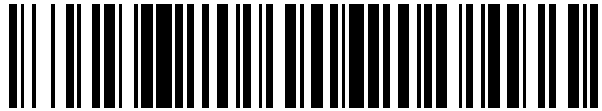


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 172**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2011 E 11719888 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015 EP 2553120**

54 Título: **Sonda de ácido nucleico peptídico, estuche y método para la detección y/o cuantificación de Salmonella spp. y sus aplicaciones**

30 Prioridad:

29.03.2010 PT 10005029

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

17.08.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DO MINHO (100.0%)
Largo Do Paço
4700-320 Braga, PT**

72 Inventor/es:

**RIBEIRO PINTO DE OLIVEIRA AZEVEDO, NUNO
FILIPE;
LOPES DA COSTA VIEIRA, MARIA JOÃO;
FERNANDES ALMEIDA, CARINA MANUELA y
KEEVIL, CHARLES WILLIAM**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 543 172 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sonda de ácido nucleico peptídico, estuche y método para la detección y/o cuantificación de *Salmonella* spp. y sus aplicaciones.

Campo de la invención

- 5 Esta invención se refiere a un procedimiento para la detección de microorganismos importante para la seguridad clínica y alimentaria. Con este propósito, se desarrolló una sonda de PNA para la detección del género *Salmonella*.

Además de la sonda, la presente invención incluye el procedimiento de FISH de PNA y su aplicación a un estuche para la detección y/o la cuantificación de *Salmonella* spp., que se puede usar en los campos alimentario y clínico.

Antecedentes de la invención

- 10 El género *Salmonella* incluye varias bacterias patógenas que pueden provocar enfermedades que varían de una simple gastroenteritis a infecciones sistémicas. La gravedad de la enfermedad generalmente está determinada por la virulencia de la especie/cepa de *Salmonella*, el huésped (ser humano u otra especie de animal) y el estado de salud del huésped.

- 15 Los análisis filogenéticos del género han mostrado que se divide en dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*. Sin embargo, se han identificado hasta la fecha más de 2.500 serotipos, la mayoría de los cuales capaces de infectar a seres humanos y una amplia gama de especies de animales. Las cepas de *Salmonella* se identifican y clasifican convencionalmente según el esquema de serotipaje de Kauffmann-White, que se basa en el tipo de antígenos que están presentes en la membrana exteARN.

- 20 Esta bacteria se puede transmitir directamente de persona a persona a través de la ruta fecal-bucal o mediante contacto directo con reservorios externos cuando se produce contaminación fecal de suelo, agua y alimentos. Por lo tanto, es importante desarrollar un método de detección consistente que permita la identificación de la bacteria en todos estos tipos de muestra. Por ejemplo, la "Food and drug Administration" trata de combatir la transmisión de *Salmonella enteritidis* a través de la puesta en práctica de un programa de prueba en granjas avícolas para cáscaras de huevo contaminadas, puesto que las cáscaras de huevo se han identificado como importantes en la transmisión del microorganismo.

- 25 La detección de *Salmonella* se realiza tradicionalmente usando métodos de cultivo. Sin embargo, estos métodos son procedimientos laboriosos y que consumen bastante tiempo (de 4 a 6 días) y trabajo. Como tales, se necesita el desarrollo de nuevos métodos, que sean más rápidos y más fiables, que puedan ayudar en el control de las bacterias a fin de reducir la salmonelosis tanto en personas como en animales. Con este propósito, se ha desarrollado un número de métodos de detección molecular para reducir el tiempo requerido para la identificación de *Salmonella* en alimentos, heces, agua y muestras clínicas. Estos métodos incluyen ensayos inmunoenzimáticos (ELISA), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y FISH. Sin embargo, algunos estudios mostraban que los métodos basados en PCR y ELISA no detectaban algunas muestras que eran positivas mediante un método de cultivo. Aún así, los métodos basados en PCR han resultado ser más exactos que los métodos basados en ELISA.
- 30 Por otra parte, cuando se realiza una etapa de enriquecimiento selectivo antes de la PCR, no solo se detectan todas las muestras positivas al cultivo, sino que también la presencia de *Salmonella* que no se detectaba mediante el método de cultivo se puede detectar mediante PCR. Estos estudios revelan que la etapa de enriquecimiento puede incrementar la sensibilidad del ensayo molecular eliminando problemas tales como los bajos números de bacterias y la presencia de sustancias inhibitoras en ciertos tipos de muestras, tales como muestras alimentarias y fecales. Sin embargo, los métodos basados en PCR requieren habitualmente una etapa de extracción de ADN, y ninguno de los métodos mencionados anteriormente, excepto FISH, permite una visualización directa de la bacteria dentro de la muestra. Esto puede ser importante, por ejemplo, al permitir la evaluación de contaminación por *Salmonella* en cáscaras de huevo directamente en la muestra.

- 35 FISH es un ensayo molecular ampliamente aplicado para la identificación y localización bacterianas dentro de muestras. Este método se basa en la unión específica de pequeños oligonucleótidos (sondas) a regiones de rARN particulares. La sonda se acopla a un fluorocromo y después de la hibridación se puede detectar una señal de fluorescencia debido al alto número de copias de rARN dentro de la célula. Ya existen algunos estudios que presentan la detección de *Salmonella* usando sondas de ADN (Kutter y cols., 2006; Nordentoft y cols., 1997).

- 40 Más recientemente, se han desarrollado sondas de ácido nucleico peptídico (PNA) para la detección microbiana. Estas moléculas son miméticas del ADN y son capaces de hibridarse específicamente con ácidos nucleicos complementarios obedeciendo a las reglas de Watson-Crick. Sin embargo, el enlace establecido es más fuerte ya que, en la molécula de PNA, su estructura de esqueleto de fosfato de azúcar cargada negativamente se sustituye por unidades de (2-aminoetil)glicina neutras repetidas. El uso adecuado de esta molécula en la tecnología FISH ha

hecho al procedimiento más consistente, más rápido y más eficaz.

Para la *Salmonella*, previamente se ha desarrollado un método de FISH de PNA (Perry-O'Keefe y cols., 2001). Sin embargo, la sonda que se usaba tiene una secuencia que es complementaria con otras especies, tales como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Buchnera aphidicola*, *Haemophilus influenza* y *Yersinia* spp., haciéndola menos atractiva para el diagnóstico. Así, se consideraba importante diseñar y probar una nueva sonda y desarrollar un nuevo método para este microorganismo particular.

