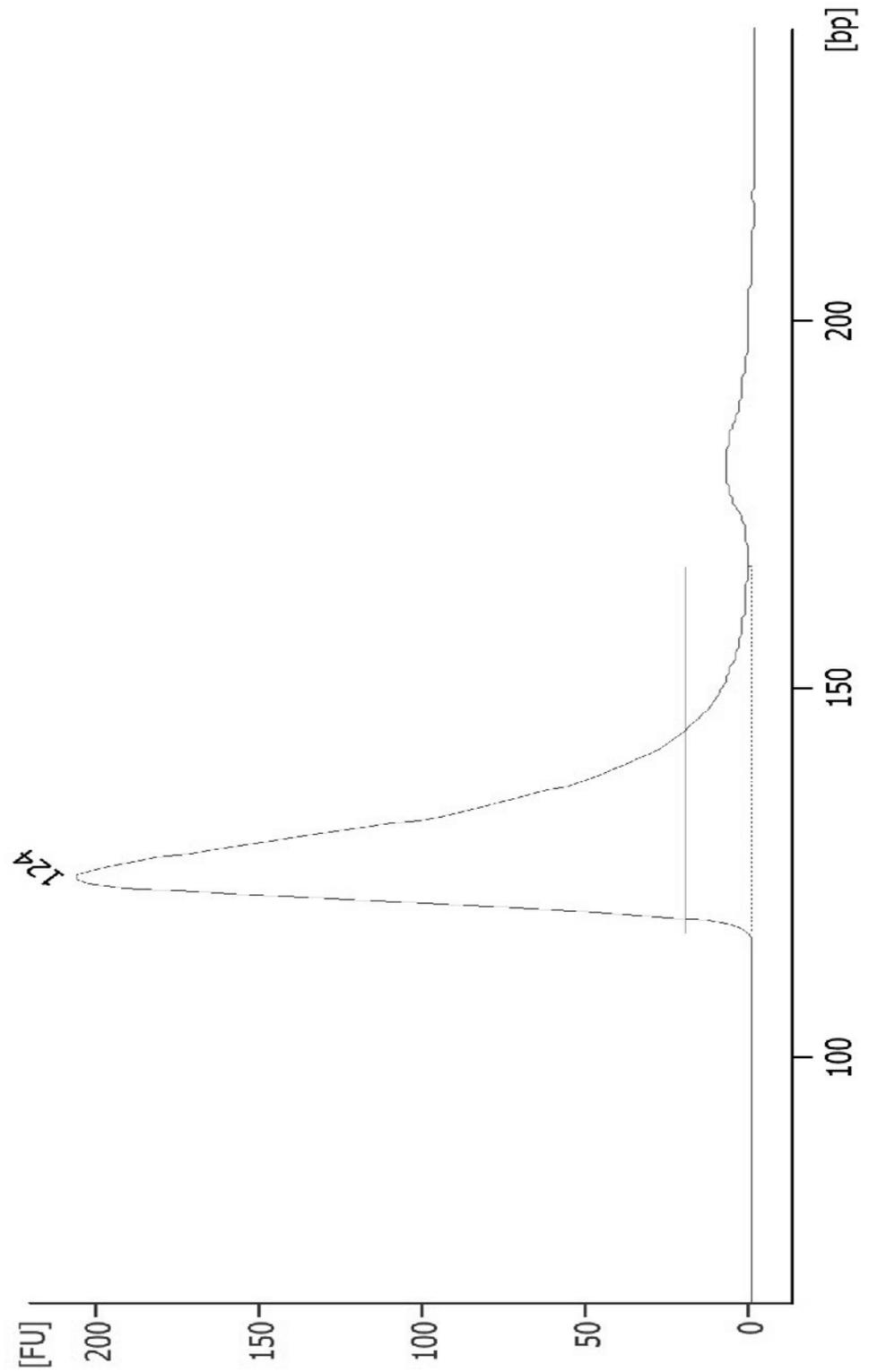


FIG. 14D

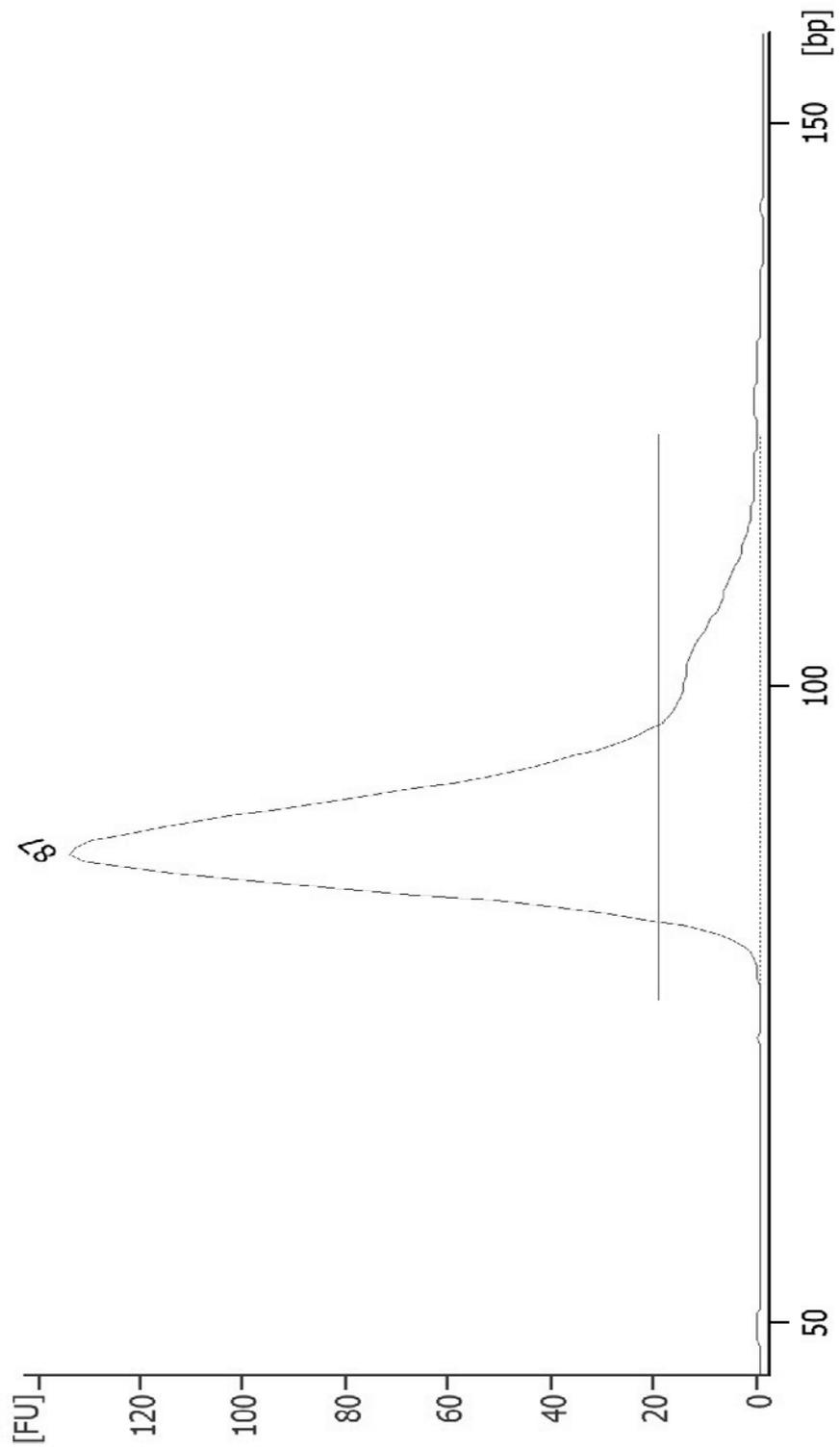


FIG. 14E

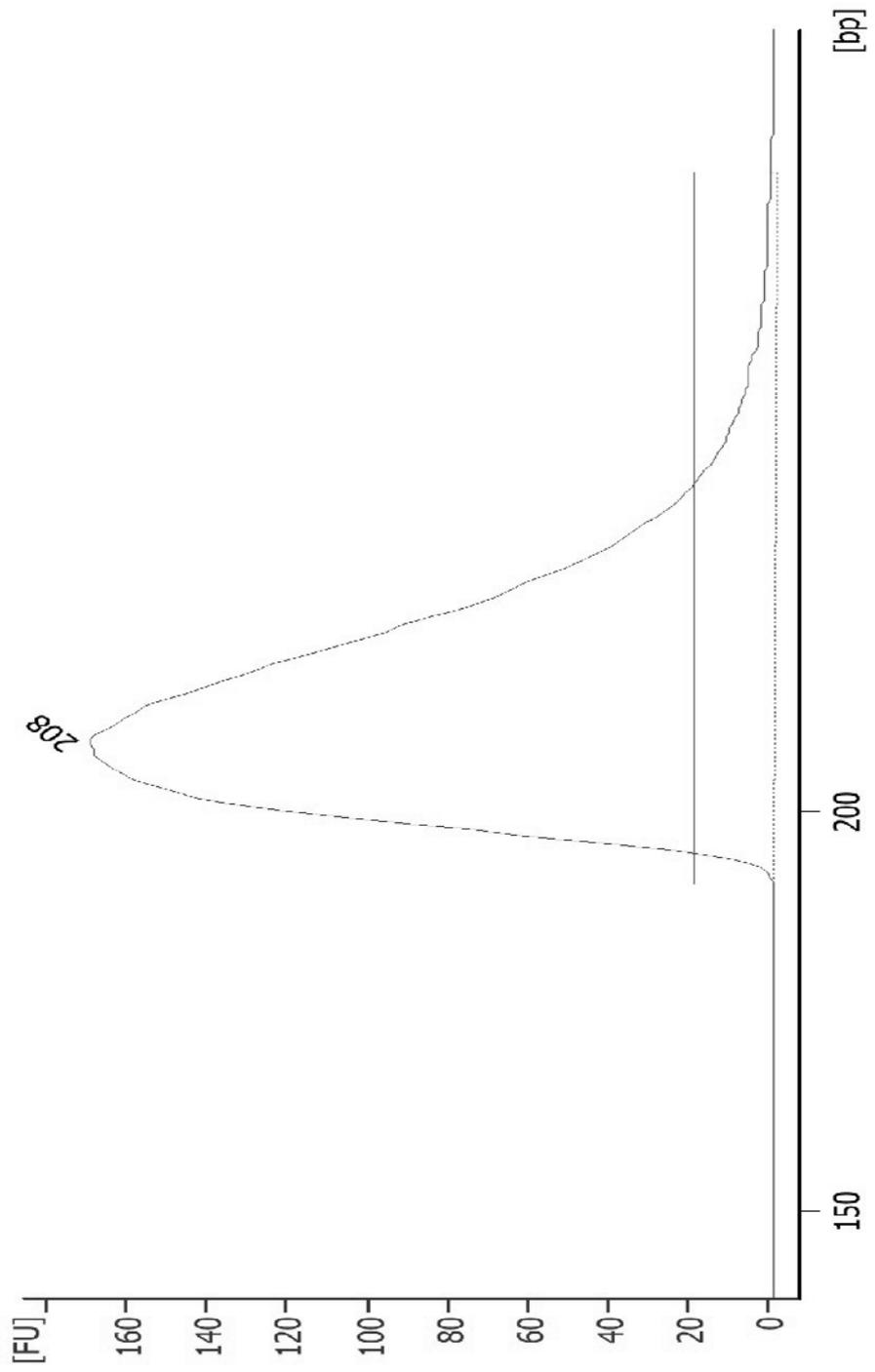


FIG. 14F

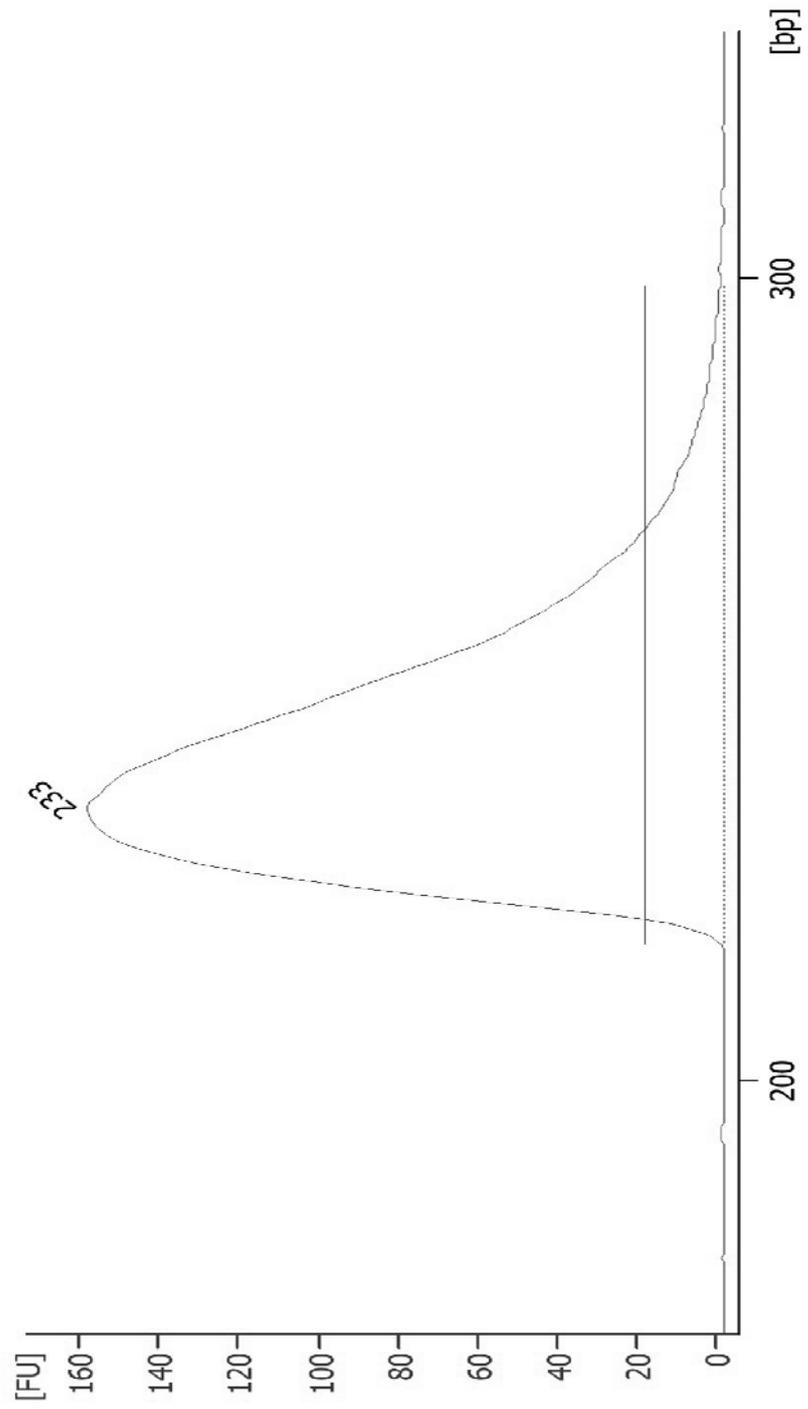


FIG. 14G

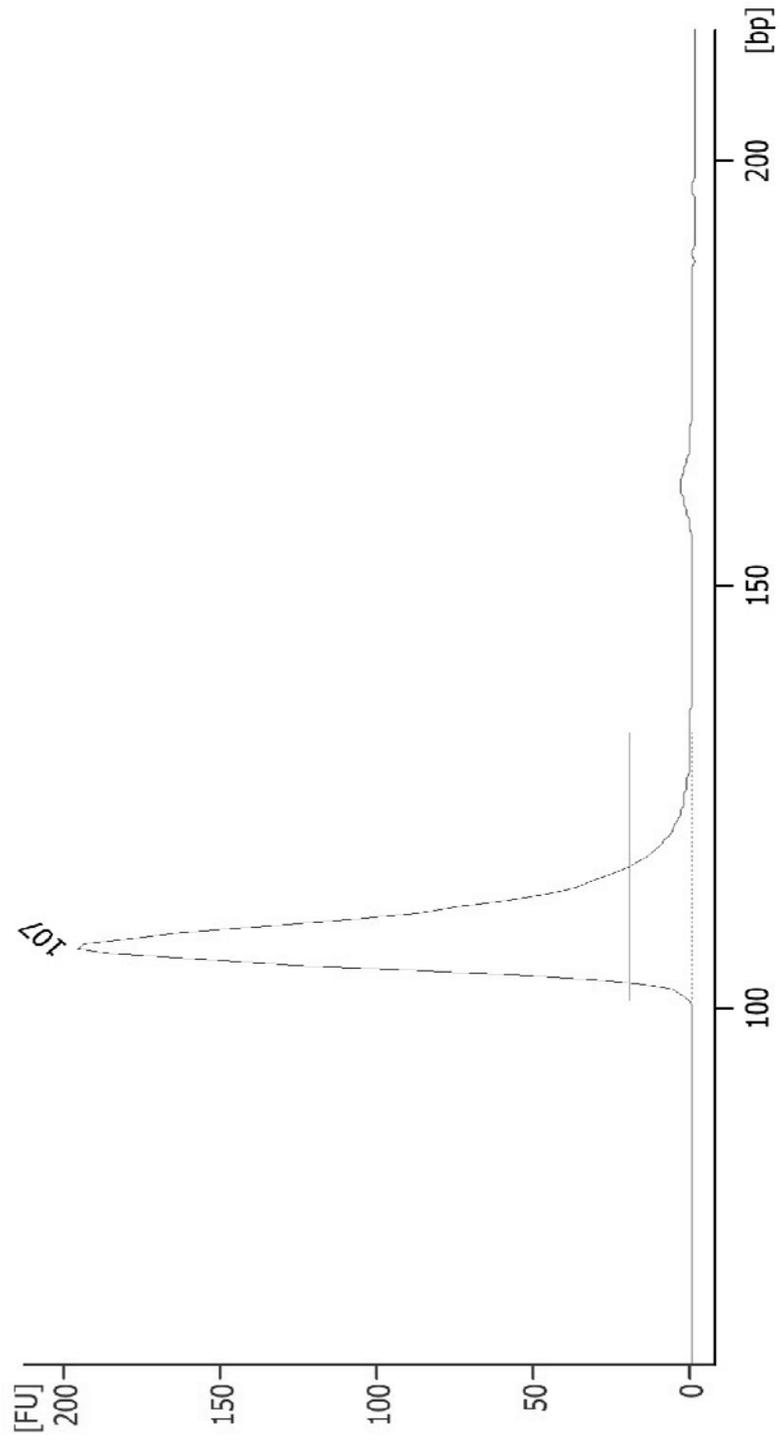


FIG. 14H

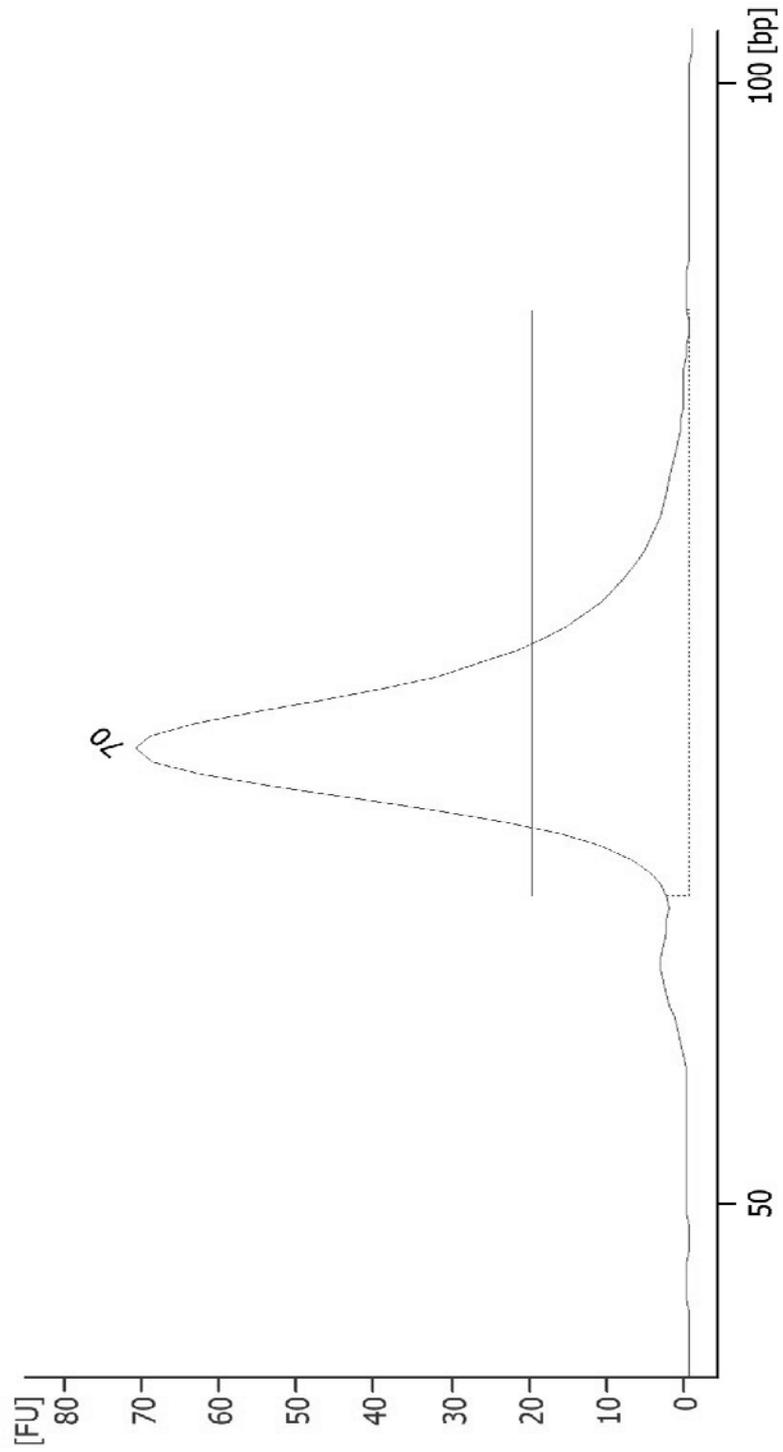


FIG. 14I

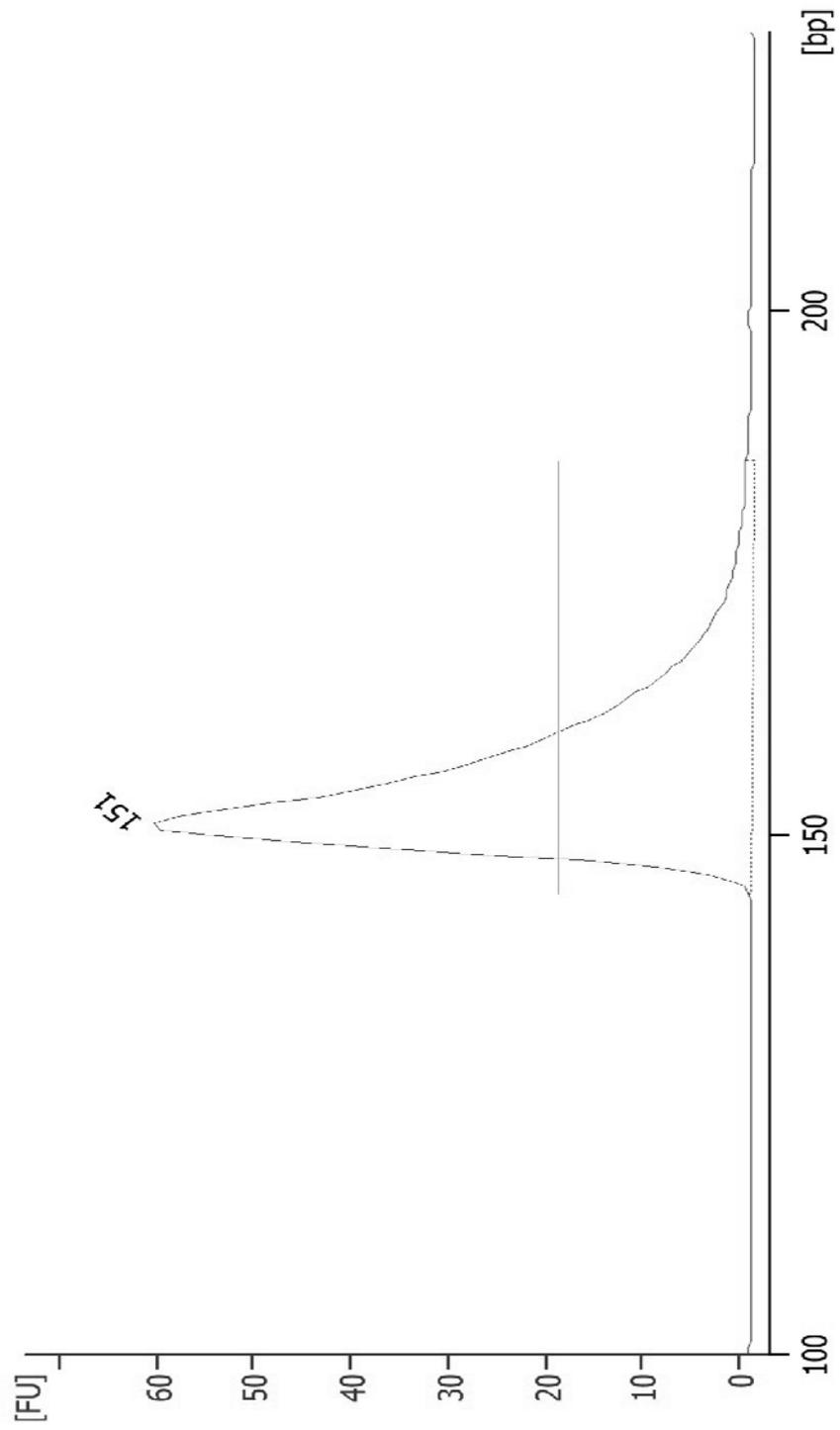


FIG. 14J

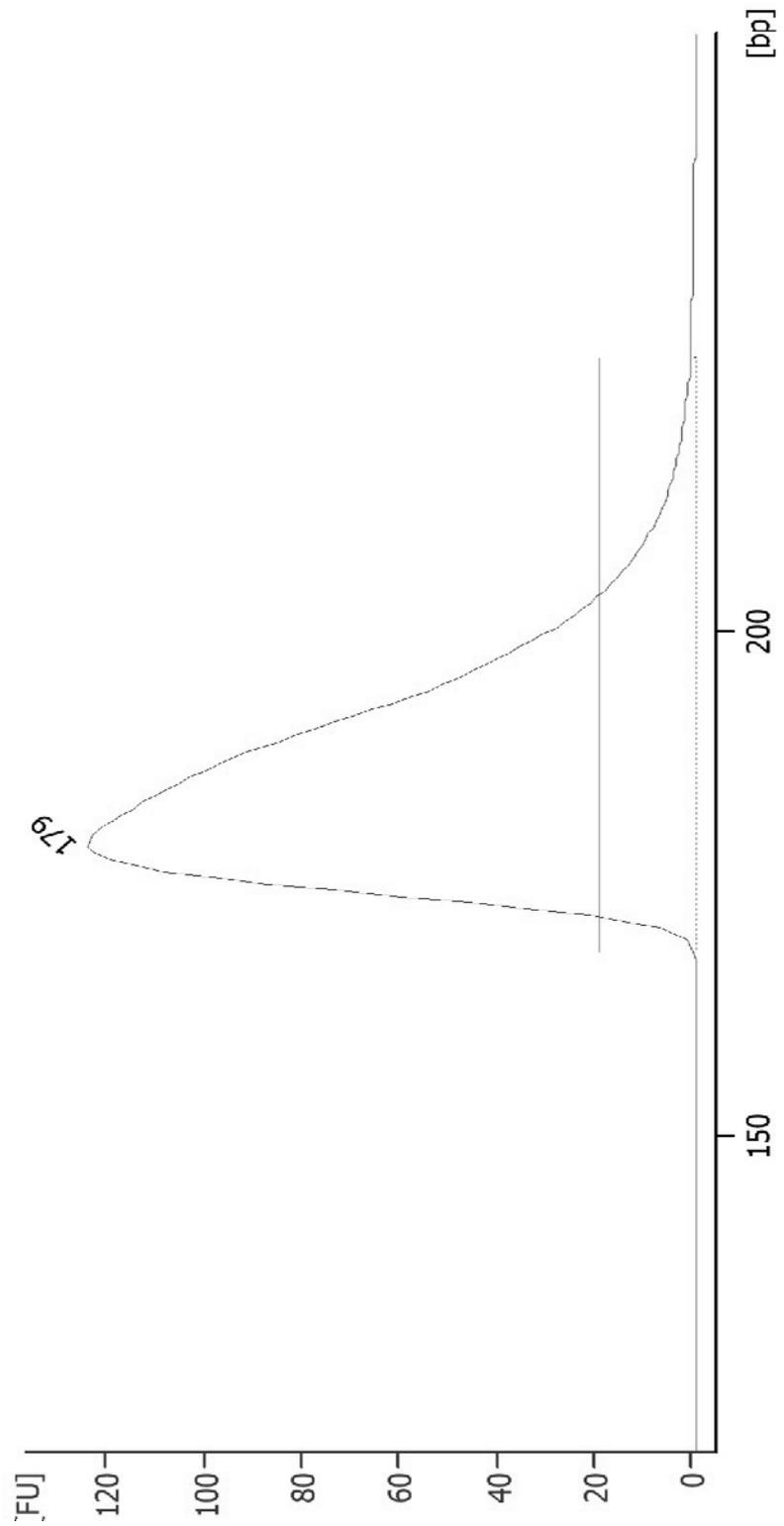


FIG. 14K

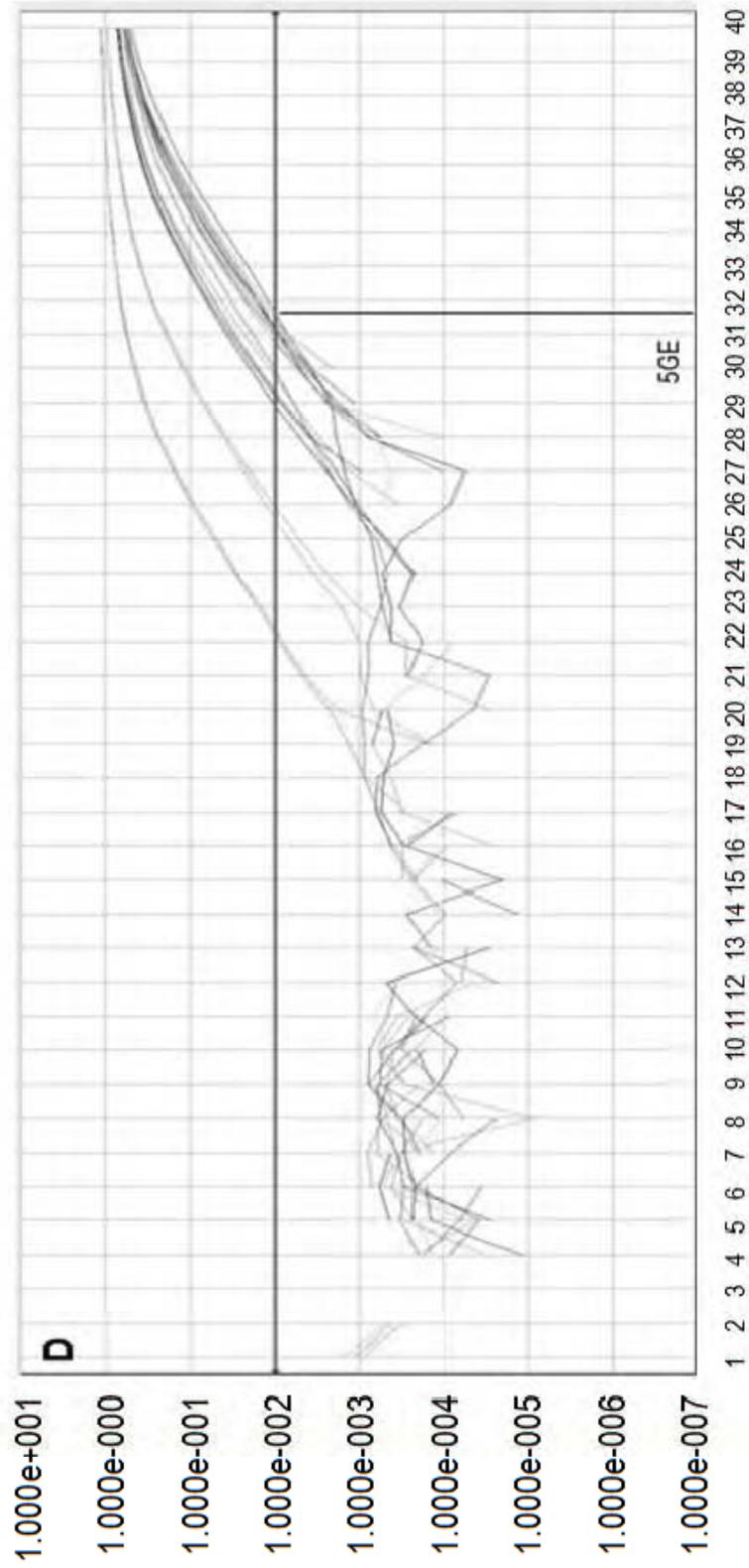


FIG. 15A

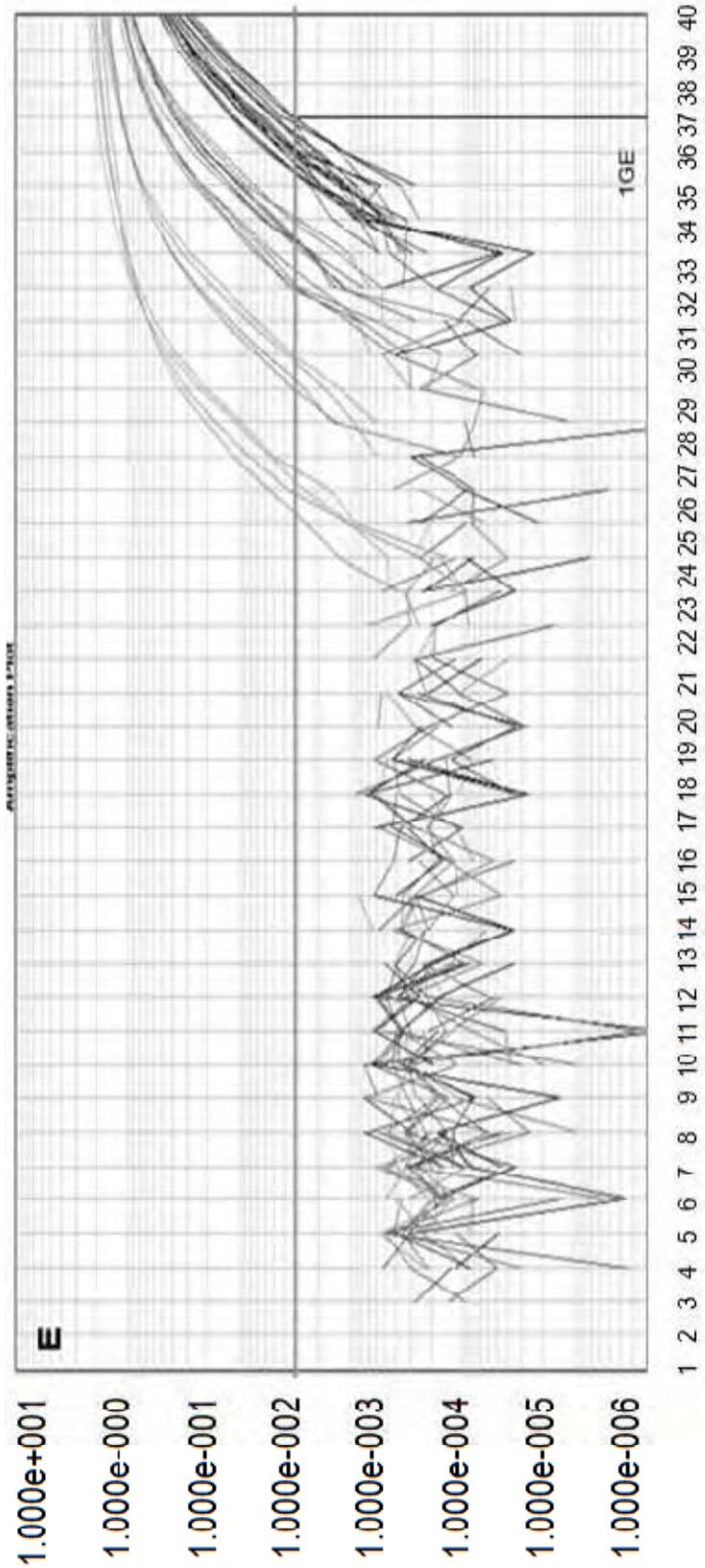


FIG. 15B

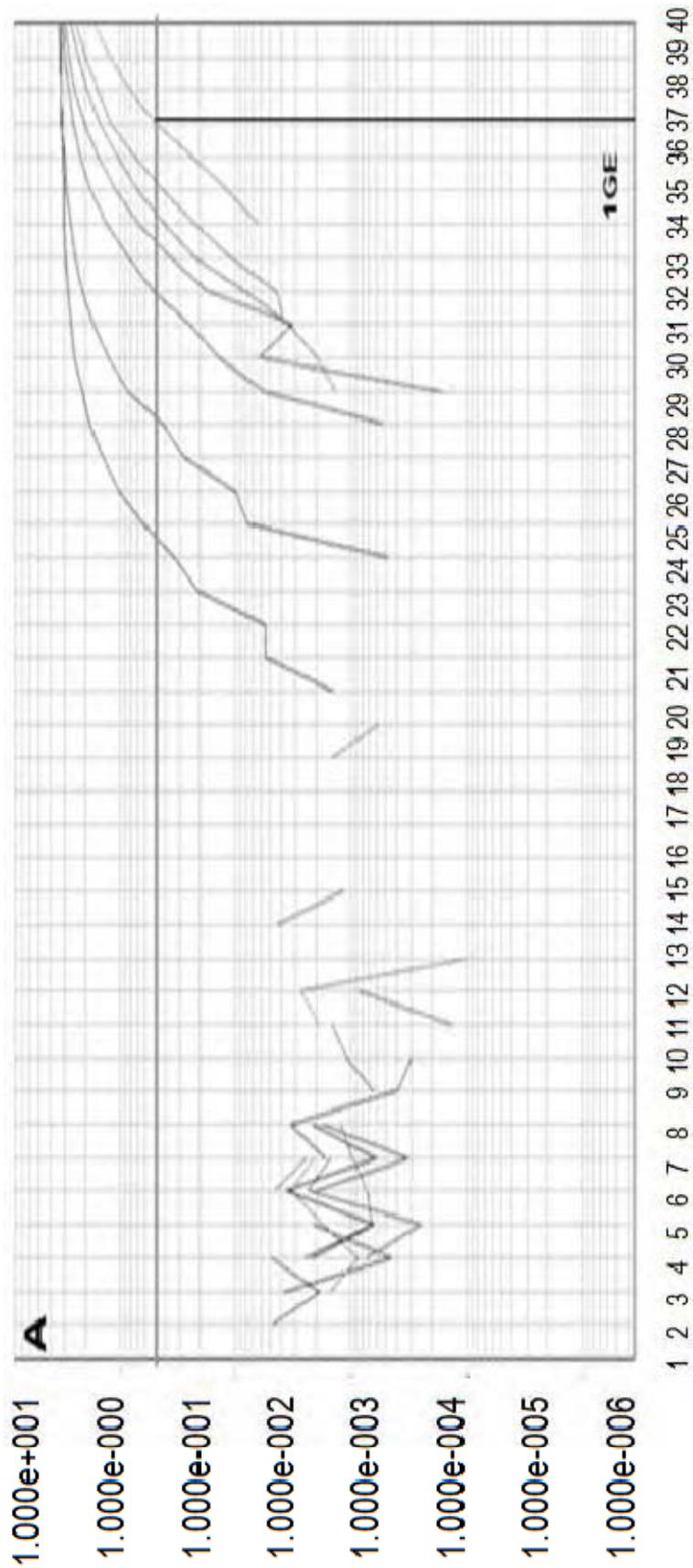


FIG. 16A

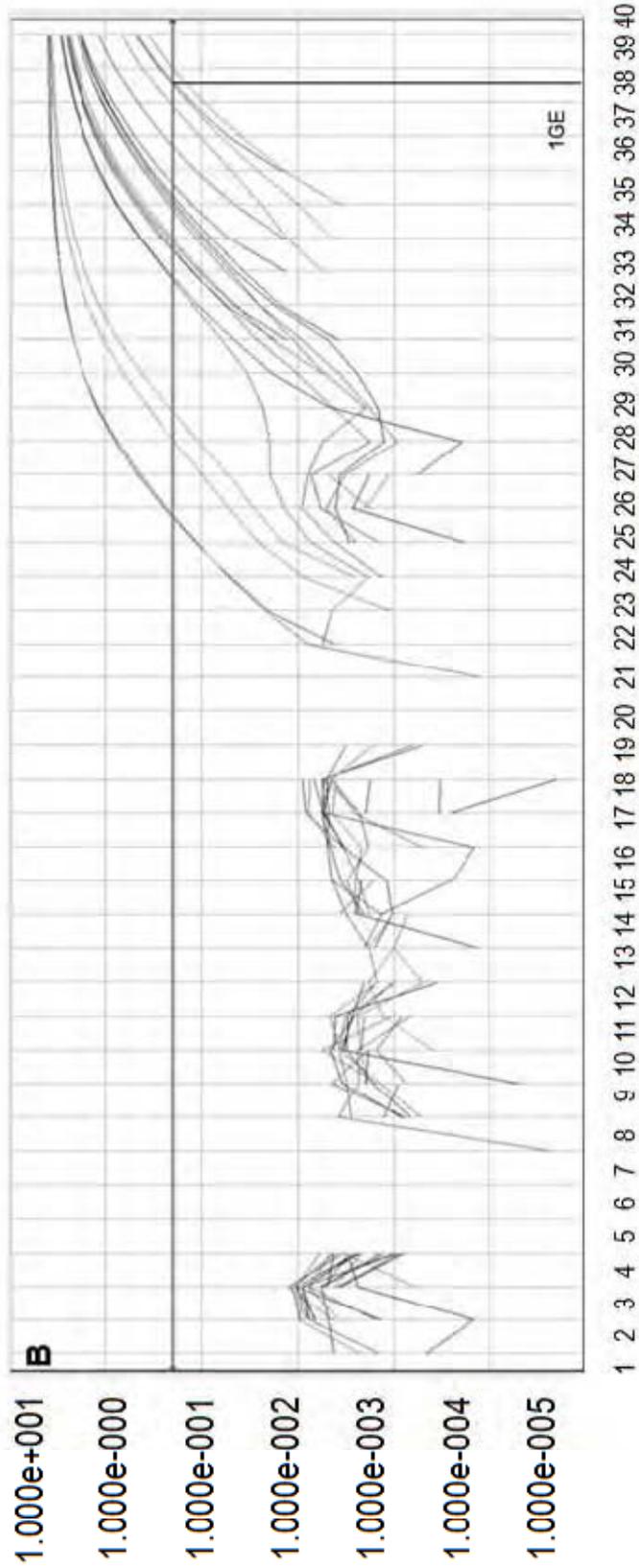


FIG. 16B

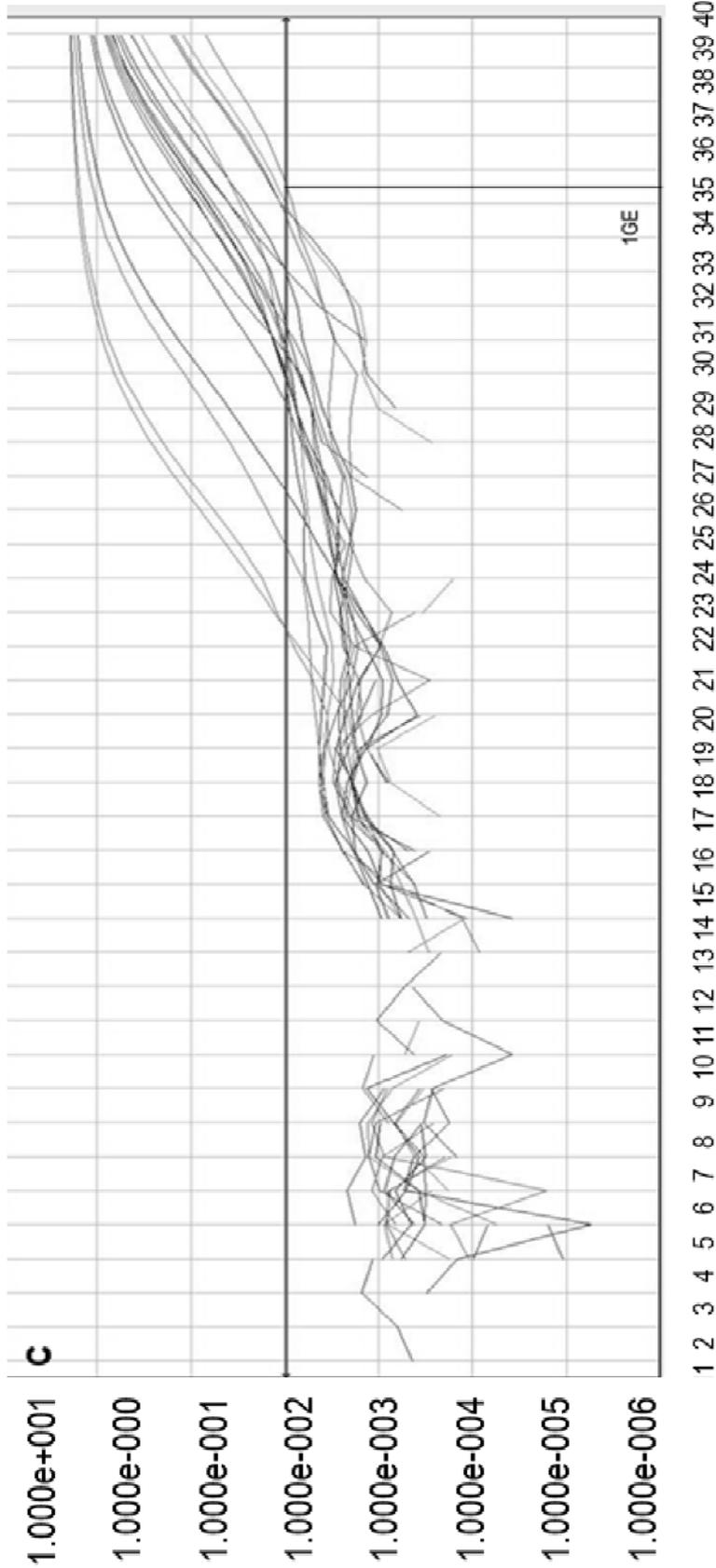


FIG. 16C

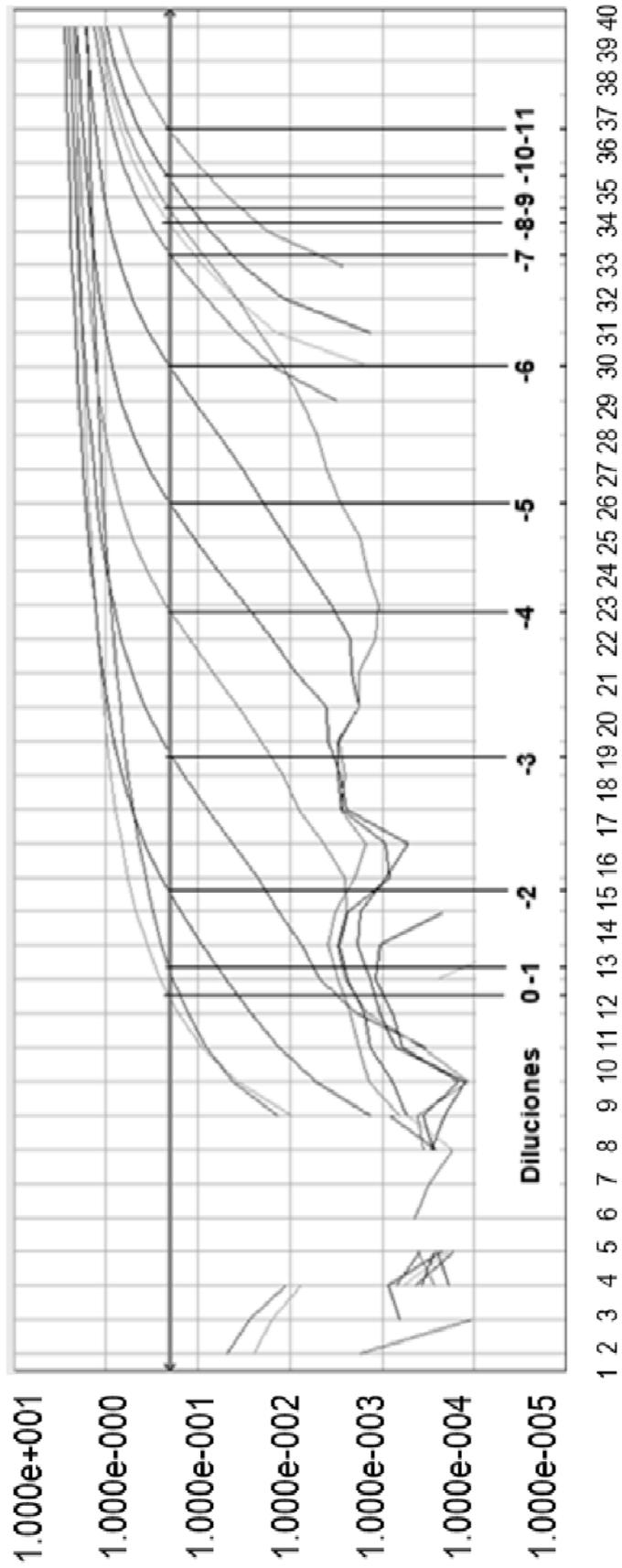


FIG. 17A

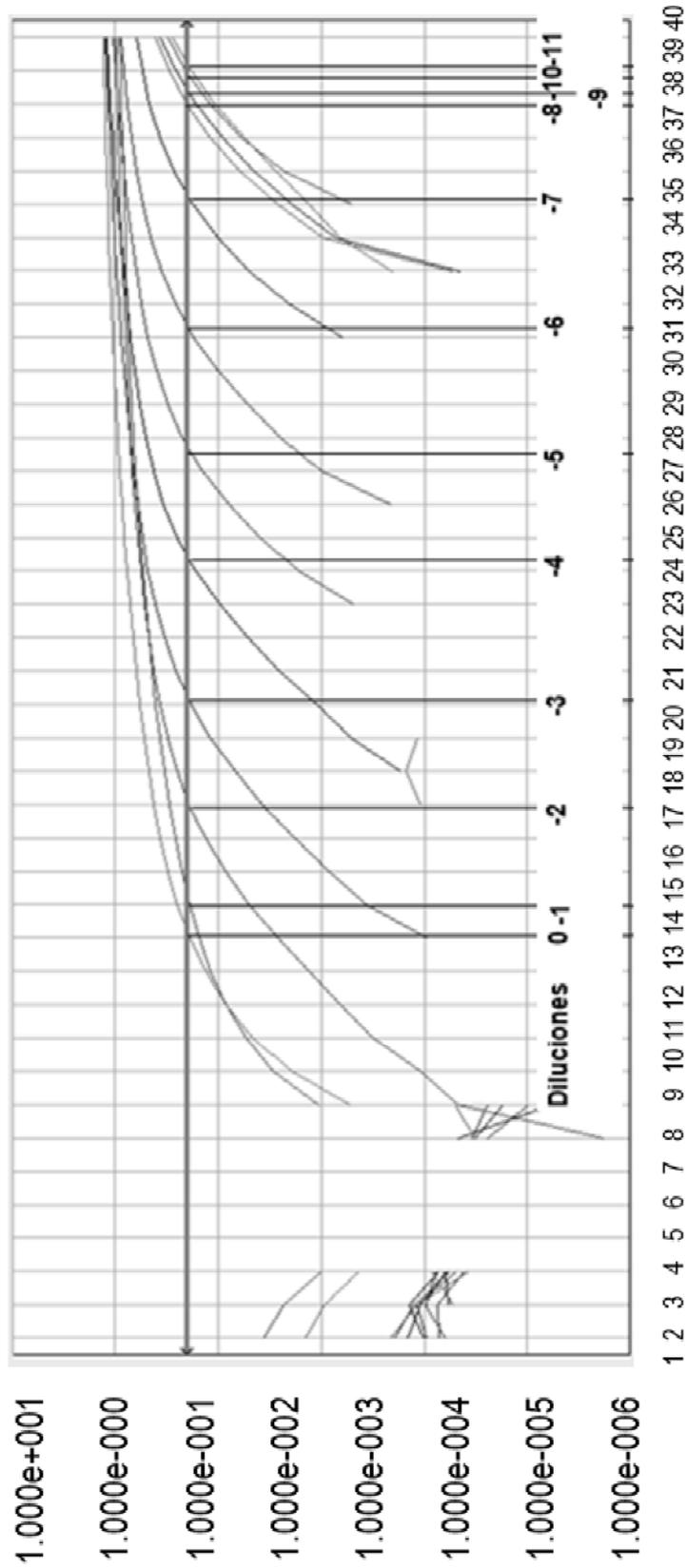


FIG. 17B

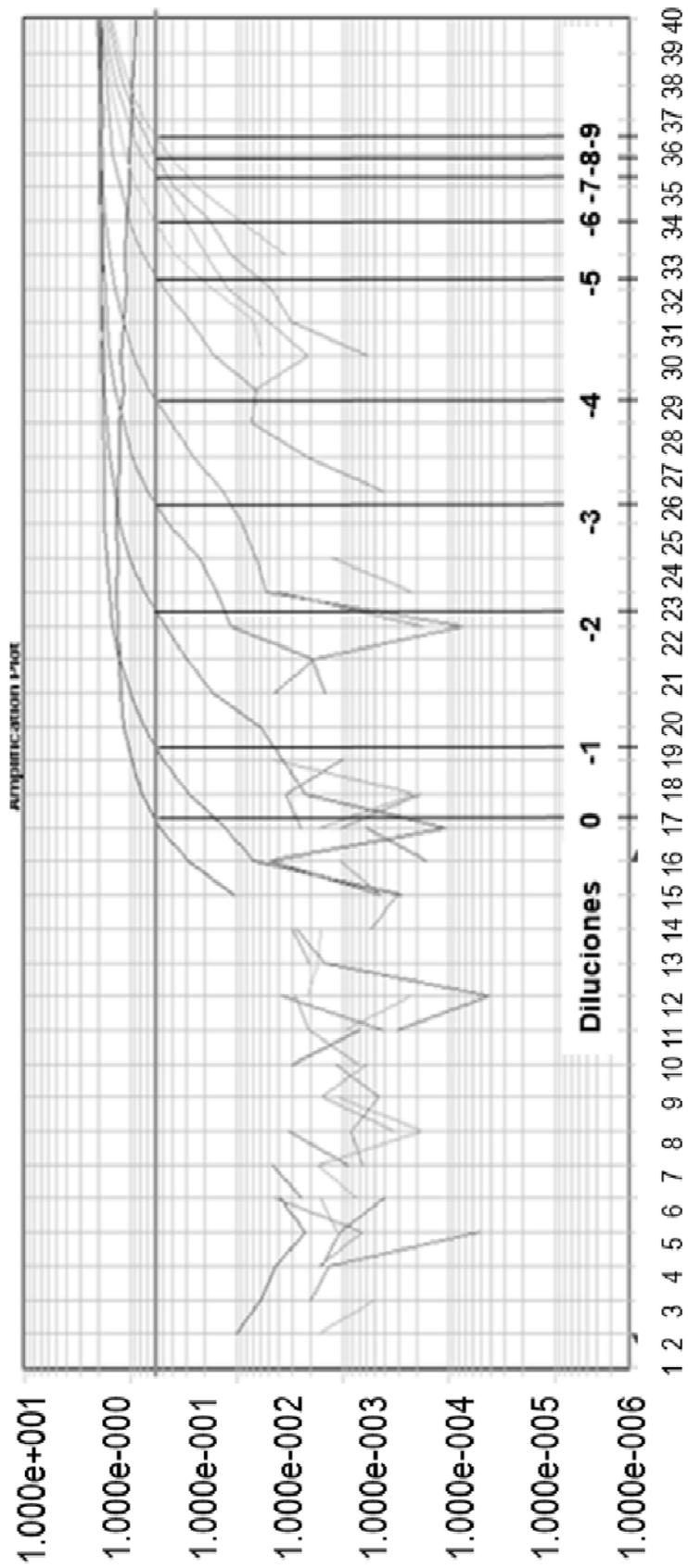


FIG. 17C

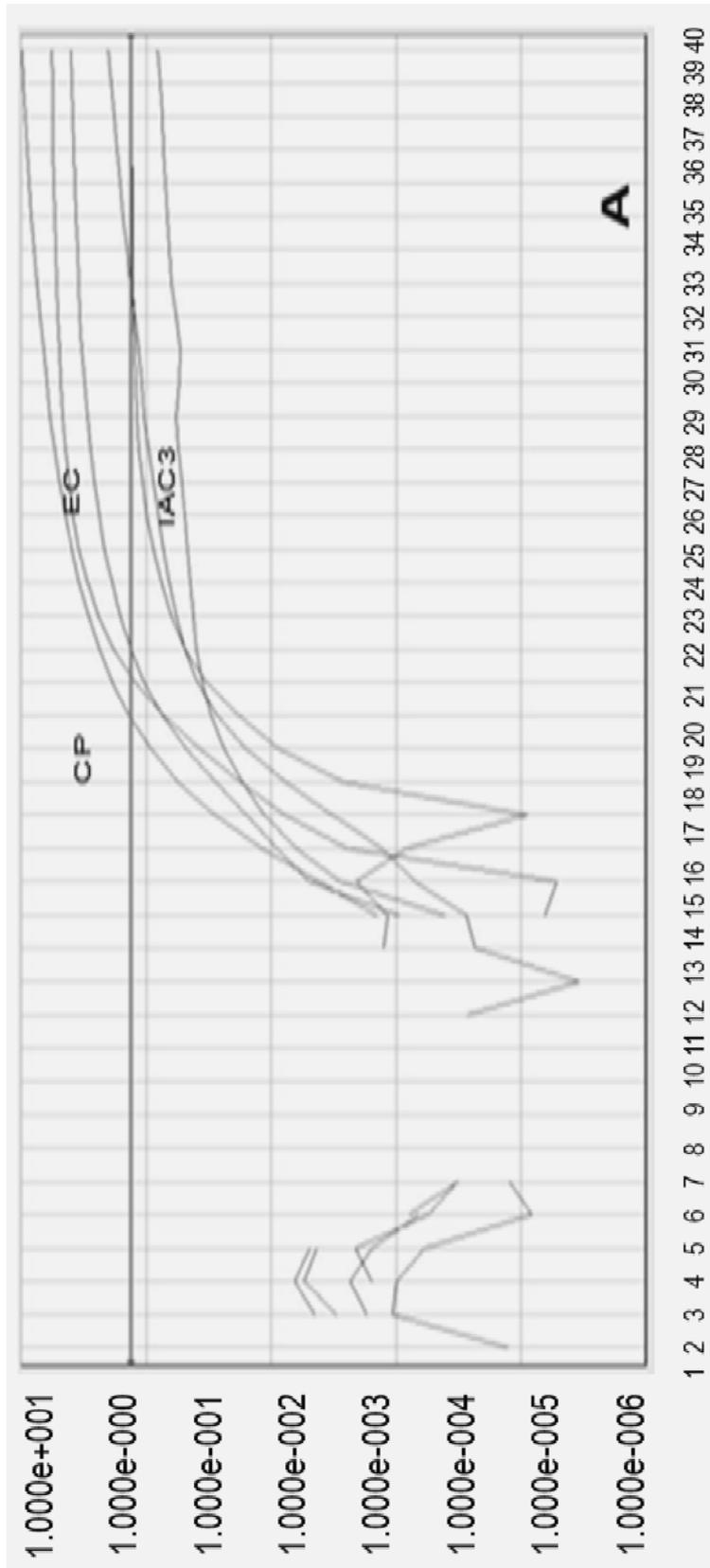


FIG. 18A

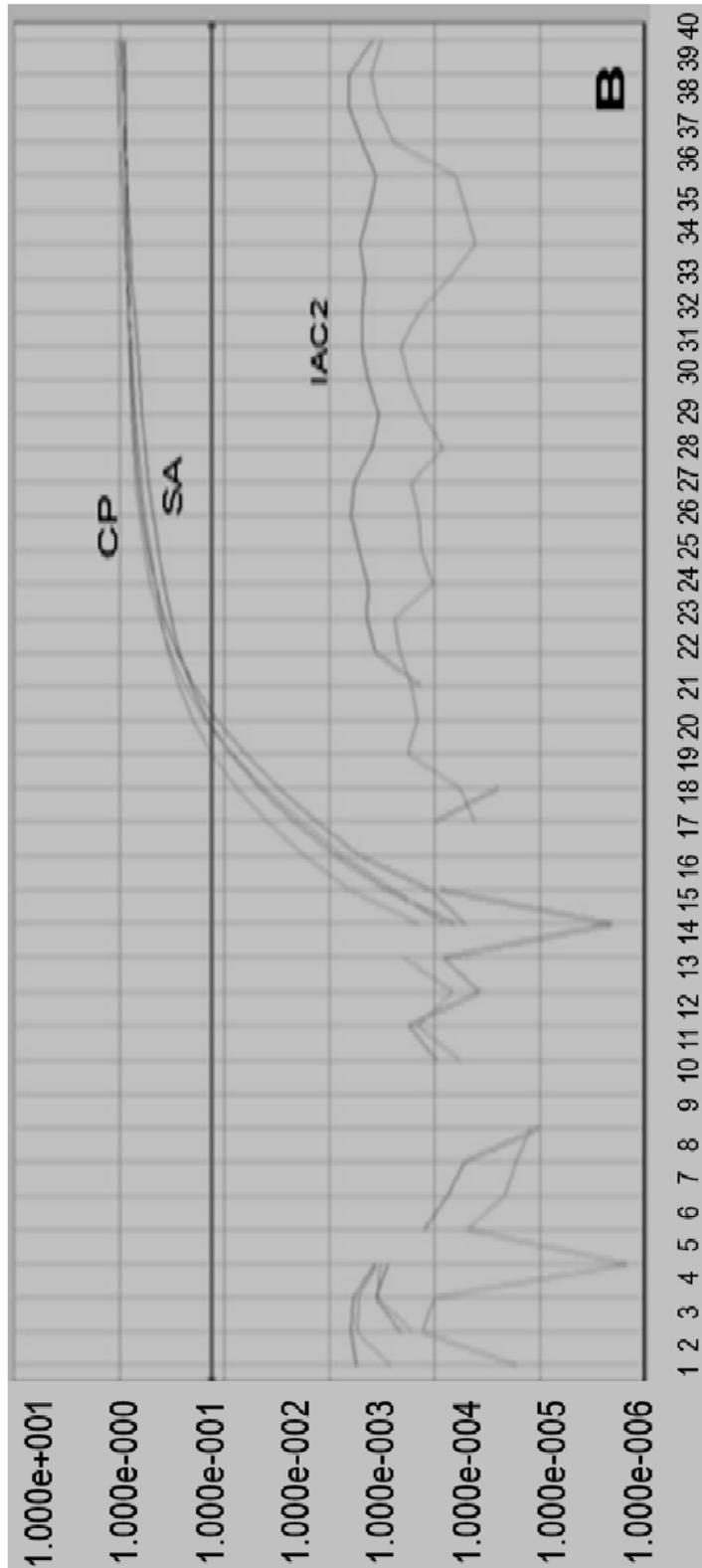


FIG. 18B

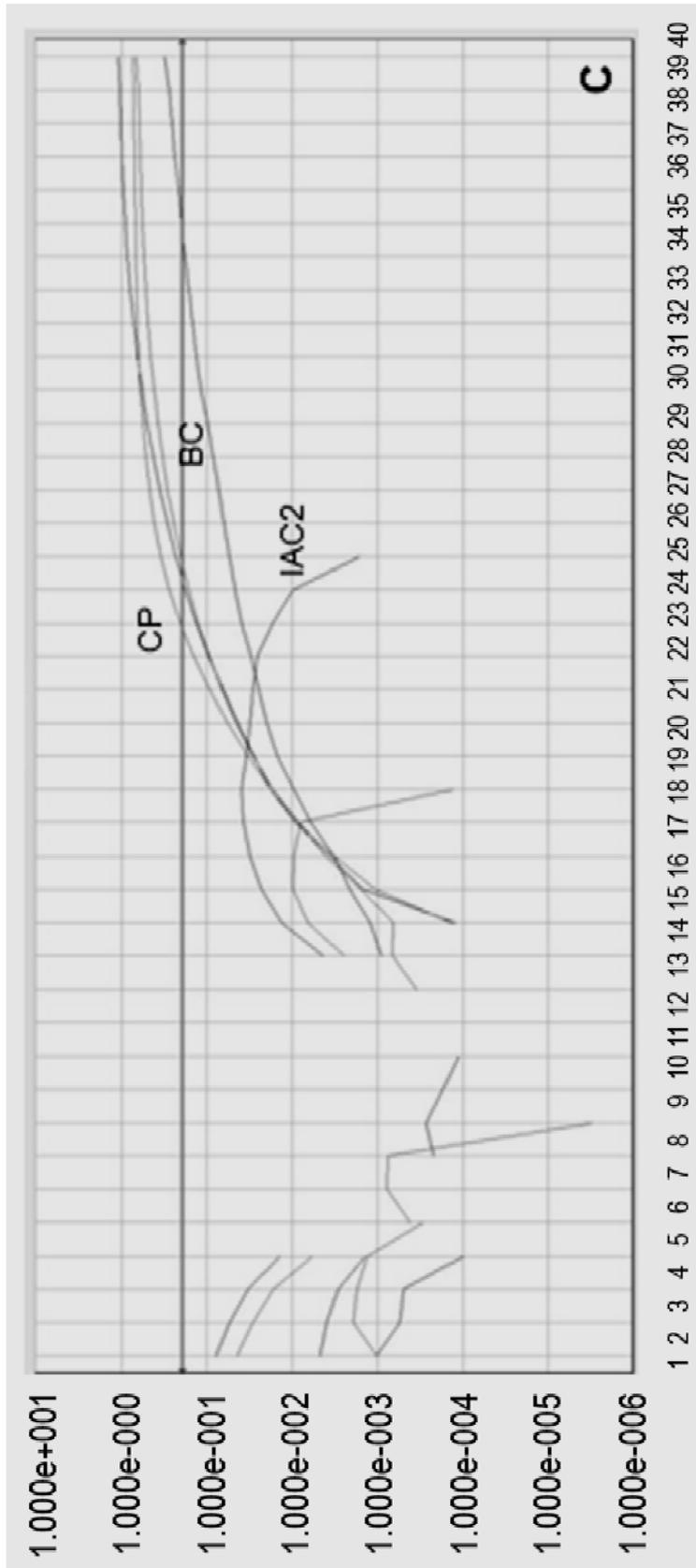


FIG. 18C

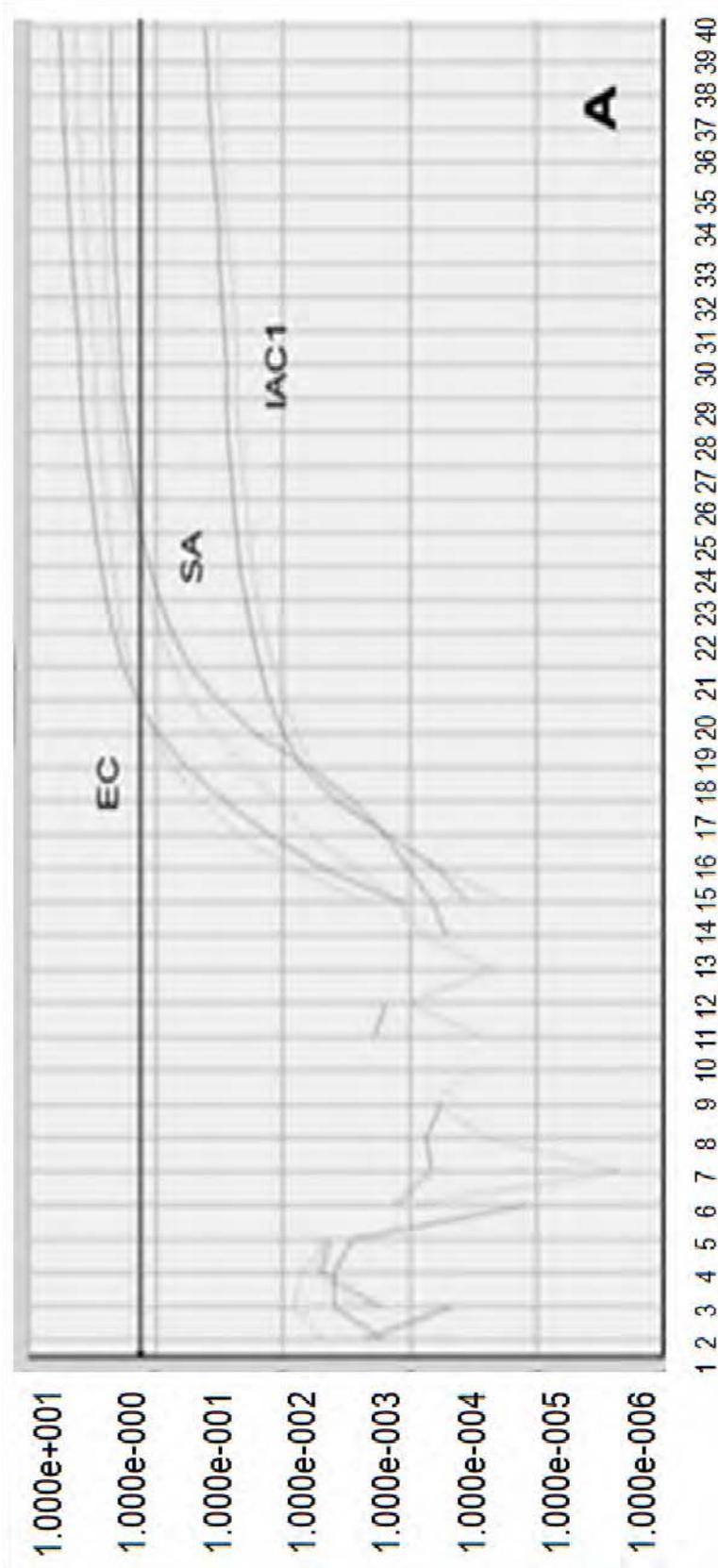


FIG. 19A

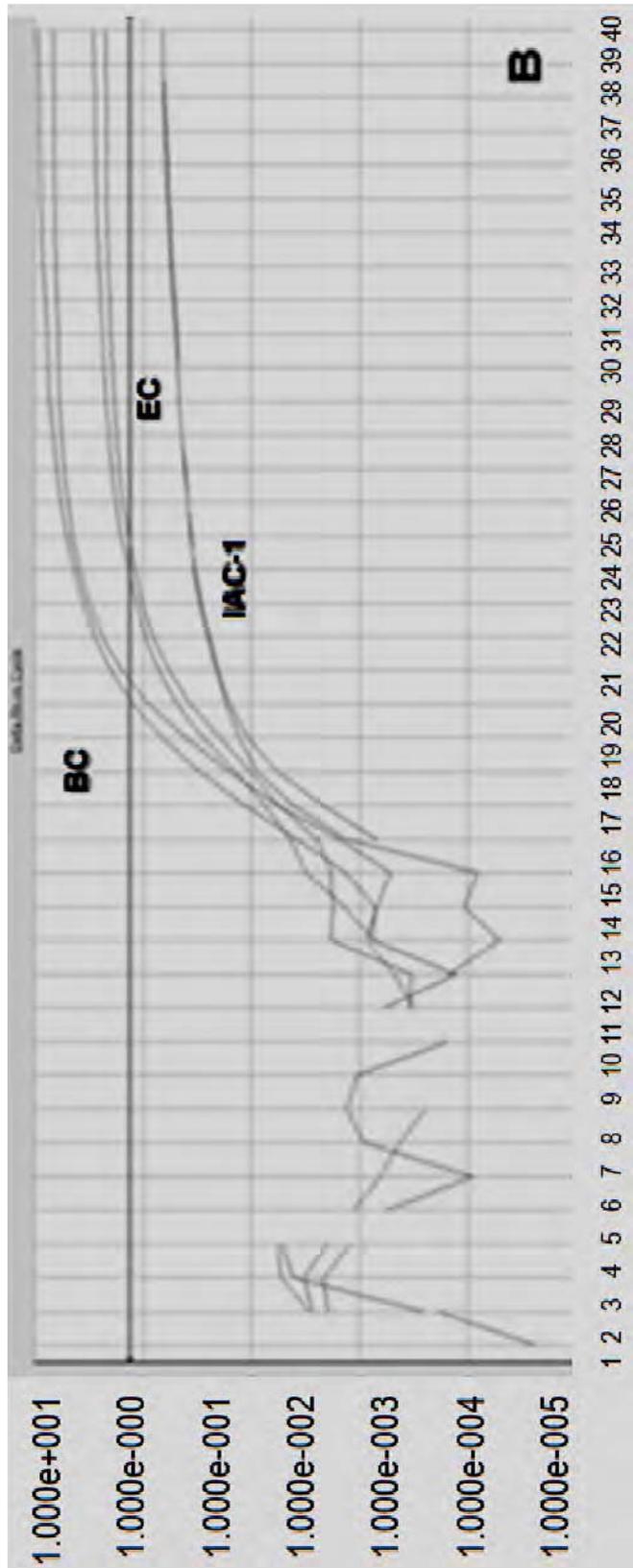


FIG. 19B

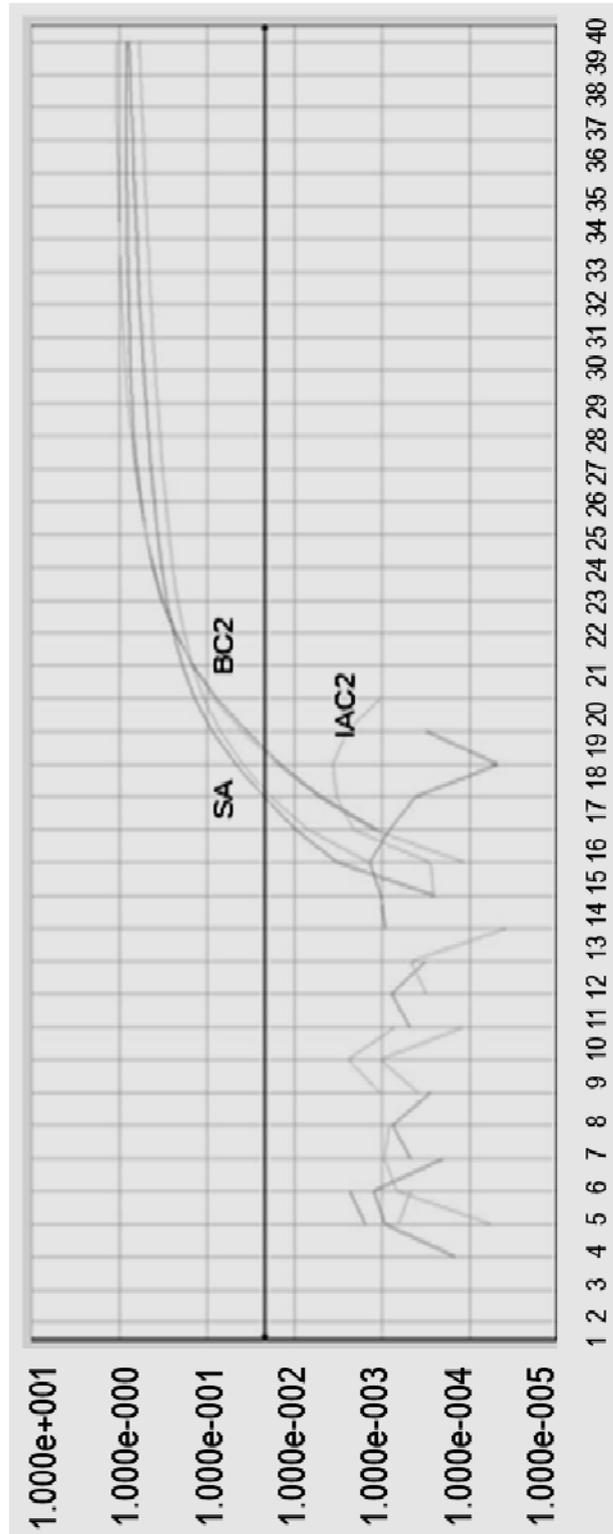


FIG. 20

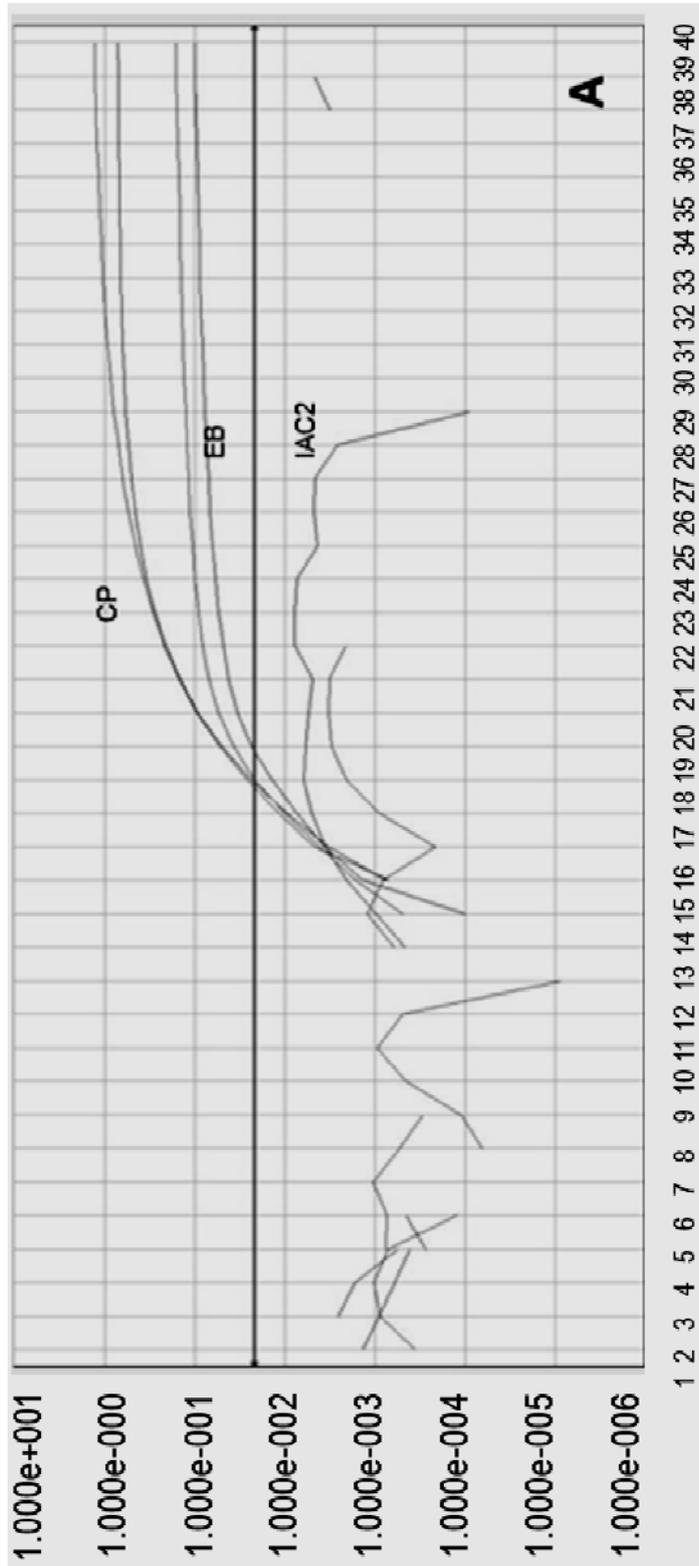


FIG. 21A

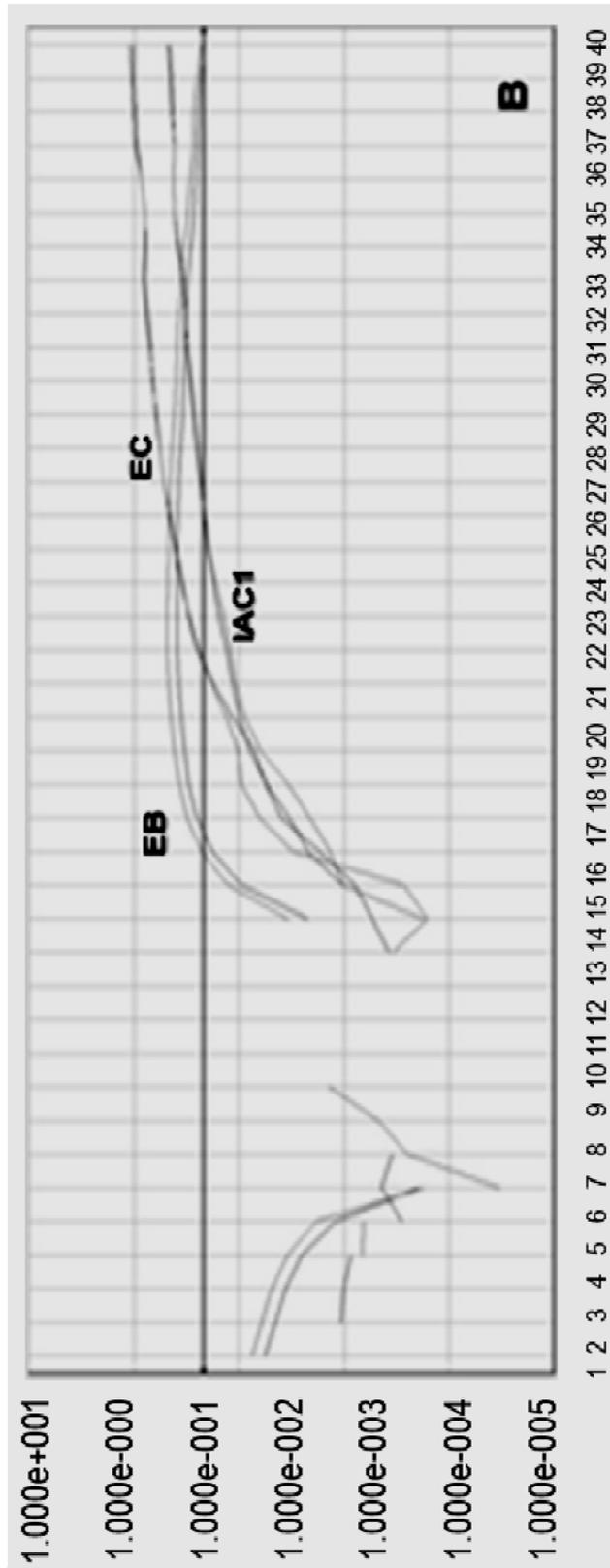


FIG. 21B

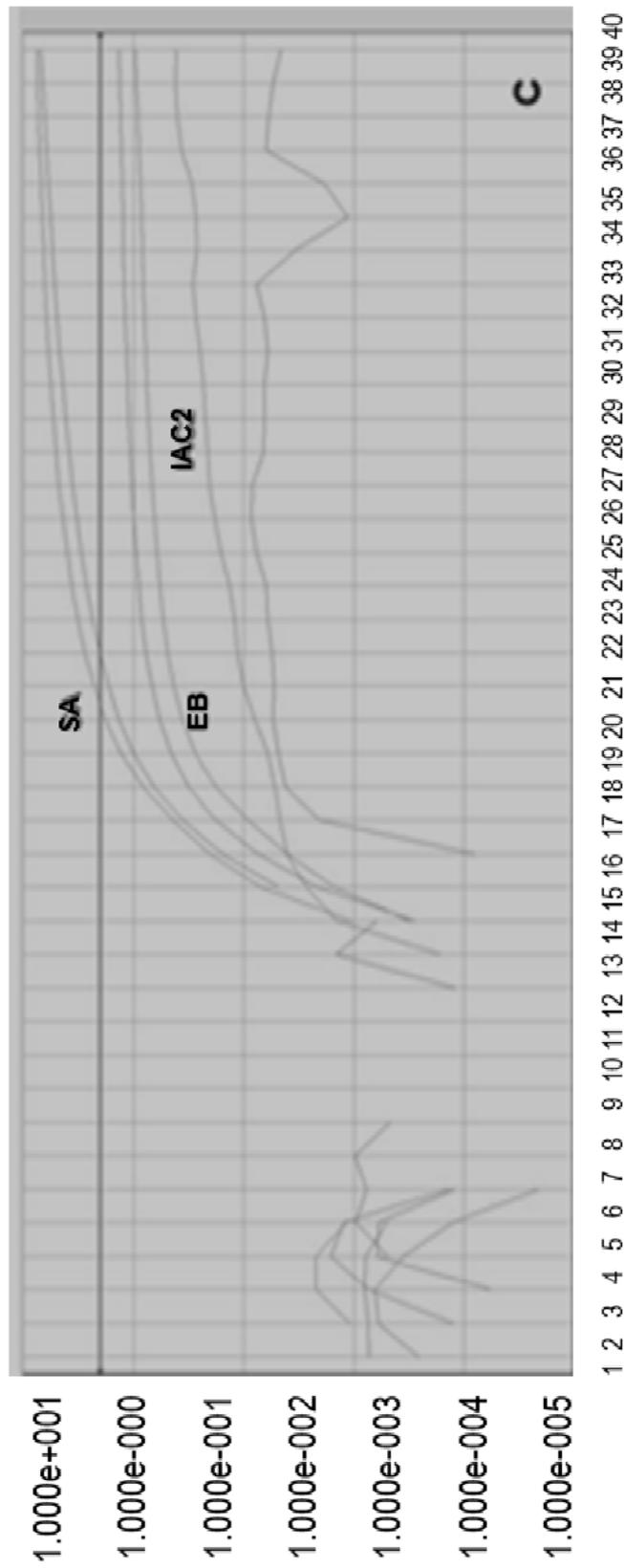


FIG. 21C

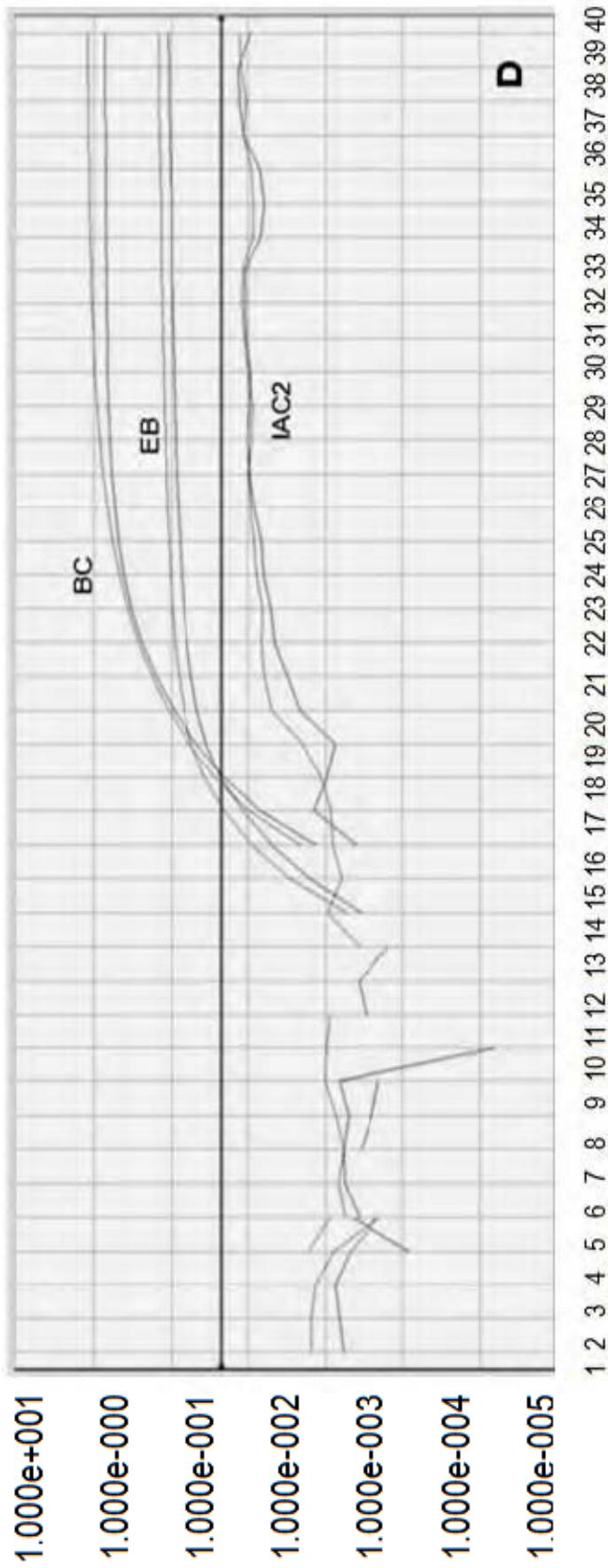


FIG. 21D

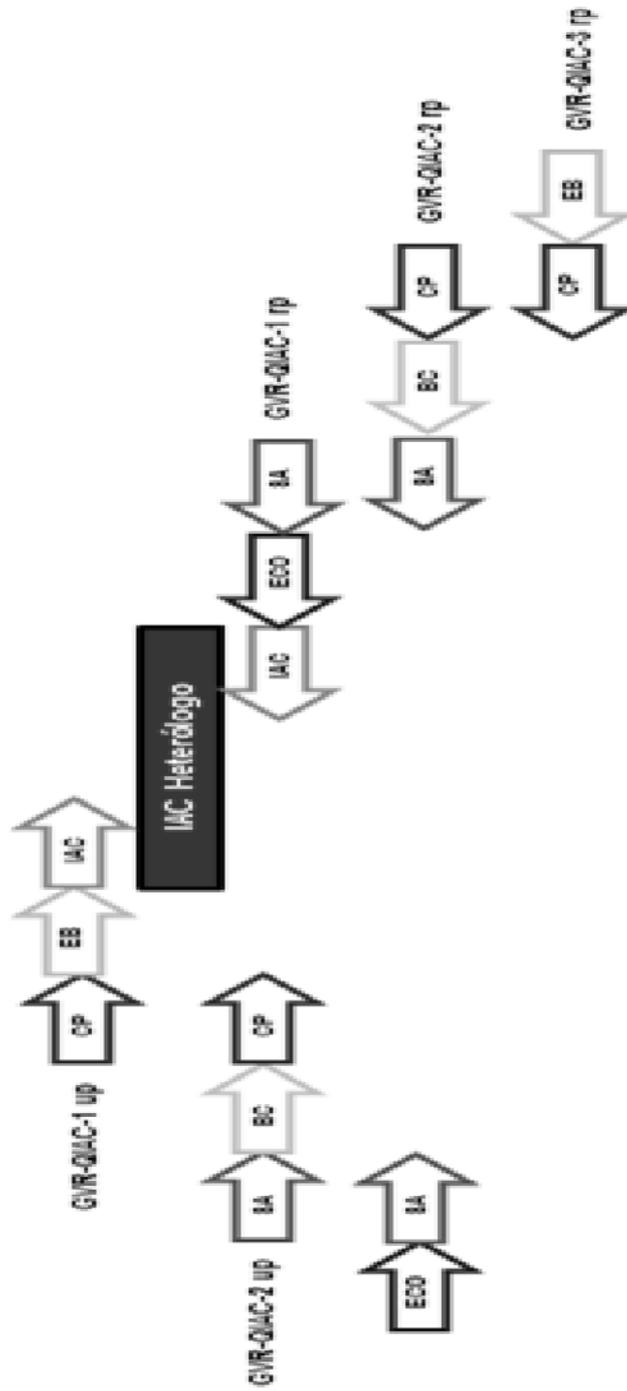


FIG. 22

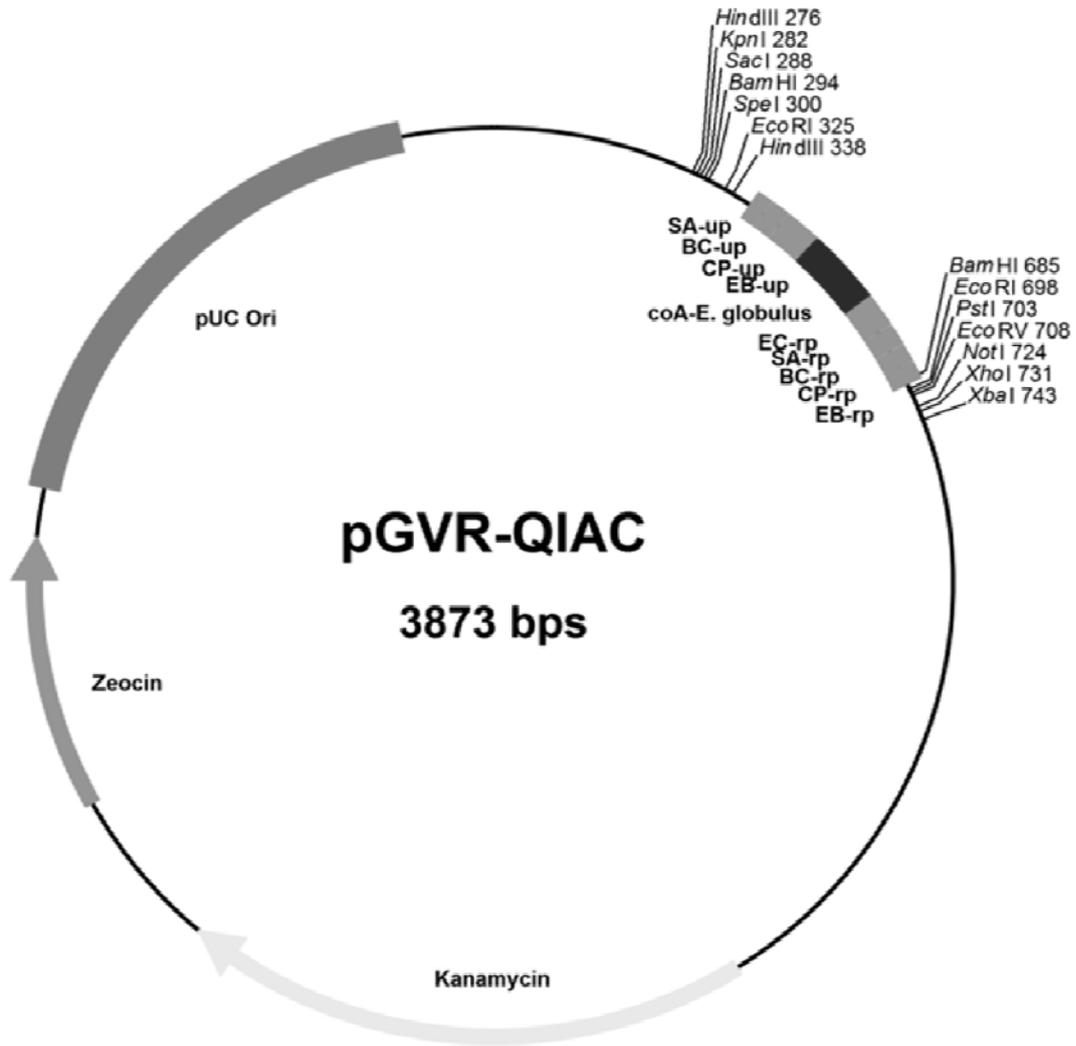


FIG. 23

1

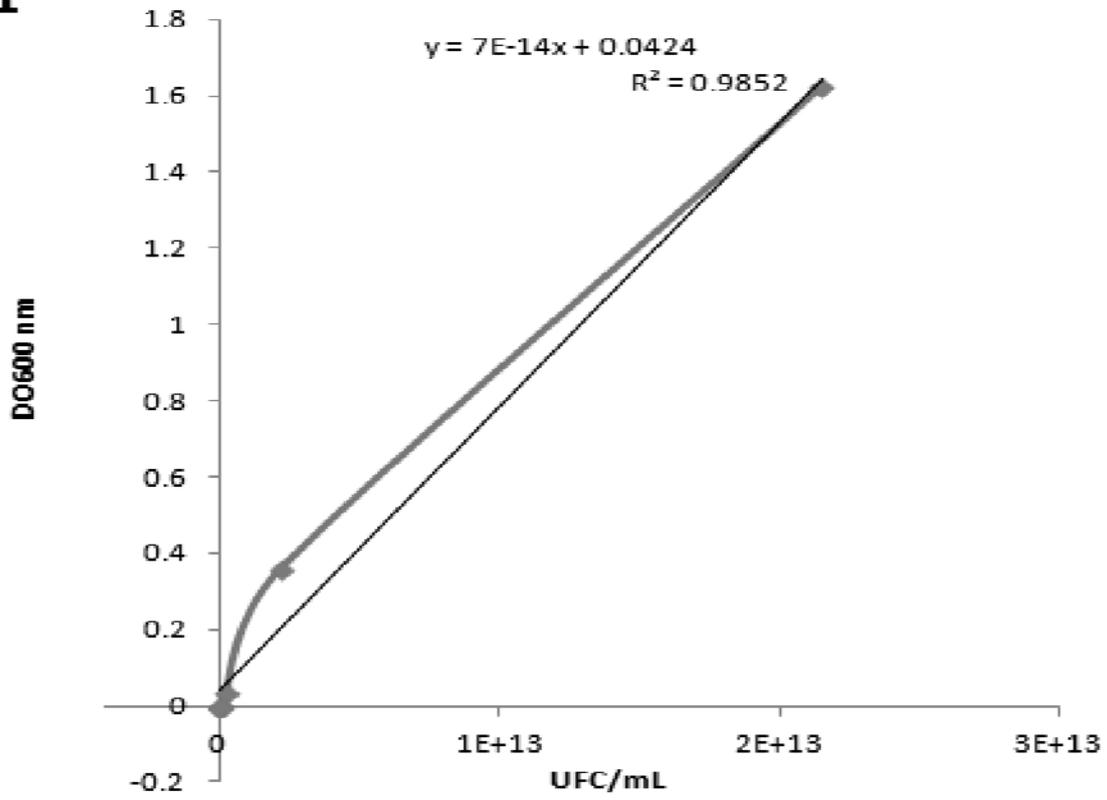


FIG. 24A

2

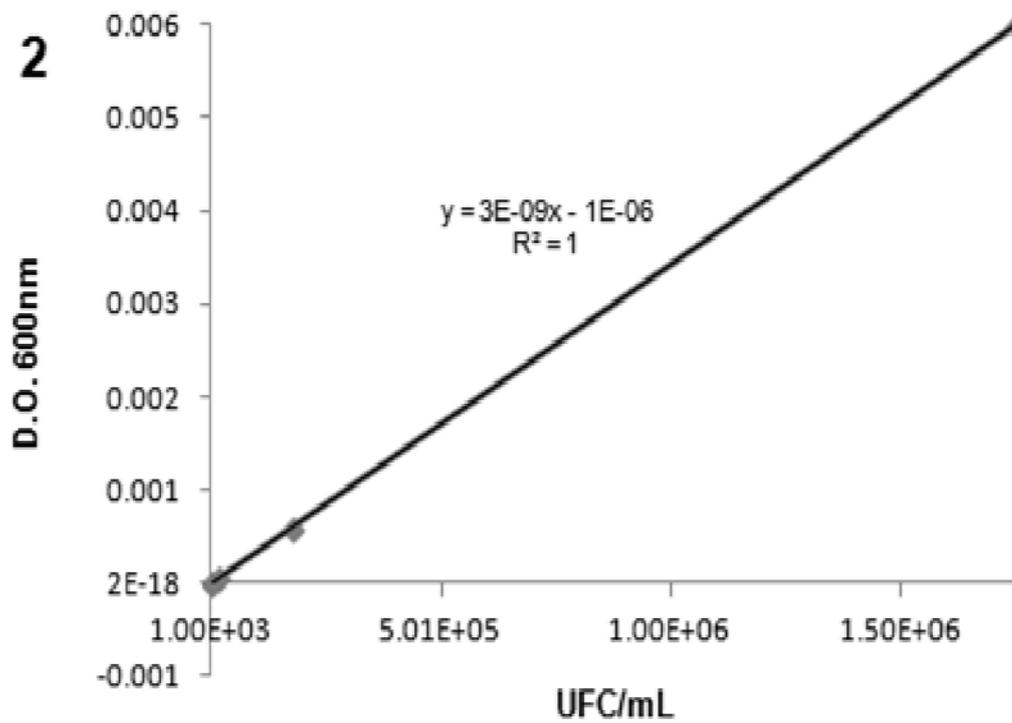


FIG. 24B

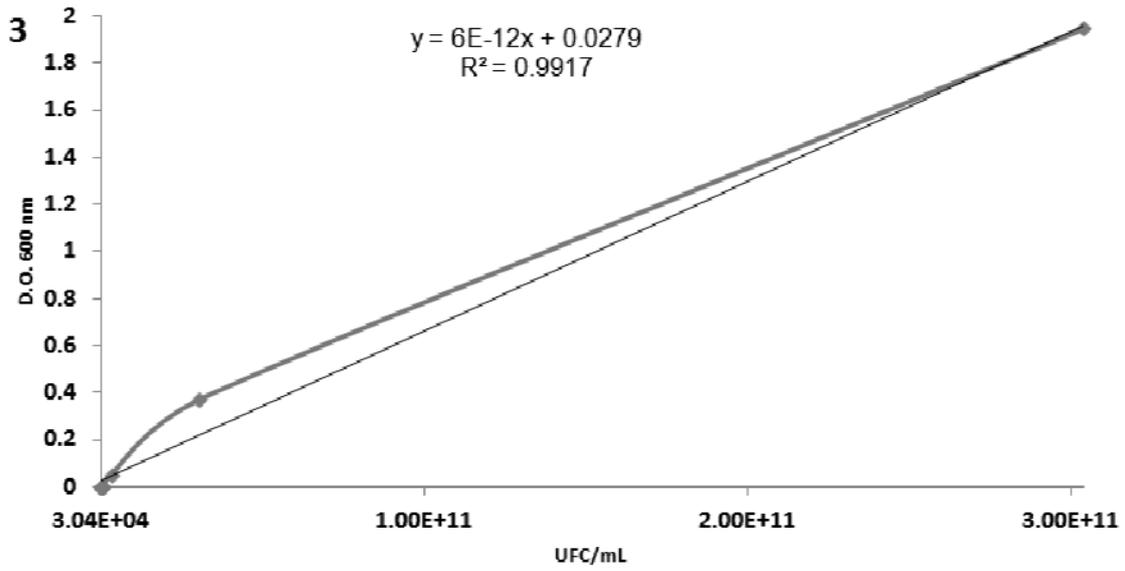


FIG. 24C

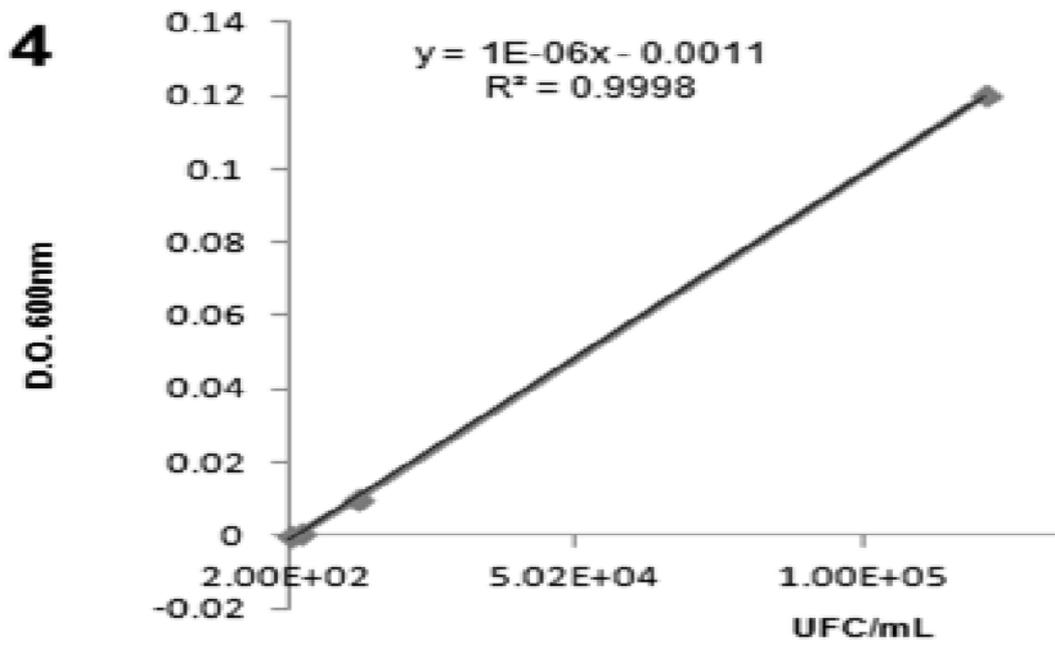


FIG. 24D

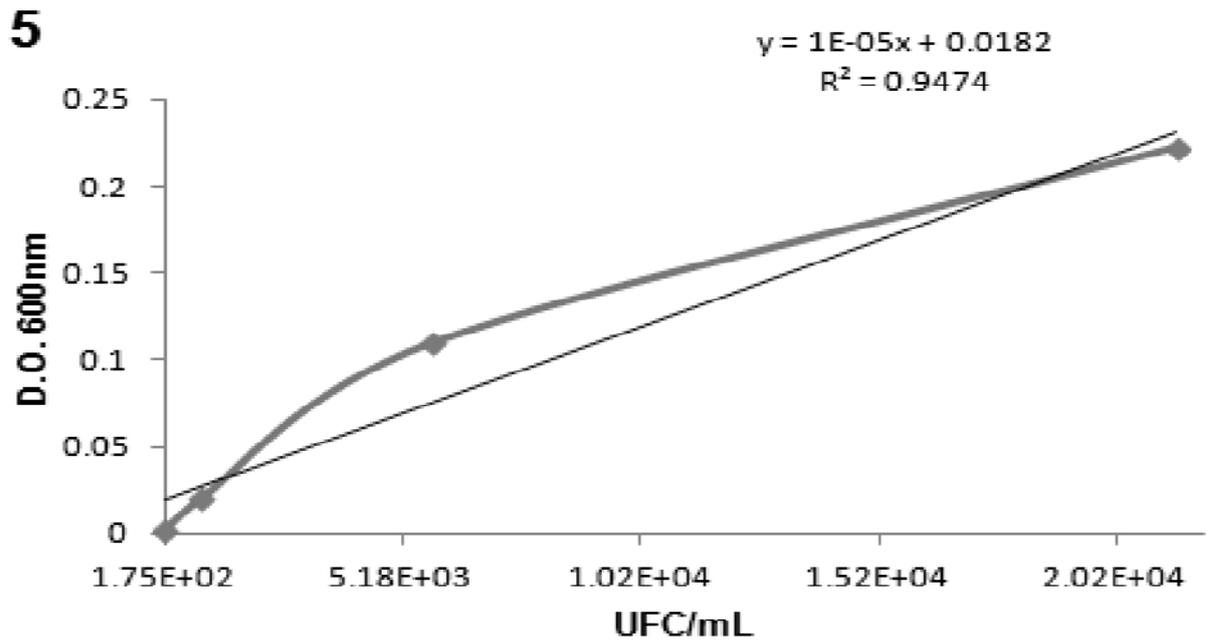


FIG. 24E

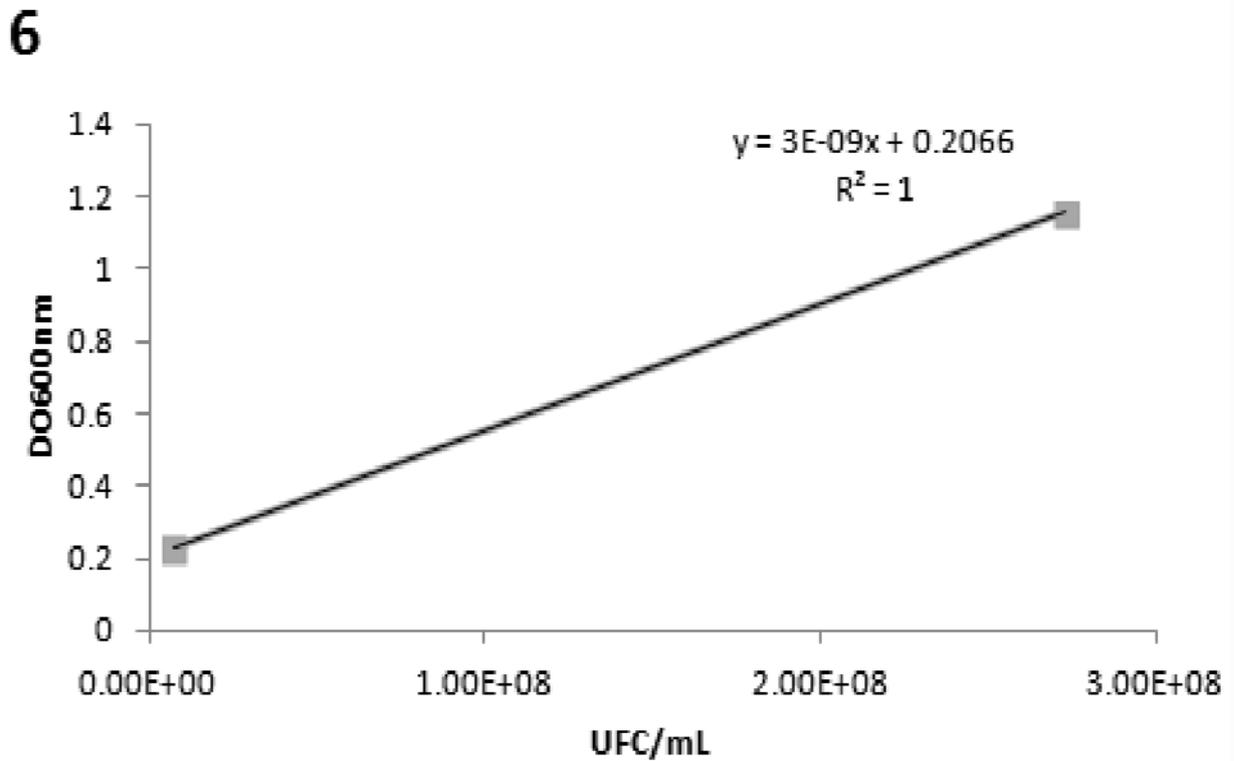


FIG. 24F

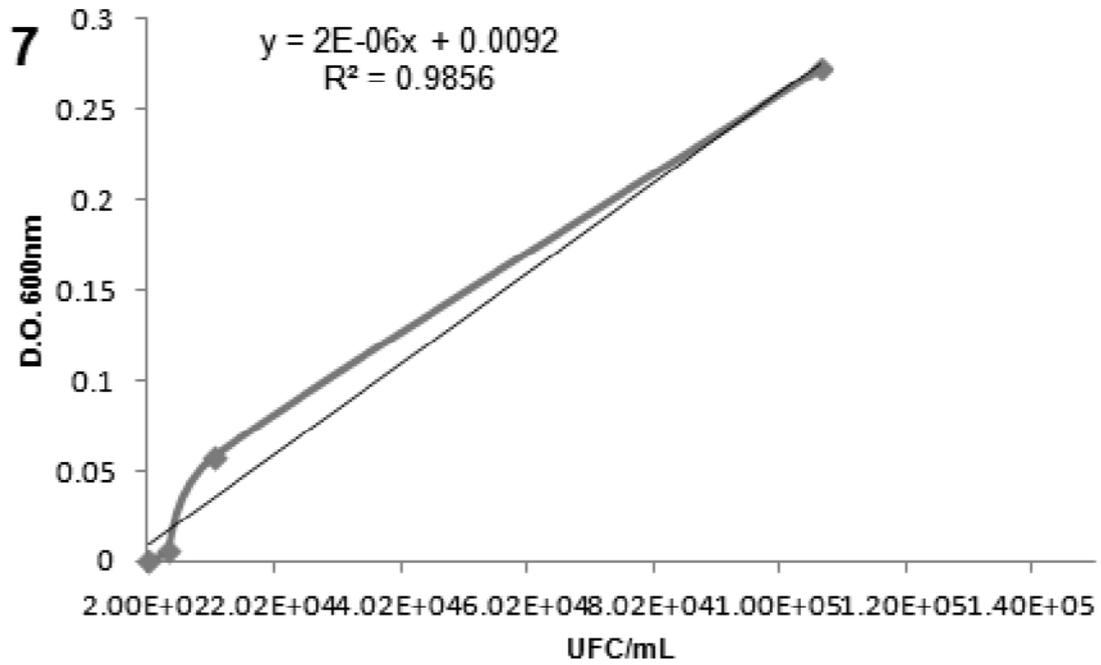


FIG. 24G

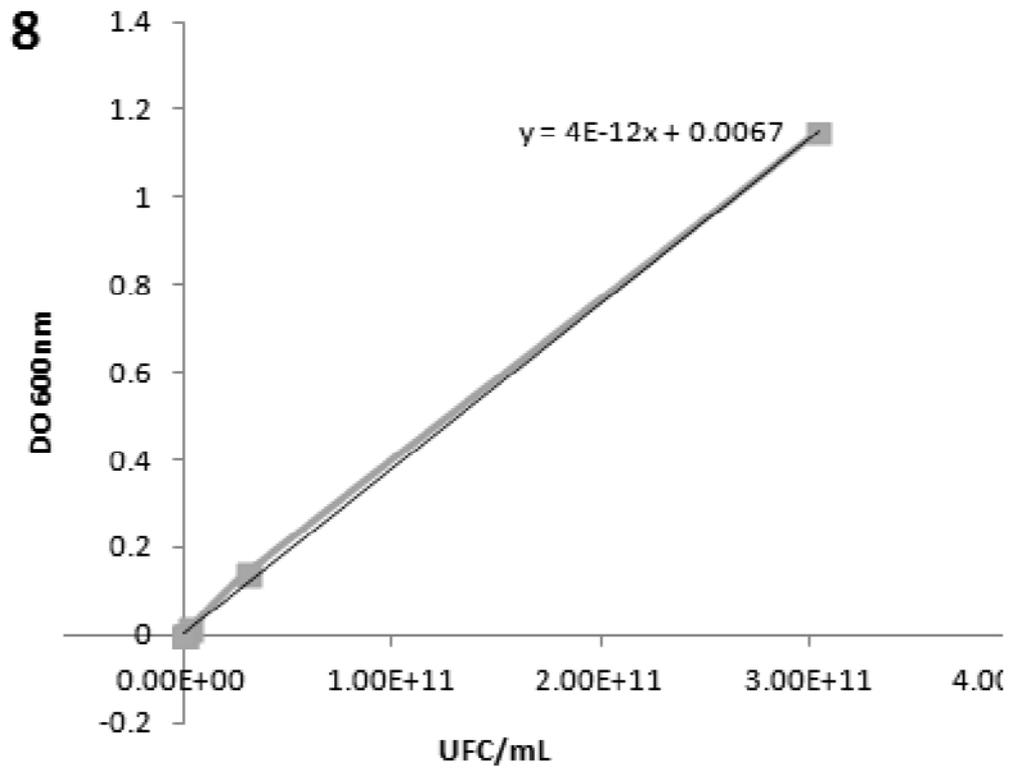


FIG. 24H

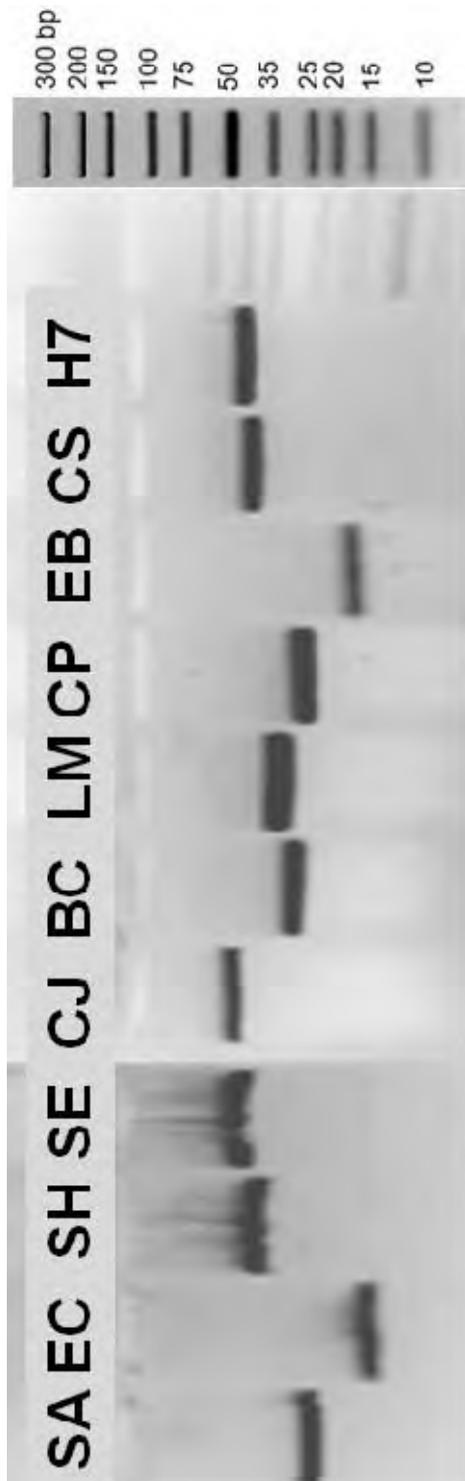


FIG. 25

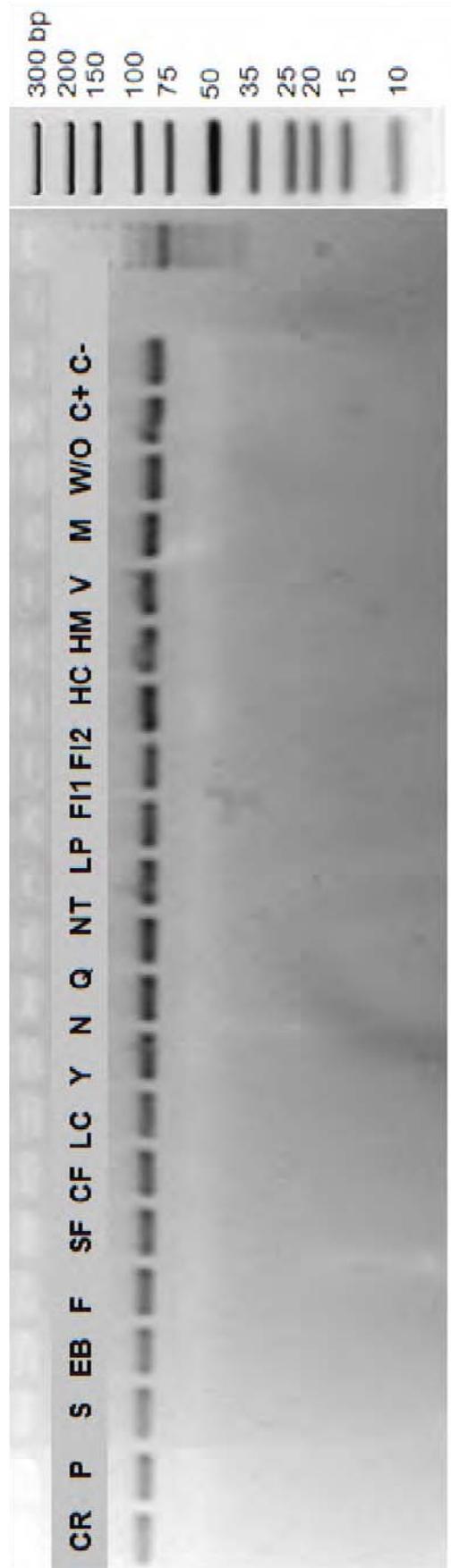


