

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 680 143**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.08.2012 PCT/US2012/052383**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.02.2013 WO13029021**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.08.2012 E 12761842 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018 EP 2748332**

54 Título: **Composiciones y métodos para la detección de múltiples microorganismos**

30 Prioridad:

24.08.2011 US 201161527107 P
29.06.2012 US 201261666325 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.09.2018

73 Titular/es:

OXOID LIMITED (100.0%)
Wade Road Basingstoke
Hampshire RG24 8PW, GB

72 Inventor/es:

TEBBS, ROBERT;
CUMMINGS, CRAIG;
BRZOSKA, PIUS;
MATHENY, SHARON;
O'CONNELL, CATHERINE;
FURTADO, MANOHAR;
FANG, RIXUN;
PETRAUSKENE, OLGA;
LIEW, SUEH-NING y
SCHUMAKER, MICHAEL

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 680 143 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

Composiciones y métodos para la detección de múltiples microorganismos

5 Campo técnico de la invención

Las presentes enseñanzas, en algunas realizaciones, se refieren a composiciones, métodos y kits para la detección de uno o múltiples microorganismos contaminantes en muestras. Algunas realizaciones describen composiciones, métodos y kits para detectar uno o más microorganismos que producen factores de virulencia tales como la toxina de Shiga o *eae*. En algunas realizaciones, las composiciones, métodos y kits pueden identificar y detectar además cepas y serotipos individuales de microorganismos productores de toxina Shiga. También se describen flujos de trabajo para detección e identificación de múltiples microbios.

15 Antecedentes

La identificación de la contaminación bacteriana en los alimentos a menudo ocurre después de un brote de una enfermedad transmitida por los alimentos. Las bacterias como *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Shigella* (*Shigella spp.*) Se identifican con frecuencia como un contaminante alimentario de muchas enfermedades transmitidas por los alimentos. Algunos organismos *E. coli* y *Shigella spp.* producen una toxina llamada toxina Shiga.

Los organismos *Shigella spp.*, si se consumen en alimentos contaminados, causan shigelosis que a menudo se caracteriza por disentería, náuseas, fiebre, vómitos y calambres estomacales.

E. coli productor de la toxina Shiga (STEC), a veces también denominado *E. coli* productor de verotoxina (VTEC), se encuentran en carnes poco cocidas, leche cruda y agua contaminada. Estas bacterias pueden causar enfermedades que van desde enfermedades intestinales leves hasta diarrea sanguinolenta o insuficiencia renal potencialmente mortal causada por una afección llamada síndrome urémico hemolítico (HUS).

Un serotipo de *E. coli* conocido como *E. coli* O157: H7 produce la toxina Shiga y con mayor frecuencia se asocia con brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos en los Estados Unidos y en otras partes del mundo y causa colitis enterohemorrágica y posiblemente insuficiencia renal. La detección de *E. coli* patógena, en particular los serotipos causantes de colitis hemorrágica y HUS se han convertido en una prioridad de salud pública. Las regulaciones del gobierno de los Estados Unidos exigen que la carne y otros procesadores de alimentos examinen la presencia de cepas tales como O157: H7 en sus productos terminados y se están considerando directrices más estrictas en varios estados para la identificación de O157: H7 en otros productos básicos y productos alimenticios.

Como resultado de brotes repetidos y la naturaleza potencialmente mortal de la contaminación por STEC, las agencias gubernamentales de salud pública ahora requieren pruebas de múltiples microbios STEC para garantizar la seguridad de los alimentos. Específicamente, el USDA-FSIS ha identificado seis serotipos O de *E. coli* incluyendo O26, O45, O103, O111, O121, O145 para futuras pruebas, mientras que la Asociación Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha requerido la prueba de cuatro de estos serotipos de *E. coli* que incluyen O26, O103, O111, O145. Sin embargo, todavía faltan métodos rápidos para probar e identificar uno o más organismos STEC.

Los documentos US2010/267012, CN101113475, SHARMA V K ET AL, "Semi-automated fluorogenic PCR assays (TaqMan) for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxigenic *E. coli*", MOLECULAR AND CELLULAR PROBES, ACADEMIC PRESS, LONDON, GB, (19990801), vol. 13, No. 4, páginas 291-302, e IBEKWE A M ET AL., "Multiplex fluorogenic real-time PCR for detection and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy wastewater wetlands", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US., (20021001), vol. 68, No. 10, páginas 4853-4862, divulgan ensayos múltiples de PCR dirigidos, entre otros, al gen *stx1*. Los ensayos para la detección rápida, sensible y específica de patógenos infecciosos son extremadamente importantes desde una perspectiva de salud pública y económica. Existe la necesidad de nuevos ensayos y métodos para detectar y diferenciar organismos patógenos de otros organismos patógenos y no patógenos para analizar alimentos y otras muestras, y la identificación de patógenos, por ejemplo, para determinar un contaminante patógeno en una muestra y/o para hacer un diagnóstico diferencial de qué microbio está causando una enfermedad en particular.