Es importante apuntar que, aunque muy consistentes después de optimizados, el desarrollo de métodos de FISH de PNA es, igual que el desarrollo de métodos de PCR, extremadamente exigente y requiere un gran conocimiento de las características químicas y físicas de los diferentes parámetros implicados. Por otra parte, se sabe bien que tener un método de FISH de PNA que trabaje para un organismo no garantiza que funcionen otras secuencias que tienen como diana el mismo organismo. Además, aunque los investigadores habitualmente sienten una natural falta de interés por la publicación de resultados negativos, se pueden encontrar en la bibliografía varios estudios en los que los autores solo eran capaces de hacer trabajar algunas de las sondas para el mismo microorganismo.

Compendio de la Invención

La presente invención se refiere a una sonda de ácido nucleico peptídico (PNA) y a un método de la misma para la detección del género *Salmonella* (esto es, identificación o cuantificación).

La sonda descrita en la presente invención reconoce el rARN del microorganismo 23S o las secuencias genómicas correspondientes al mencionado rARN. Las sondas de PNA tienen características fisicoquímicas que son inherentes a su estructura y, cuando se aplican a un método basado en FISH, permiten un análisis más rápido, más consistente y más específico que usando ADN.

Una de las ventajas de este método es que la sonda trabaja consistentemente en una amplia variedad de muestras biológicas, lo que habitualmente no sucede con otros métodos moleculares de detección.

Otro aspecto importante es el tiempo requerido para la detección. El método desarrollado en la presente se ajusta a los mejores tiempos presentados para los restantes métodos moleculares, aún cuando el tipo de muestra requiera una etapa de enriquecimiento antes del análisis. La rapidez y la fiabilidad del método pueden determinar el tratamiento apropiado y oportuno de una contaminación y/o infección desde perspectivas tanto clínica como de seguridad alimentaria.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al desarrollo de un estuche basado en la aplicación de esta sonda a la hibridación in situ con fluorescencia (FISH), permitiendo la detección de *Salmonella* en una amplia gama de muestras biológicas, de un modo inmediato y simple.

En una realización preferida de la presente invención, la sonda de PNA descrita en la presente permite la detección de la secuencia diana en rARN, en rADN o en secuencias complementarias del rARN de *Salmonella*.

En una realización más preferible de la presente invención, las secuencias previamente descritas están conectadas a al menos un tipo de fracción detectable. El tipo de fracción detectable que se va a usar se puede seleccionar de uno de los siguientes grupos: un conjugado, un sistema de detección ramificado, un cromóforo, un fluoróforo, un radioisótopo, una enzima, un hapteno o un compuesto luminiscente, entre otros.

En una realización más preferible, el grupo fluoróforo puede ser al menos uno de los siguientes: fluoróforos de la serie Alexa, cianinas, 5- (y 6)-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína, 5-ROX (5-carboxi-X-rodamina, sal de trietilamonio), entre otros.

Además, la materia de la presente invención es un estuche para la detección de la presencia o ausencia y/o la cuantificación de *Salmonella* en muestras biológicas.

En una realización más preferible de la presente invención, el estuche puede presentar adicionalmente al menos una de las siguientes soluciones: una solución de fijación, una solución de hibridación y una solución de lavado.

En otra realización preferida más de la presente invención, la solución de fijación puede comprender paraformaldehído y etanol, a saber 2-8% (peso/vol.) de paraformaldehído y 25-90% (vol./vol.) de etanol y/o la solución de hibridación puede comprender formamida.

Además, el objetivo de la presente invención es la descripción de un método para la detección de *Salmonella* o para la detección de *Salmonella* en muestras biológicas, que usa la sonda de PNA mencionada previamente y que

comprende las siguientes etapas:

- contacto de la sonda de PNA con muestras biológicas;

- hibridación de la sonda de PNA con la secuencia diana de los microorganismos presentes dentro de las muestras biológicas;

5 - detección de la hibridación como una indicación de la detección y cuantificación mencionadas en las muestras biológicas, la hibridación se puede llevar a cabo preferiblemente mediante fluorescencia.

Las muestras biológicas se pueden tomar de sangre, aire, alimentos, agua, biopsias o heces, entre otros.

Además, el objetivo de la presente invención es el uso de las sondas de PNA descritas previamente, el uso del estuche descrito previamente y la metodología que se va a aplicar en una metodología de detección de *Salmonella*, o la detección de *Salmonella* en muestras biológicas.

Descripción general de la invención

La presente invención comprende la sonda de PNA, reactivos, métodos y un estuche destinados a la detección o cuantificación de cepas de *Salmonella*.

15 La sonda de PNA descrita con la presente permite la detección específica del género *Salmonella* a través de la unión a rARN, secuencias genómicas correspondientes a rARN (r), o sus secuencias complementarias.

La especificidad superior de las sondas de PNA (en relación con las sondas de ADN) permite una mejor discriminación entre secuencias de nucleótidos relacionadas.

20 Esto tiene particular importancia para esta sonda debido a que existen algunos microorganismos filogenéticamente relacionados con *Salmonella* que presentan solo una discrepancia (nucleótido en la posición 14 de la sonda descrita en esta invención) dentro de la región diana seleccionada. Algunos ejemplos de esta situación son las especies de *Shigella*, la especie *Yersinia enterocolitica* y la cepa *Escherichia coli* K12.

La sonda de PNA descrita en esta invención tiene 15 nucleótidos con la siguiente secuencia nucleotídica:

SEQ ID No. 1 - 5'-AGG AGC TTC GCT TGC-3'.

25 Esta sonda se aplica al análisis mediante hibridación in situ con fluorescencia (FISH), que, en el caso de muestras positivas a *Salmonella*, da como resultado la emisión de una señal fluorescente detectable bien a través de microscopía de fluorescencia o bien a través de citometría de flujo.

30 El desarrollo de la nueva sonda para FISH de PNA se llevó a cabo empíricamente usando un programa informático específico. La selección de la secuencia de la sonda se realizó inicialmente alineando secuencias de rADN del microorganismo diana con secuencias de microorganismos relacionados. Esto permitía la identificación de regiones potencialmente útiles, que a continuación se evaluarán basándose en otros parámetros tales como la especificidad, la temperatura de hibridación, el porcentaje de guanina/citosina, la energía libre de enlace y la estructura secundaria.

35 Después del diseño y la síntesis de la sonda, las tres etapas del procedimiento de FISH, fijación/permeabilización, hibridación y lavado, se tienen que desarrollar y optimizar para la sonda seleccionada. Este procedimiento implica habitualmente los siguientes parámetros: temperatura, concentración de formamida y etanol, y tiempos de hibridación y lavado. Es importante apuntar que debido a la complejidad del procedimiento y el gran número de variables, no siempre es posible desarrollar un método para cada secuencia y, como tal, a menudo se prueban varias alternativas y secuencias.