FIG. 26B



FIG. 26C

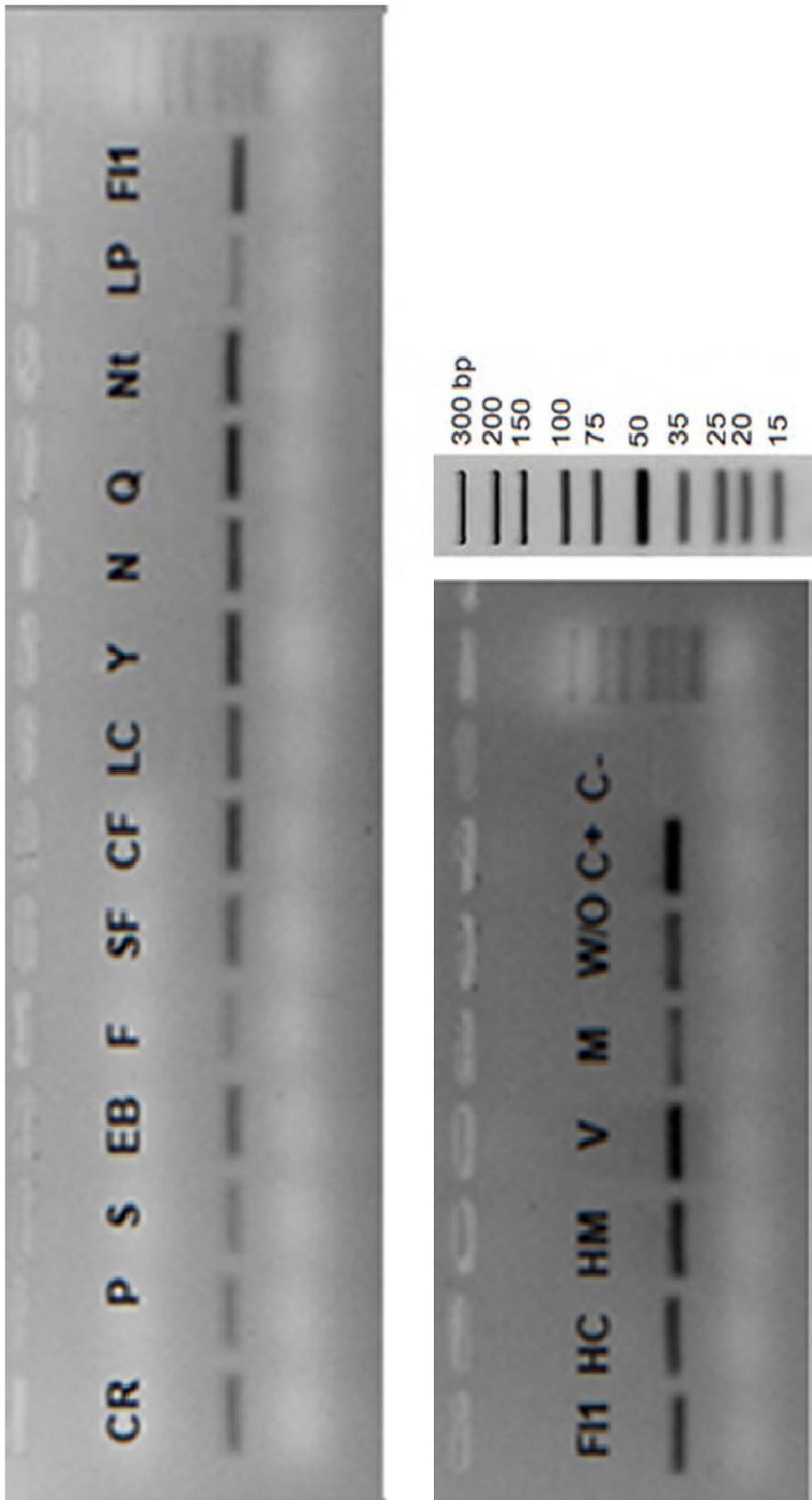


FIG. 26D

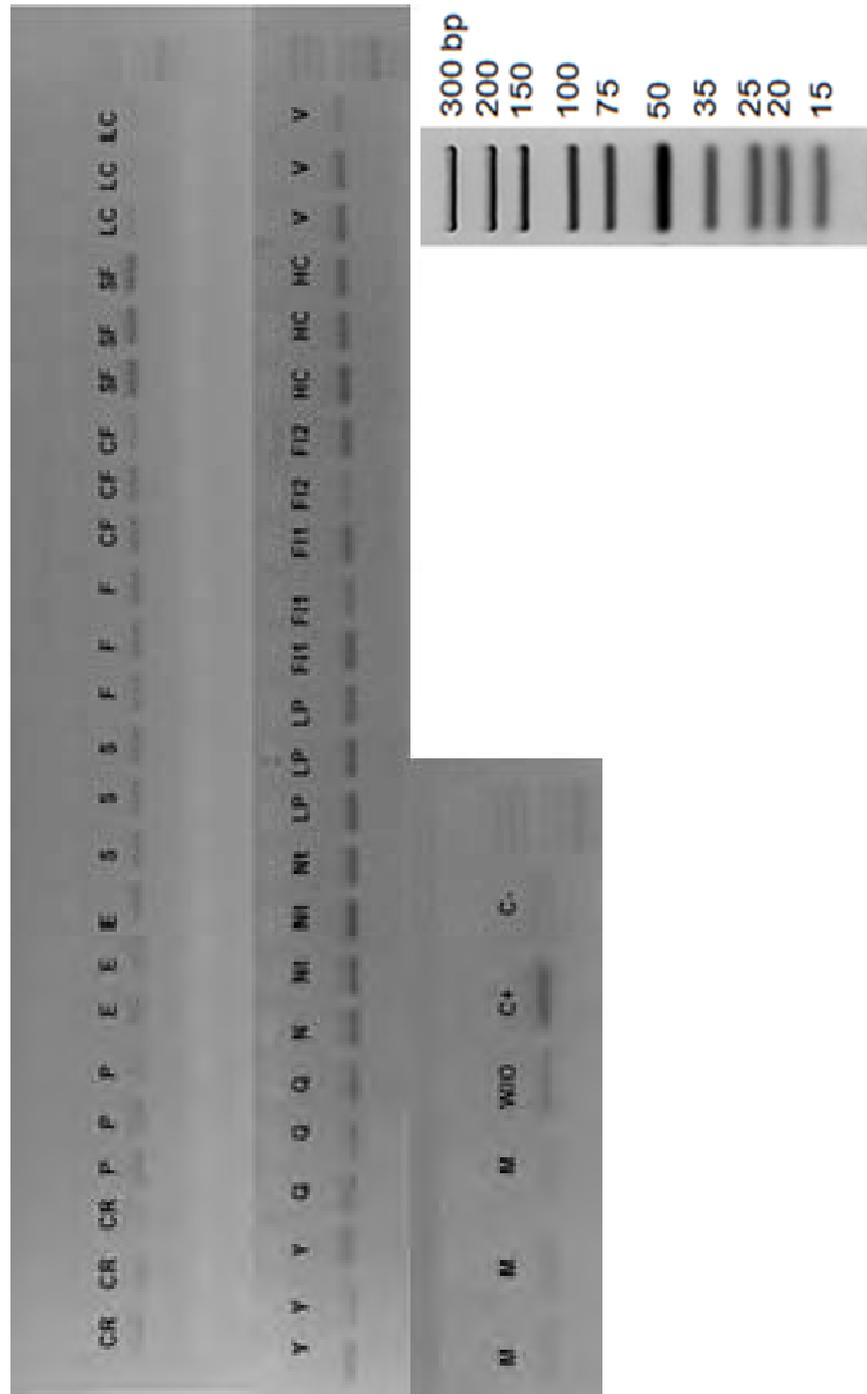


FIG. 27A



FIG. 27B

ES 2 540 158 A1

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> UNIVERSIDAD DE OVIEDO
ALCE CALIDAD, S.L.
INDUSTRIAS LÁCTEAS ASTURIANAS, S.A.
- <120> Método para la detección simultánea de microorganismos patógenos
- <130> ES1624.5
- <160> 47
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> Cebador directo diseñado para amplificar B- cereus (GVR-BC-Mpx-up)
- <400> 1
gcgtactgag ttagagaacg gt 22
- <210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> Cebador inverso diseñado para amplificar B. cereus (GVR-BC-Mpx-rp)
- <400> 2
tttgcttgct ttgcatacgg a 21
- <210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> Cebador directo diseñado para amplificar Campylobacter jejuni
(GVR-CJ-Mpx-up)
- <400> 3
gagtgaggcg aaattccaac 20
- <210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> Cebador inverso diseñado para amplificar Campylobacter jejuni
(GVR-CJ-Mpx-rp)
- <400> 4
tctcatctcc cttgccattg 20
- <210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

ES 2 540 158 A1

<220>
 <223> Cebador directo diseñado para amplificar Clostridium perfringens
 (GVR-CP-Mpx-up)

<400> 5
 tgggaaagtt ctttcaacac c 21

<210> 6
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador inverso diseñado para amplificar Clostridium perfringens
 (GVR-CP-Mpx-rp)

<400> 6
 gagaaagaat ccaagtattc gaagg 25

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

<220>
 <223> Cebadore directo diseñado para amplificar Cronobacter sakazakii
 (GVR-CS-Mpx-up)

<400> 7
 tggcatcatc aacactttcg t 21

<210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador inverso diseñado para amplificar Cronobacter sakazakii
 (GVR-CS-Mpx-rp)

<400> 8
 tcgactacta cctggtggac g 21

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

<220>
 <223> Cebador directo diseñado para amplificar E. coli (GVR-EC-Mpx-up)

<400> 9
 gttggtggga aagcgcgta ca 22