40 Una hibridación bien conseguida permite posteriormente inferir acerca de la presencia/ausencia e incluso la concentración de un microorganismo mediante microscopía de fluorescencia, citometría de flujo o PCR en tiempo real. La señal fluorescente detectada generalmente es el resultado de la unión específica de las sondas pequeñas a decenas o cientos de copias de rARN presentes en el citoplasma de las bacterias. Esa fracción detectable de la sonda, que presenta la existencia de un complejo estable formado por la sonda y la diana, se selecciona de uno de los siguientes grupos: un conjugado, un sistema de detección ramificado, un cromóforo, un fluoróforo, un radioisótopo, una enzima, un hapteno o un compuesto luminiscente.

45 El método descrito en la presente invención comprende el contacto de una muestra con al menos una sonda de PNA con una secuencia similar a la descrita previamente. Por consiguiente, el análisis se basa en una sola prueba con un

resultado definitivo en oposición a los métodos convencionales para la detección de *Salmonella* que se basan en las características fenotípicas y requieren varios días para obtener el resultado.

Además, el objetivo de la presente invención es un estuche adecuado para llevar a cabo la prueba para detectar, es decir, encontrar, identificar o medir las muestras biológicas que presentan *Salmonella*. El estuche comprende la sonda de PNA y otros reactivos o compuestos seleccionados necesarios para realizar pruebas de hibridación in situ.

En una realización más preferible, el estuche adecuado para realizar el ensayo para la detección, identificación o cuantificación de *Salmonella* comprende adicionalmente una solución de fijación, hibridación y lavado.

Preferiblemente, el método pretende ser un adyuvante de diagnóstico para una decisión terapéutica y un control de calidad. Así, la puesta en práctica de este método para la identificación de *Salmonella* permitirá el tratamiento clínico adecuado para la bacteria y la identificación temprana de la fuente de contaminación.

Las sondas de PNA se pueden aplicar directamente sobre la muestra preparada sobre un portaobjetos, ya que la aplicación de estas sondas no implica el uso de reactivos o enzimas para la permeabilización de las membranas celulares antes de la hibridación. Sin embargo, se requieren algunos de los compuestos que se usan frecuentemente en la hibridación.

Por lo tanto, las sondas normalmente se incluyen en estuches más fáciles de usar.

Si el enfoque deseado implica en análisis por FISH de PNA mediante citometría de flujo, la sonda se podría aplicar a la muestra en suspensión, usando los mismos compuestos de hibridación.

Descripción detallada de la invención

I-Definiciones

a) Según se usa en la presente, el término "nucleótido" incluye moléculas naturales y artificiales conocidas generalmente por los que usan tecnología relacionada con ácidos nucleicos, para generar de ese modo polímeros que se unen específicamente a ácidos nucleicos;

b) Cuando se usa el término "secuencia de nucleótidos" es lo mismo que hacer referencia a un segmento de un polímero que contiene subunidades, en este caso los nucleótidos;

c) El término "secuencia diana" se refiere a una secuencia de nucleótidos de *Salmonella* que se pretende que sea detectada en la prueba, donde la porción de nucleótidos de la sonda está diseñada para hibridarse;

d) El término "sonda de PNA" se refiere a un polímero de subunidades de PNA que tiene una secuencia de nucleótidos que es específica para hibridarse con una secuencia diana del microorganismo de interés. Las moléculas de PNA son miméticos de ADN en los que la estructura de esqueleto de fosfato de azúcar cargada negativamente se reemplaza por una quiral y eléctricamente neutra formada por unidades de N-(2-aminoetil)glicina repetidas;

e) Cuando se usa el término "fracción detectable", se refiere a moléculas que se pueden conectar a la sonda, para de ese modo hacer a la sonda detectable por un instrumento o método;

f) El término "muestra" se refiere a cualquier muestra biológica que pueda contener el microorganismo o secuencia diana para la detección. Las muestras podrían ser clínicas (p. ej. sangre, orina, heces, etc.), alimentarias (p. ej. carne, huevos, leches de inicio, leche, etc.) o ambientales (p. ej. agua).

II – Breve Descripción de los Dibujos

La Figura 1 presenta el alineamiento parcial de las secuencias de rARN de 23S para la selección de la sonda. La secuencia complementaria de la sonda SalPNA1873 se muestra por encima del alineamiento y las posiciones polimórficas también están marcadas.

III – Descripción

Diseño de la sonda de PNA:

Para identificar oligonucleótidos potencialmente útiles para usar como sonda, se eligieron diecisiete secuencias génicas de rARN de 23S disponibles en el ciber sitio de the National Centre for Biotechnology Information (NCBI)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Esta selección contenía diez secuencias de *Salmonella*, incluyendo cepas representativas de cada una de las diez subespecies, y otras siete cepas procedentes de especies relacionadas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* (Figura 1). Las secuencias se alinearon usando el programa informático ClustalW disponible en the European Bioinformatics Institute (EBI) y se seleccionaron regiones de interés. Se identificaron seis regiones potencialmente útiles en lo que posteriormente se probó en NCBI (programa informático BLAST) y en el proyecto de bases de datos de rARN de SILVA (programa informático Probe Check), a fin de encontrar la sonda con el número más alto de secuencias de *Salmonella* detectadas y el número más bajo de secuencias que no son de *Salmonella* detectadas. También se usaron otros criterios para la selección de la sonda tales como: alto porcentaje de guanina/citosina; el tipo de estructuras secundarias y la temperatura de hibridación.

Solo había una región de 18 pb apareados capaz de detectar todas las cepas de *Salmonella* en la base de datos de NCBI. Para esta región, se diseñaron cuatro posibles sondas. Una de estas se seleccionó debido a que no se hibridaba con ninguna secuencia que no fuera de *Salmonella* y contenía 60% de bases de GC. Según los criterios de selección mencionados, la secuencia elegida era: 5'-AGGAGCTTCGCTTGC-3'. Esta secuencia se hibrida entre las posiciones 1873 y 1887 del rARN de 23S de la cepa *S. enterica* subesp. *enterica* serovar Typhimurium LT2 (ATCC 43971), número de registro U77920. La sonda se denominaba SalPNA1873 debido a la posición inicial de la secuencia diana en la cepa LT2. Posteriormente, se sintetizó la secuencia elegida y los oligonucleótidos se enlazaron, en el extremo N, al fluorocromo Alexa Fluor594.

Evaluación teórica del comportamiento de la sonda de PNA:

Después del diseño de la sonda, se evaluó su comportamiento determinando los valores teóricos para la sensibilidad y la especificidad. Estos parámetros se evaluaron con el susodicho programa informático ProbeCheck disponible en las bases de datos SILVA de rARN. Para esta estimación teórica, se consideraban las 101 secuencias de *Salmonella* de las bases de datos (incluyendo solamente las secuencias de buena calidad con al menos 1.900 pb). La sonda se alineó con un total de 11.124 secuencias presentes en la base de datos para la subunidad de ARN grande (LSU, 23S/28S). También se probó frente a la base de datos para la subunidad pequeña (SSU, 16S/18S) para determinar la existencia de posible hibridación cruzada con las secuencias de rARN de 16S. La especificidad se calculó como $nSs/(TnS) \times 100$, donde nSs indica el número de cepas que no son de *Salmonella* que no reaccionaban con la sonda y TnS es el número total de cepas que no son de *Salmonella* examinadas. La sensibilidad se calculó como $Ss/(TSs) \times 100$, donde Ss indica el número de cepas de *Salmonella* detectadas por la sonda y TSs es el número total de cepas de *Salmonella* presentes en la base de datos.