<210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador inverso diseñado para amplificar E. coli (GVR-EC-Mpx-rp)

ES 2 540 158 A1

<400> 10
cgttaaaact gcctggcaca g 21

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador directo diseñado para amplificar una cepa enterohemorrágica de E. coli (GVR-H7-Mpx-up)

<400> 11
tgggtactgt gcctgttact g 21

<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador inverso diseñado para amplificar una cepa enterohemorrágica de E. coli (GVR-H7-Mpx-rp)

<400> 12
aagccctcgt atatccacag c 21

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador directo diseñado para amplificar una bacteria de la familia Enterobacteriaceae (GVR-EB-Mpx-up)

<400> 13
tcagagttcc cgaaggcact c 21

<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador inverso diseñado para amplificar una bacteria de la familia Enterobacteriaceae (GVR-EB-Mpx-rp)

<400> 14
gcaacgcgaa gaaccttacc t 21

<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador directo diseñado para amplificar Listeria monocytogenes (GVR-LM-Mpx-up)

<400> 15

ES 2 540 158 A1

tgacgaaatg gcttacagtg a	21
<210> 16	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Cebador inverso diseñado para amplificar <i>Listeria monocytogenes</i> (GVR-LM-Mpx-rp)	
<400> 16	
gccgaagttt acattcaagc t	21
<210> 17	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Cebador directo diseñado para amplificar <i>Salmonella</i> spp. (GVR-SE-Mpx-up)	
<400> 17	
cccgatatttc tctggatggt	20
<210> 18	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Cebador inverso diseñado para amplificar <i>Salmonella</i> spp. (GVR-SE-Mpx-rp)	
<400> 18	
ggcaatagcg tcacctttga	20
<210> 19	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Cebador directo diseñado para amplificar <i>Shigella</i> spp. (GVR-SH-Mpx-up)	
<400> 19	
tcaaaacaca ttgatgagta tcagg	25
<210> 20	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Cebador inverso diseñado para amplificar <i>Shigella</i> spp. (GVR-SH-Mpx-rp)	
<400> 20	
tacatctttt tgaccggact tctta	25
<210> 21	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	

ES 2 540 158 A1

<220>
 <223> Cebador directo diseñado para amplificar Staphylococcus aureus (GVR-SA-Mpx-up)

<400> 21
 gcaactgaaa caacagaagc t 21

<210> 22
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador inverso diseñado para amplificar Staphylococcus aureus (GVR-SA-Mpx-rp)

<400> 22
 tcacggatac ctgtaccagc a 21

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

<220>
 <223> Cebador directo diseñado para amplificar B. cereus mediante RT-PCR (RT-GVR-BC-up)

<400> 23
 ggtcgtagta gtggaagcga atg 23

<210> 24
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador inverso diseñado para amplificar B. cereus mediante RT-PCR (RT-GVR-BC-rp)

<400> 24
 aacgtagga aactattcat c 21

<210> 25
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador directo diseñado para amplificar C. perfring mediante RT-PCR (RT-GVR-CP-up)

<400> 25
 tgggaaagtt ctttcaacac c 21

<210> 26
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador inverso diseñado para amplificar C. perfringens mediante

RT-PCR (RT-GVR-CP-rp)

<400> 26
 aaaaacaaaa cggtggatta agag 24

<210> 27
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador directo diseñado para amplificar un microorganismo de la Familia Enterobacteriaceae mediante RT-PCR (RT-GVR-EB-up)

<400> 27
 cgcaagaac cttacctact cttg 24

<210> 28
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador inverso diseñado para amplificar un microorganismo de la Familia Enterobacteriaceae mediante RT-PCR (RT-GVR-EB-rp)

<400> 28
 tcccgaaggc actcctctat c 21

<210> 29
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador directo diseñado para amplificar E. coli mediante RT-PCR (RT-GVR-EC-up)

<400> 29
 tggtgattac cgacgaaaac g 21

<210> 30
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador inverso diseñado para amplificar E. coli mediante RT-PCR (RT-GVR-EC-rp)

<400> 30
 ccggcgtagt taaagaaatc atg 23

<210> 31