La búsqueda confirmaba que la sonda SalPNA1873 solo detectaba las 101 secuencias de *Salmonella* spp. que existían en la base de datos. Por lo tanto, se obtuvieron una especificidad y sensibilidad teóricas de 100% (Tabla 1). A fin de comparar la sonda desarrollada en este estudio con sondas desarrolladas previamente, se probaron la especificidad y la sensibilidad teóricas de las sondas:

- Sal23S10 (Perry-O'Keefe y cols., 2001) - SEQ ID No. 6;

- Salm63 (Kutter y cols., 2006) - SEQ ID No. 7;

- Sal3 (Nordentoft y cols., 1997) - SEQ ID No. 8

también se determinaron con el programa informático ProbeCheck (Tabla 1).

La determinación teórica de estas secuencias mostraba que las sondas Seq. ID N° 6, Seq. ID N° 7 y Seq. ID N° 8 detectaban 95, 73 y 96 secuencias de *Salmonella*, respectivamente, de las 101 cepas existentes en la base de datos, que corresponden a valores de sensibilidad de 94%, 72% y 95%. En cuanto al número de secuencias que no son de *Salmonella* detectadas, la Seq ID No. 1 y la Seq. ID No. 8 no detectaban ninguna secuencia, a diferencia de Seq. ID No. 6 y Seq. ID No. 7. Estos valores permitían estimar especificidades de 100% (Seq ID No. 1 y Seq. ID No. 8), 98,13% (Seq ID No. 6) y 99,97% (Seq ID No.7).

La evaluación teórica realizada mostraba que la sonda SalPNA1873 mejora la detección de *Salmonella* principalmente debido a dos aspectos: las ventajas de la molécula de PNA y los valores de especificidad y sensibilidad de la sonda descrita en este documento. La molécula de PNA hace más fácil y más rápido el procedimiento de FISH en comparación con el procedimiento de FISH con ADN para las sondas sal3 y Salm63, mientras que ninguna de las sondas de PNA existentes supera los valores teóricos de especificidad y sensibilidad obtenidos para la sonda SalPNA1873.

50

Tabla 1 – Especificidades y sensibilidades teóricas de las sondas existentes para la detección de *Salmonella* spp.

Sonda	Sal3 SEQ No.8	Salm63 SEQ No.7	Sal23S10 SEQ No.6	SalPNA1873 SEQ No. 1
Tipo	ADN	ADN	PNA	PNA
Secuencia (5'-3')	AATCACTTCACCTAC GTG	TCGACTGACTTCAGCT CC	TAAGCCGGGATG GC	AGGAGCTTCGCTT GC
Nº de cepas de <i>Salmonella</i> detectadas	96*	73*	95*	101*
Nº of non- <i>Salmonella</i> detectadas	0#	3#	206#	0#
Especificidad (%)	100	99,97	98,13	100
Sensibilidad (%)	95,05	72,23	94,06	100
Referencia	Nordentoft y cols., 1997	Kutter y cols., 2006	O' Keefe y cols., 2001	Este trabajo
* Cepas de <i>Salmonella</i> detectadas en un total de 101 secuencias de <i>Salmonella</i> presentes en la base de datos.				
# Cepas que no son de <i>Salmonella</i> detectadas en un total de 11.023 secuencias que no son de <i>Salmonella</i> depositadas en la base de datos.				

5 La sonda de PNA de esta invención comprende preferiblemente 15 nucleótidos y es idéntica a la secuencia SEQ ID No. 1 - 5'- AGG AGC TTC GCT TGC-3'.

AlteARNtivamente, esta invención también contempla variaciones de las secuencias de nucleótidos de las sondas.

Fracción detectable de la sonda de PNA:

10 No limitada a los siguientes ejemplos, la fracción detectable de sonda de PNA puede incluir diversos tipos de moléculas tales como conjugados de dextrano, cromóforos, fluoróforos, radioisótopos, enzimas, haptenos, un compuesto quimioluminiscente, entre otras.

Como un ejemplo, entre la clase de fluoróforos, los que son preferibles para usar son (pero no se limitan a): fluoróforos de la serie Alexa, la serie Alexa Fluor, cianinas, 5- (y 6)-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína, 5-ROX (5-carboxi-X-rodamina, sal de trietilamonio).

Método:

15 La presente invención presenta un método para determinar la presencia de *Salmonella* usando una secuencia de nucleótidos con al menos 86% de homología con la región de 15 nucleótidos descrita en la presente - SEQ ID No. 1.

El método puede incluir el contacto de una muestra con una sonda de PNA descrita en la presente con la secuencia diana de la bacteria en condiciones de hibridación apropiadas o condiciones de hibridación in situ apropiadas (según se muestra en el EJEMPLO 1).

20 El método se puede dividir en: preparación de muestra (que incluye la etapa de enriquecimiento, cuando fuera necesaria), fijación, hibridación, lavado y visualización de los resultados (véase el EJEMPLO 1).

El método se puede realizar sobre células adheridas o suspendidas.

Condiciones de hibridación - Optimización:

Las siguientes etapas son una posible optimización de las condiciones de hibridación, sin ser una limitación de esta invención:

- 5 Hay varios factores que influyen en la hibridación de la sonda de PNA y la secuencia diana. Estos incluyen el porcentaje de formamida (u otro reactivo químico desnaturizante), la concentración de sal y por consiguiente la fuerza iónica, la temperatura de hibridación, la concentración de detergente, el pH y otros.

10 Para determinar las condiciones de hibridación óptimas, puede ser necesario fijar los diferentes factores y cambiar cada factor individualmente hasta que se alcance un grado discriminatorio deseable. Cuanto más cerca esté una secuencia diana de otra no diana en la muestra, mayor será el grado de restricción necesario para definir los diversos factores que influyen en la hibridación. En esta invención, secuencias no diana, tales como la especie *Shigella*, pueden tener sólo un nucleótido diferente en comparación con las secuencias diana, y como tal es necesario un nivel incrementado de discriminación para evitar hibridaciones no específicas.

Para las sondas descritas en este documento, se detectaron las siguientes condiciones:

- 15 - Temperaturas de hibridación entre 53°C y 59°C. La señal fluorescente más fuerte se obtenía a 57°C, tanto para la hibridación en portaobjetos como para la hibridación en suspensión.