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador directo diseñado para amplificar S. aureus mediante RT-PCR (RT-GVR-SA-up)

<400> 31

ccgcaattta acaaaacacc 20

<210> 32
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador inverso diseñado para amplificar *S. aureus* mediante RT-PCR (RT-GVR-SA-rp)

<400> 32
 tggctcgcgct tcatatccaa 20

<210> 33
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sonda TaqMan-GVR-BC1 diseñada para cuantificar *B. cereus*

<400> 33
 aacgtagga aactattcat c 21

<210> 34
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sonda TaqMan-GVR-BC2 diseñada para cuantificar *B. cereus*

<400> 34
 aacgtagga aactattcat c 21

<210> 35
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sonda TaqMan-GVR-CP diseñada para amplificar *C. perfringens*

<400> 35
 taactcaatt caacataggt gaca 24

<210> 36
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sonda TaqMan-GVR-EB diseñada para cuantificar un microorganismo de la Familia Enterobacteriaceae

<400> 36
 catccagaga atccttt 17

<210> 37
 <211> 19
 <212> DNA

ES 2 540 158 A1

<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Sonda TaqMan-GVR-EC diseñada para cuantificar E. coli	
<400>	37	
	caagaaaaag cagtcttac	19
<210>	38	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Sonda TaqMan-GVR-SA diseñada para cuantificar S. aureus	
<400>	38	
	cgtgaataca acgatggaac a	21
<210>	39	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Control Interno de Amplificación TaqMan-GVR-IAC1	
<400>	39	
	aaccgtcagg aaccagac	19
<210>	40	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Control Interno de Amplificación TaqMan-GVR-IAC2	
<400>	40	
	aaccgtcagg aaccagac	19
<210>	41	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Control Interno de Amplificación TaqMan-GVR-IAC3	
<400>	41	
	aaccgtcagg aaccagac	19
<210>	42	
<211>	74	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador directo GVR-QIAC1-up utilizado para la construcción del IAC quimérico	
<400>	42	
	aaaatgggaa agttctttca acaccaagcg ggacttaacc caacatttca caaaggattg	60