- Etapa de fijación usando concentraciones de etanol que variaban entre 50% y 80%, pero no se observaron diferencias en la intensidad de señal.

- 20 - Se probó el tiempo de hibridación (30, 45, 60 y 90 min.) pero los tiempos más cortos eran tan eficaces como los más largos.

Después de la optimización de todos los parámetros mencionados anteriormente, el procedimiento que se encontró que daba como resultado una señal fluorescente más fuerte era como sigue:

Se prepararon citologías de cada cultivo bacteriano en portaobjetos apropiados para la observación por microscopía de fluorescencia. Entonces, las citologías:

- 25 - Se sumergieron en paraformaldehído (Sigma) al 4% (peso/vol.) durante 10 minutos, seguido por etanol al 50% (vol./vol.), también durante 10 minutos;

30 - Las muestras se secaron al aire y a continuación se cubrieron con 20 ml de solución de hibridación que contenía: 10% (peso/volumen) de sulfato de dextrano (Sigma); NaCl (Sigma) 10 mM; 30% (vol./vol.) de formamida (Sigma); 0,1% (peso/vol.) de pirofosfato sódico (Sigma); 0,2% (peso/vol.) de polivinilpirrolidona (Sigma); 0,2% (peso/vol.) de Ficoll (Sigma); EDTA disódico (Sigma) 5 mM; 0,1% (vol./vol.) de Triton X-100 (Sigma); Tris-HCl 50 mM (pH 7,5; Sigma) y 200 nM de sonda de PNA;

- Las muestras se cubrieron con cubreobjetos situados en pequeñas cajas húmedas protegidas de la luz y se incubaron durante 30 minutos a 57°C;

- 35 - Posteriormente, los cubreobjetos se retiraron y los portaobjetos se sumergieron en una solución de lavado precalentada (57°C) que contenía Tris Base (Sigma) 5 mM, NaCl (Sigma) 15 mM y 1% (vol./vol.) de Triton X-100 (pH 10; Sigma).

- La etapa de lavado también se llevó a cabo durante 30 minutos a 57°C. Posteriormente, los portaobjetos se retiraron de la solución de lavado y se secaron a 57°C en la misma incubadora durante aproximadamente 5 minutos.

- 40 - Antes de la observación al microscopio, una gota de aceite de inmersión no fluorescente (Merck) se puso y se cubrió con un cubreobjetos. Los portaobjetos se almacenaron en la oscuridad durante un máximo de 24 horas antes de la microscopía.

45 La hibridación también se puede realizar en suspensión. En algunos casos este procedimiento ayuda eliminando casi totalmente la autofluorescencia, a saber la autofluorescencia de los eritrocitos, en el caso de muestras de sangre, y la autofluorescencia de proteínas en leches de inicio. En este caso, el cultivo homogeneizado en agua estéril se centrifuga (10.000 x g durante 5 minutos) y la pella se homogeneiza en 500 µl de paraformaldehído al 4%. Después de 1 hora, las células se centrifugan una vez más, a fin de retirar el paraformaldehído, y la pella se

homogeneiza en 500 µl de etanol al 50% (vol./vol.). Después de 30 min. de incubación a -20°C, las células se homogeneizan una vez más en 100 µl de solución de hibridación con sonda de PNA 200 nM y se incuban a 57°C durante 30 min. Después de la hibridación, las células se centrifugaron y se homogeneizaron en 500 µl de solución de lavado (según se describe anteriormente) y se incubaron a 57°C durante 30 min. Finalmente, las células se centrifugan para retirar la solución de lavado y se homogeneizan en 500 µl de agua estéril. A continuación, 20 µl de suspensión de células se extienden sobre portaobjetos de microscopio adecuados para fluorescencia o 200 µl se filtran a través de una membrana (tamaño de poro 0,2 µm, nitrato de celulosa, Whatman).

A fin de verificar que la señal que se obtenía no estaba relacionada con la autofluorescencia, todas las muestras se observaron con los otros filtros disponibles en el microscopio. Las muestras también se tiñeron simultáneamente con DAPI para confirmar que todas las células presentes en la muestra estaban marcadas con la sonda SalPNA1873 - SEQ ID No. 1 (descrita en la presente invención). Además, se realizó un control negativo en cada ensayo, siguiendo todas las etapas del procedimiento pero sin la adición de sonda a la solución de hibridación.

Prueba de la especificidad y la sensibilidad experimentales de la sonda.

Una vez que el método de hibridación estaba totalmente optimizado, se probaron los valores experimentales de especificidad y sensibilidad de la sonda de PNA.

Para esto, el procedimiento se aplicó a 61 cepas de *Salmonella* representativas (pertenecientes a las dos especies de *Salmonella* y a las seis subespecies de *S. enterica*) y a otras 46 cepas. Las últimas cepas incluían 25 cepas taxonómicamente relacionadas pertenecientes a la misma familia (*Shigella*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Pantoea*, *Yersinia*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Serratia*) y 21 cepas pertenecientes a diferentes órdenes (*Pseudomonas*), clases (*Helicobacter* y *Campylobacter*) o incluso tipo (*Listeria* y *Staphylococcus*). Aparte de *S. enterica* subesp. VI que no era detectada por SalPNA1873 - SEQ ID no. 1, las 59 cepas de *Salmonella* restantes se detectaban, mientras que no se observaba hibridación para las otras especies usadas. No era posible determinar el resultado de FISH de PNA para tres especies de *Shigella*, debido a la fuerte señal de autofluorescencia de estas cepas detectada en muestras tanto positivas como negativas (sin sonda). Este resultado no está relacionado con la diferencia de solo un nucleótido entre la sonda y la especie de *Shigella* debido a que *Shigella flexneri*, que tiene una secuencia de ARN similar, no se hibridaba con la sonda. Por otra parte, otras especies tales como *Y. enterocolitica* y *Escherichia coli* K-12 también tienen solo una discrepancia exactamente en la misma posición, y no se observaba reacción cruzada. Este resultado apoya la observación de otros autores que indican que las sondas de PNA permiten distinguir secuencias con discrepancia de un solo nucleótido (Petersen y cols., 2004). Basándose en estos resultados, se obtenían una especificidad experimental de 100% y una sensibilidad de 96,7%.

Enriquecimiento:

Las muestras que se van a analizar se pueden obtener de alimentos, biopsias, sangre, agua, heces, entre otros. Las muestras que contienen *Salmonella* presentan habitualmente bajos niveles de contaminación. Debido a esto, se recomienda una etapa de enriquecimiento que facilite el procedimiento de detección. Esta etapa de enriquecimiento se puede realizar usando varios tipos de medio de cultivo, desde medios ricos complejos hasta medios selectivos para *Enterobacteriaceae* y/o *Salmonella*. La temperatura de incubación puede depender del medio de cultivo elegido y el tiempo de incubación recomendado debe ser de 8 a 24 horas.

La sonda de PNA descrita en esta invención se probó en cuatro tipos diferentes de muestras: agua, heces, leche de inicio y sangre. Las muestras se enriquecieron según el procedimiento comúnmente usado en el análisis de cada tipo de muestra. En el caso de las muestras de agua y fecal, la primera etapa de preenriquecimiento se realizó según lo recomendado por the International Organization for Standardization (ISO), usando agua peptonada tamponada (BPW) (de 16 a 18 horas). Después de este enriquecimiento, la sonda permitía la detección de *Salmonella* en todas las muestras probadas y los resultados eran coherentes con los obtenidos por los métodos de la ISO recomendados para estas muestras, ISO 6579:2002 (Detection of *Salmonella* in food and animal feed) e ISO 6340:1995 (Water quality - Detection and enumeration *Salmonella*), para muestras fecal y de agua, respectivamente.

En el caso de la leche de inicio, la última se disolvió en agua (1:10) y se incubó durante 8 horas a 37°C según se sugería previamente para la detección de *Enterobacter sakazakii* en el mismo tipo de muestras. En el caso de muestras de sangre, se realizó un enriquecimiento de 16-18 horas a 37°C en un medio comúnmente usado en cultivos de sangre (TSB – caldo de tripticasa-soja). Después del enriquecimiento, se realizó la detección de bacterias en portaobjetos o suspensión. Antes de la hibridación, las muestras se deben diluir 1 a 10 en agua estéril destilada, a fin de minimizar la interferencia de la autofluorescencia de algunos componentes (como por ejemplo las proteínas de la leche de inicio o los eritrocitos). Todas las muestras que contenían *Salmonella* eran positivas usando la sonda de PNA descrita en esta invención.

Estos experimentos han mostrado que el método de detección que usa esta sonda de PNA generalmente era capaz de detectar *Salmonella* en diferentes tipos de muestras en menos de 20 horas. Por otra parte, se observaba que las

muestras que contenían solo 1 CFU por ml se pueden detectar realizando una etapa de enriquecimiento de solo 8 horas. Aunque se ha probado el medio de enriquecimiento recomendado para cada tipo de muestra, es posible estandarizar la etapa de enriquecimiento. Varios autores han mostrado que el agua peptonada tamponada (BPW) se puede usar como un medio de cultivo universal para el enriquecimiento de muestras que contienen *Salmonella*, incluso para muestras con altos niveles de microorganismos competitivos.

La comparación de este método con los métodos convencionales usados o las muestras mencionadas anteriormente mostraban que la implantación de la muestra de PNA puede ahorrar al menos 3 días en la detección de bacterias del género *Salmonella*.

En el caso de muestras sólidas y compactas, estas se deben someter a un procedimiento mecánico de impacto con cuchillas planas, que desintegra la muestra, liberando las bacterias al agua peptonada tamponada. En el caso de biopsias, las muestras se cortan en rodajas de 3 a 5 µm, se ponen sobre portaobjetos y se hibridan directamente sin la necesidad de una etapa de enriquecimiento. La mayoría de los métodos para la detección de *Salmonella* se basan en técnicas de PCR o en medios de cultivo selectivos. Mientras que los primeros son técnicamente más exigentes y habitualmente también implican una etapa de enriquecimiento para mejorar el límite de detección, los últimos consumen mucho tiempo y pueden dar resultados inadecuados (12, 34, 38). El protocolo de FISH de PNA presentado en este trabajo es técnicamente menos exigente que los métodos de PCR y más rápido y más preciso que los métodos de cultivo. Aunque la etapa de enriquecimiento es necesaria, el tiempo total requerido para obtener el resultado es menor de 20 h (excepto para PIF, que lleva sólo 12 h), un valor similar a o incluso mejor que los presentados para métodos basados en PCR (9, 12, 35, 39). El método descrito en la presente demostraba ser una alteARNtiva fiable a las técnicas basadas en cultivo actualmente usadas, a las sondas de *Salmonella* existentes e incluso a procedimientos de PCR y ELISA. Se observaba que la sonda de PNA descrita en la presente: permite ahorrar 3 días en la detección en comparación con las técnicas de cultivo convencionales, presenta una especificidad superior que las sondas descritas previamente ya sean ADN o PNA (véase la Tabla 1) y no está afectada por la presencia de sustancias que actúan como inhibidores en algunos enfoques moleculares, a saber PCR.

Visualización de los resultados:

Esta etapa se puede realizar en cualquier microscopio de epifluorescencia con un filtro sensible a fluoróforo usado. Otros filtros presentes en el microscopio, que no son capaces de detectar la señal fluorescente de la sonda, se usaron para confirmar la ausencia de autofluorescencia.

Estuche:

La presente invención también se refiere a un estuche que permite probar la presencia de bacterias del género *Salmonella*.

El estuche de la presente invención comprende una sonda de PNA idéntica a SEQ ID No. 1 y otros reactivos o composiciones que se seleccionan para realizar la prueba.

Las sondas de PNA, sus características, los métodos y el estuche de esta invención son adecuados para el análisis de secuencias de ácidos nucleicos presentes, o no, inteARNmente en el organismo diana. Como tal, esta invención se puede usar para ambos, el análisis del organismo o el análisis de ácidos nucleicos extraídos o derivados del organismo de interés, implicando que la fuente de la secuencia diana no es una limitación para esta invención.

Los siguientes ejemplos ilustran diferentes situaciones y varias etapas para poner en práctica la invención, son realizaciones preferidas de la presente invención, sin pretender limitar ninguna de ellas:

EJEMPLO 1: Detección de bacterias pertenecientes al género *Salmonella* en diferentes muestras (muestras clínicas, alimentarias o ambientales)

Secuencia:

SEQ ID No. 1 - 5'-AGG AGC TTC GCT TGC-3 (acoplada a Alexa Fluor 594)

Preparación de la muestra:

Las muestras clínicas, alimentarias o ambientales se sometieron previamente a una etapa de enriquecimiento antes de la aplicación de la sonda de PNA. Esto sucede debido a que habitualmente la *Salmonella* presenta bajos niveles de contaminación. Esta etapa de enriquecimiento se puede realizar usando el medio recomendado para el método de análisis convencional usado para cada muestra. En el caso de un alimento, un pienso, heces o agua, se usaba BPW. Para leche en polvo o leches de inicio, se usó agua estéril para disolver el polvo en una relación 1/10

(peso/vol.). Para muestras de sangre, se usó el medio TSB complejo, comúnmente usado en cultivos de sangre.