tcaagctgct cctc 74

<210> 43
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador inverso GVR-QIAC1-rp utilizado para la construcción del IAC quimérico

<400> 43
 aaaatggtct cgcttcatat ccaaaaccgg cgtagttaa gaaatcatga agctccgtcc 60

agctctctc 69

<210> 44
 <211> 72
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador directo GVR-QIAC2-up utilizado para la construcción del IAC quimérico

<400> 44
 aaaaccgcaa ttaacaaaa caccaaggtc gtagtagtgg aagcgaatga atgggaaagt 60

tctttcaaca cc 72

<210> 45
 <211> 71
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador inverso GVR-QIAC2-rp utilizado para la construcción del IAC quimérico

<400> 45
 aaaaaaaaaac aaaacggtgg attaagagaa gcaacgccac catcttcaga atggtctcgc 60

ttcatatcca a 71

<210> 46
 <211> 53
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador GVR-QIAC3-up utilizado para la construcción del IAC quimérico

<400> 46
 aaaaaagctt tggtgattac cgacgaaaac gaaccgcaat ttaacaaaac acc 53

<210> 47
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 540 158 A1

<223> Cebador GVR-QIAC3-rp utilizado para la construcción del IAC
quimérico

<400> 47

aaaaggatcc atgcaacgcg aagaacctta cctaaaaaaaa caaacggtg gattaagag

59



②¹ N.º solicitud: 201331415

②² Fecha de presentación de la solicitud: 27.09.2013

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP 2020449 A1 (SIGMA ALIMENTOS SA DE CV) 04.02.2009, todo el documento. Citado en la solicitud	1-29
A	FUKUSHIMA H et al. "Duplex real-time SYBR green PCR assays for detection of 17 species of food- or waterborne pathogens in stools".Journal of Clinical Microbiology, (2003), Vol: 41, No: 11, Pags: 5134-5146, todo el documento. Citado en la solicitud	1-29
A	CN 101928773 A (INST OF HYGIENE AND ENVIRONMENTAL MEDICINE THE ACADEMY OF MILITARY MEDICAL SCIENCES INST OF HYGIENE AND ENVIRONMETNAL MEDICINE THE ACADEMY OF MILITARY MEDICAL SCIENCES) 29.12.2010, (resumen) WPI [bases de datos en línea] Derwent Publications LTD. [recuperado el 20.06.2014]. Recuperado de Epoque. Nº de acceso: 2011-B25666.	1-29