Los tiempos de incubación variaban entre 8 (leche en polvo y leche de inicio) y 16-18 horas (heces, agua, sangre, etc.) a 37°C, a 120 rpm. Para el análisis simultáneo de diferentes tipos de muestra, se recomienda que el método usado se estandarice realizando un enriquecimiento en BPW durante 8 horas a 37°C, 120 rpm. En caso de resultados negativos después de 8 horas de incubación, el análisis por FISH de PNA se debe repetir después de un enriquecimiento nocturno (16-18 horas). Después de la etapa de enriquecimiento, una gota del medio de cultivo se puso en un portaobjetos adecuados para fluorescencia. El portaobjetos se puso durante aproximadamente 5 minutos en una horno incubador a 57°C o se dejó secar al aire. Las muestras que no requieren una etapa de enriquecimiento deben empezar el procedimiento en la etapa de fijación.

5 Fijación:

Para prevenir la pérdida de rARN de 23S durante el procedimiento de hibridación, las muestras se sumergieron en una solución de paraformaldehído al 4% (peso/vol.) y etanol al 50% (vol./vol.) durante 10 minutos cada uno.

Hibridación:

15 Después de la fijación, las muestras se cubrieron con una gota de solución de hibridación que contenía: 10% (peso/vol.) de sulfato de dextrano (Sigma); NaCl (Sigma) 10 mM; 30% (vol./vol.) de formamida (Sigma); 0,1% (peso/vol.) de pirofosfato sódico (Sigma); 0,2% (peso/vol.) de polivinilpirrolidona (Sigma); 0,2% (peso/vol.) de Ficol (Sigma); EDTA disódico (Sigma) 5 mM; 0,1% (vol./vol) de Triton X-100 (Sigma; Tris-HCl 50 mM (pH 7,5; Sigma) y sonda de PNA 200 nM. Las muestras se cubrieron con cubreobjetos (para asegurar una extensión homogénea de la sonda) colocados en pequeñas cajas húmedas (para evitar la evaporación de la solución de hibridación) protegidas de la luz y se incubaron durante 30 minutos a 57°C.

20

Lavado:

Después del tiempo de hibridación, las cubreobjetos se retiraron y los portaobjetos se sumergieron en una solución de lavado precalentada a 57°C que contenía Tris Base 5 mM, NaCl 15 mM y 1 % (vol./vol.) de Triton X-100 (pH 10). A continuación, las muestras se pusieron en un horno a la temperatura de hibridación durante 30 minutos. Posteriormente, los portaobjetos se retiraron de la solución de lavado y se secaron a 57°C, en la misma incubadora, durante aproximadamente 5 minutos. Antes de la visualización al microscopio, se puso una gota de aceite de inmersión no fluorescente (Merck) y se cubrió con un cubreobjetos. Los portaobjetos se mantuvieron en la oscuridad durante un máximo de 24 horas antes de la microscopía.

25

Resultados:

30 Los resultados se obtuvieron a través de la observación en un microscopio de fluorescencia con un filtro capaz de detectar el fluorocromo Alexa Fluor 594 unido a la sonda de PNA.

EJEMPLO 2: Detección de bacterias de los géneros *Salmonella* y *Cronobacter* en leches de inicio.

Este ejemplo ilustra la posibilidad de usar la sonda para *Salmonella* spp. junto con la sonda para *Cronobacter* spp. previamente desarrollada de Almeida y cols., 2009. Estos dos géneros fueron identificados recientemente como los contaminantes más frecuentes de las leches de inicio en polvo, contaminación que es una causa importante de bacteremia, meningitis y enterocolitis necrotizante en recién nacidos. Estas dos sondas presentan temperaturas de hibridación muy similares y se pueden usar fácilmente en un ensayo múltiple (utilización simultánea de varias sondas).

35

Secuencias:

40 SEG ID No. 1 - 5'-AGG AGC TTC GCT TGC-3' (acoplada a Alexa Fluor 594)

SEG ID No. 6 - 5'-TGC AGG ATT CTC TGG-3' (acoplada a Alexa Fluor 488)

Preparación de las muestras:

10 g de cada leche de inicio se pesaron y se hidrataron con 90 ml de agua estéril. Se pueden usar cantidades superiores de leche de inicio, pero manteniendo la relación 1/10 (peso/vol.). Posteriormente, las muestras hidratadas se incubaron durante 8 horas a 37°C y 120 rpm. Después del enriquecimiento, las muestras se recogieron y se diluyeron 1/10 para minimizar la interferencia de la autofluorescencia procedente de proteínas de la leche de inicio. Finalmente, una gota de la muestra diluida se puso en un portaobjetos adecuado y se secó al aire en una

45

incubadora a 57°C durante aproximadamente 5 minutos.

Hibridación:

5 La hibridación se realizó como se describe previamente en el Ejemplo 1 con una ligera diferencia. La solución de hibridación contenía dos sondas: una sonda de PNA para detectar *Salmonella* y una sonda de PNA para detectar *Cronobacter*, cada una en una concentración de 200 nM.

Lavado:

El lavado se realizó según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

Resultados:

10 Los resultados se obtuvieron observando las muestras con un microscopio de fluorescencia equipado con filtros apropiados para detectar los fluorocromos Alexa Fluor 594 y 488 conectados a las sondas de PNA.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidade do Minho

<120> SONDAS DE ÁCIDO PÉPTIDO NUCLEICO, ESTOJO E MÉTODO PARA DETECTAR *SALMONELLA* E RESPECTIVAS APLICAÇÕES

15 <130> PAT 41490/10

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 15

20 <212> ADN

<213> *Salmonella*

<400> 1

aggagcttcg cttgc 15

<210> 2

25 <211> 15

<212> ADN

<213> *Salmonella*

<400> 2

tcaggagctt cgctt 15

30 <210> 3

<211> 15

<212> ADN

<213> *Salmonella*

<400> 3
ggagcttcgc ttgcg 15
<210> 4
<211> 17
5 <212> ADN
<213> *Salmonella*
<400> 4
tcaggagctt cgcttgc 17
<210> 5
10 <211> 15
<212> ADN
<213> *Salmonella*
<400> 5
aggagctccg cttgc 15
15 <210> 6
<211> 14
<212> ADN
<213> *Salmonella*
<400> 6
20 taagccggga tggc 14
<210> 7
<211> 18
<212> ADN
<213> *Salmonella*
25 <400> 7
tcgactgact tcagtcc 18
<210> 8
<211> 18
<212> ADN
30 <213> *Salmonella*
<400> 8

aatcacttca cctacgtg 18

Referencias:

- 5 - Almeida, C., N. F. Azevedo, C. Iversen, S. Fanning, C. W. Keevil y M. J. Vieira, 2009. Development and application of a novel peptide nucleic acid probe for the specific detection of Cronobacter genomospecies (*Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula. *Appl Environ Microbiol* 75:2925-30.
- Perry-O'Keefe, H., S. Rigby, K. Oliveira, D. Sorensen, H. Slender, J. Coull y J. J. Hyldig-Nielsen, 2001. Identification of indicator microorganisms using a standardized PNA FISH method. *JouARNI of Microbiological Methods* 47:281-292.
- 10 - Kutter, S., A. Hartmann y M. Schmid. 2006. Colonization of barley (*Hordeum vulgare*) with *Salmonella enterica* and *Listeria* spp. *Fems Microbiology Ecology* 56:262-271.
- Nordentoft, S., H. Christensen, and H. C. Wegener. 1997. Evaluation of a fluorescence-labelled oligonucleotide tide probe targeting 23S rARN for in situ detection of *Salmonella* serovars in paraffin-embedded tissue sections and their rapid identification in bacterial smears. *JouARNI of Clinical Microbiology* 35:2642-2648.
- 15 - WO 02/27036 A2 - Probes, probe sets, methods and kits pertaining for the detection, identification and/or enumeration of bacteria.

REIVINDICACIONES

1. Sonda de PNA para la detección y/o cuantificación de *Salmonella*, caracterizada por que comprende SEQ ID No. 1 - 5'-AGG AGC TTC GCT TGC-3'.
- 5 2. Sonda de PNA según la reivindicación 1, para detectar la secuencia diana en rARN, rADN o las secuencias complementarias a rARN de *Salmonella*.
3. Sonda de PNA según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizada por que está conectada a al menos un tipo de fracción detectable, seleccionada de uno de los siguientes grupos: un conjugado, un sistema de detección ramificado, un cromóforo, un fluoróforo, un radioisótopo, una enzima, un hapteno o un compuesto luminiscente.
- 10 4. Sonda de PNA según la reivindicación 3, en la que dicho grupo de fluoróforos es al menos uno de los siguientes: fluoróforos de la serie Alexa, la serie Alexa Fluor, cianinas, 5-(y 6)-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína, la 5-ROX (5-carboxi-X-rodamina, sal de trietilamonio).
5. Estuche para la detección de *Salmonella*, que comprende al menos una de las sondas de PNA descritas en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 15 6. Estuche según la reivindicación 5, que comprende además al menos una de las siguientes soluciones: una solución de fijación, una solución de hibridación y una solución de lavado.
7. Estuche según la reivindicación 6, en el que dicha solución de fijación comprende paraformaldehído y etanol, preferiblemente 2-8% (peso/volumen) de paraformaldehído y 25-90% (volumen/volumen) de etanol.
8. Estuche según la reivindicación 6, en el que dicha solución de hibridación comprende formamida.
- 20 9. Un método para la detección de *Salmonella*, caracterizado por que usa las sondas de PNA descritas en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y comprende las siguientes etapas:
 - contacto de la sonda de PNA con las muestras biológicas;
 - hibridación de la sonda de PNA con la secuencia diana de los microorganismos presentes en las muestras mencionadas;
- 25 - detección de la hibridación como una indicación de la detección y la cuantificación mencionadas de las muestras mencionadas;
- en donde la hibridación de la sonda de PNA se realiza cubriendo la muestra biológica con una solución de hibridación que comprende: 10% (peso/volumen) de sulfato de dextrano; NaCl 10 mM; 30% (volumen/volumen) de formamida; 0,1% (peso/volumen) de pirofosfato sódico; 0,2% (peso/volumen) de polivinilpirrolidona; 0,2% (peso/volumen) de Ficoll; EDTA disódico 5 mM; 0,1% (volumen/volumen) de Triton X-100; Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; y 200 nM de sonda de PNA según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 30 10. Método según la reivindicación 9, en el que la muestra biológica se deriva de sangre, aire, alimento, agua o biopsias y no contiene otros ácidos nucleicos distintos a los de *Salmonella* que comprenden la secuencia diana para las sondas de PNA descritas en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
- 35 11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, en el que la muestra biológica se sumerge en una solución de fijación que comprende paraformaldehído y etanol, preferiblemente 2-8% (peso/volumen) de paraformaldehído y 25-90% (volumen/volumen) de etanol.
12. Método según la reivindicación 9, en el que la hibridación de la sonda de PNA se realiza a una temperatura entre 53°C y 59°C, preferiblemente 57°C.
- 40 13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que después de la hibridación de la sonda de PNA hay una etapa de lavado realizada con una solución precalentada que comprende Tris Base 5 mM; NaCl 15 mM y 1% (volumen/volumen) de Triton X-100, pH 10.
14. Método según la reivindicación 9, en el que la detección de la hibridación se produce mediante fluorescencia.
15. Sondas de PNA como las descritas en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para el uso en la detección

de *Salmonella* spp. en muestras biológicas.

16. El estuche que se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, para el uso en la detección de *Salmonella* spp. en muestras biológicas.

ES 2 543 172 T3

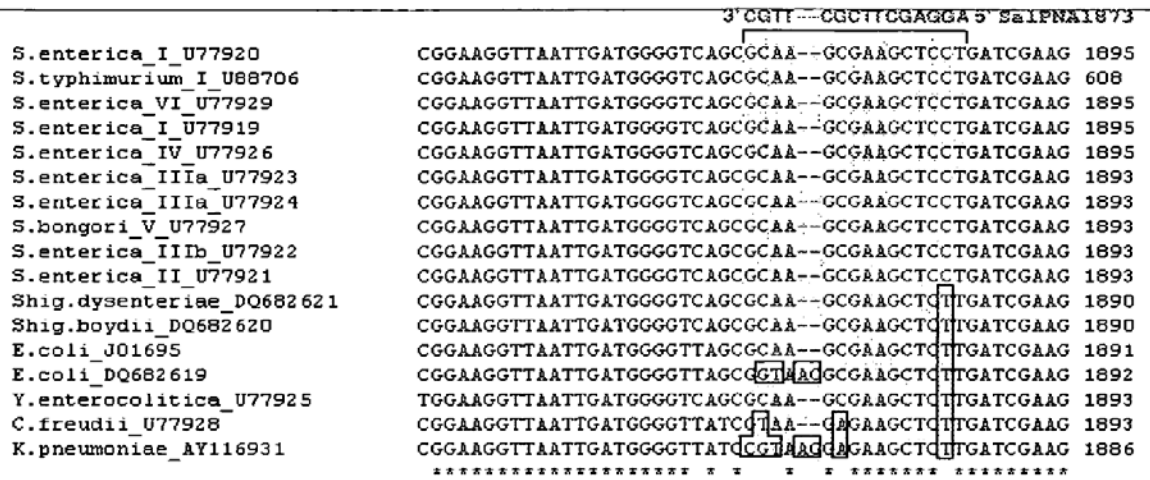


Figura 1