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
26.06.2014

Examinador
M. Hernández Cuéllar

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.06.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-29	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-29	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	EP 2020449 A1 (SIGMA ALIMENTOS SA DE CV)	04.02.2009
D02	FUKUSHIMA H et al. "Duplex real-time SYBR green PCR assays for detection of 17 species of food- or waterborne pathogens in stools".Journal of Clinical Microbiology, (2003), Vol: 41, No: 11, Pags: 5134-5146, todo el documento. Citado en la solicitud.	01.11.2003
D03	CN 101928773 A (INST OF HYGIENE AND ENVIRONMENTAL MEDICINE THE ACADEMY OF MILITARY MEDICAL SCIENCES INST OF HYGIENE AND ENVIRONMETNAL MEDICINE THE ACADEMY OF MILITARY MEDICAL SCIENCES)	29.12.2010

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención se relaciona con un método in vitro para la detección simultánea de *Campylobacter jejuni*, *Cronobacter sakazakii*, una cepa enterohemorrágica de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. en una muestra que comprende: a) Aislar el ADN de dicha muestra; b) Llevar a cabo una PCR multiplex sobre el ADN aislado en la etapa a) con un conjunto de parejas de cebadores diseñados a tal efecto; y c) Detectar los productos de amplificación obtenidos en la etapa b). La invención también se relaciona con un conjunto de parejas de cebadores especialmente diseñado para poner en práctica dicho método in vitro, así como un kit que comprende el mencionado conjunto de parejas de cebadores.

El documento D01 describe un metodo para la deteccion ycuantificacion simultanea, multiple, de *Listeria* spp., *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y/o *E. coli* O157:H7, en una o mas muestras, mediante unareaccion de amplificacion multiplex usando una PCR a tiempo real (qRTi-PCR).

El documento D02 describe la deteccion de 8 de las 17 especies de patógenos alimentarios examinados mediante el empleo de qRTi- PCR.

El documento D03, se refiere al estado general de la técnica y describe un método para la detección de bacterias patógenas comunes mediante PCR cuantitativa fluorescente. El método permite identificar especies como *B.cereus*, *E.sakazakii*, *V.parahaemolyticus*, *E.coli*, *Salmonella*, *L.monocytogenes*, *Shigella*, *C.jejuni*, *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio vulnificus*, *Enterococcus*, *Proteus*, *Clostridium botulinum*, *Streptococcus*, and *Clostridium perfringens* en muestras clínicas, agua, alimentos etc.

1.- NOVEDAD

A la vista de los documentos citados las reivindicaciones 1-29 parecen nuevas y por tanto cumplen el requisito del Art. 6.1 LP 11/1986.

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA

Los documentos D01-D02 establecen el estado de la técnica más próximo a la invención.

La diferencia con respecto al de la técnica más próximo reside en el hecho de que en la invención tiene como diana organismos ligeramente diferentes para cuya identificación se requieren cebadores con distintas secuencias y especificidades.

El problema técnico subyacente sería por tanto la provisión de una metodología PCR multiplex a tiempo real para las especies *Campylobacter jejuni*, *Cronobacter sakazakii*, una cepa enterohemorrágica de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, un microorganismo de la familia *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

La solución para dicho problema sería la provisión de los cebadores y sondas específicas correspondientes a las SEQ .ID. NOs 1-41.

En opinión de esta Oficina, las reivindicaciones 1-29 cumplen el requisito de actividad inventiva del Art. 8.1 LP 11/1986, puesto que a partir de los documentos D01-D02 tomados solos o en combinación el experto en la materia no deduciría de forma obvia el diseño y composición de los cebadores utilizados en el método reivindicado.