Resumen

Según la presente invención, se proporcionan métodos y kits para la detección de uno o más microorganismos y/o cepas y/o serotipos de los mismos que expresan uno o más factores de virulencia (por ejemplo, un microbio que expresa factores de virulencia tales como la toxina Shiga y/o *eae*) de acuerdo con las reivindicaciones modificadas.

Algunas realizaciones se refieren a composiciones que comprenden secuencias aisladas de ácido nucleico que son operables para hibridarse con regiones de ácido nucleico que se encuentran de manera única en un microbio que expresa un factor de virulencia. Las regiones de ácido nucleico que corresponden a uno o más factores de virulencia y que se encuentran únicamente en microorganismos que expresan el factor de virulencia se denominan aquí ácidos

nucleicos objetivo específicos del factor de virulencia.

Los factores de virulencia, en algunas realizaciones, comprenden uno o más genes, alelos y variantes de los mismos que codifican una toxina Shiga. En algunas realizaciones, se describen composiciones que comprenden secuencias de ácidos nucleicos de cebador y/o sonda que son específicas para hibridar con el gen *stx* (toxina Shiga), alelo, fragmento y/o complemento del mismo, que comprenden secuencias aisladas de ácido nucleico que tienen la secuencia de nucleótidos de las la SEQ ID NOS: 1-10, complementos de los mismas y secuencias que tienen aproximadamente un 90% de identidad con las secuencias anteriores.

En algunas realizaciones, la detección de factores de virulencia en un microorganismo comprende la detección de uno o más genes, alelos y/o porciones y/o fragmentos y/o complementos de los mismos que codifican una toxina Shiga. Las composiciones de ácidos nucleicos aisladas se describen en el presente documento como cebadores y sondas que tienen las la SEQ ID NOS: 1-10 que son específicas para hibridar con una secuencia de ácido nucleico objetivo específica de toxina Shiga, que incluyen, pero no se limitan a, un gen *stx*, alelo, fragmento, variante y/o complementos de los mismos, así como un fragmento amplificado de cualquiera de los anteriores. Estas composiciones se pueden usar en métodos de detección descritos en este documento para detectar la presencia de un microbio que codifica/expresa toxina Shiga. Los microorganismos de diferentes especies y cepas que codifican un factor de virulencia de toxina Shiga, que incluye alelos *stx1* y *stx2*, pueden detectarse mediante composiciones y métodos descritos en este documento. Los ejemplos no limitantes de microorganismos detectados pueden incluir diversas *E. coli* spp. y *Shigella* spp. que producen toxina Shiga.

En algunas realizaciones, un factor de virulencia que puede detectarse mediante las presentes composiciones y métodos comprende uno o más genes, alelos y variantes de los mismos que codifican el gen de *eae*. En algunas realizaciones, la detección de factores de virulencia puede comprender la detección de uno o más ácidos nucleicos que codifican *eae*, un alelo de un gen *eae*, o fragmentos de los mismos. Las composiciones aisladas de ácidos nucleicos se describen en la presente memoria como cebadores y sondas que tienen las la SEQ ID NOS: 11-14 que son específicas para hibridar con una secuencia de ácido nucleico objetivo específica de *eae*, que incluyen, pero no se limitan a, un gen *eae*, alelo, fragmento, variante y/o complementos de los mismos, así como un fragmento amplificado de cualquiera de los anteriores. Estas composiciones se pueden usar en métodos de detección descritos en este documento para detectar la presencia de un microbio que codifica/expresa *eae*. Los microorganismos de diferentes especies y cepas que codifican/expresan el factor de virulencia de *eae*, incluyendo alelos y variantes de *eae*, pueden detectarse mediante composiciones y métodos descritos en este documento. Los ejemplos no limitantes de microorganismos detectados pueden incluir diversos *E. coli* spp. y *Shigella* spp que expresan *eae*.

Algunas realizaciones describen composiciones que comprenden secuencias de cebador y/o secuencias de sonda específicas para hibridar con un gen *eae*, alelo y/o fragmento de los mismos que comprenden secuencias aisladas de ácido nucleico que tienen la secuencia de nucleótidos de las la SEQ ID NOS: 11-14, complementos de las mismas y secuencias que tienen aproximadamente 90% de identidad con las secuencias anteriores. Las la SEQ ID NOS: 11-14 se pueden usar en métodos de detección descritos en este documento para detectar la presencia de un microbio codificador de *eae*.

Algunas realizaciones describen cebadores oligonucleótidos para uso en la detección de factores de virulencia, comprendiendo el conjunto de cebadores oligonucleótidos: al menos un conjunto de cebadores, teniendo cada grupo al menos un cebador directo y al menos un cebador inverso, que son operables para hibridar con factores de virulencia tales como una o más variantes de ácidos nucleicos que codifican toxina Shiga, alelos, complementos y fragmentos de los mismos y/o ácidos nucleicos que codifican *eae*, alelos, complementos y fragmentos de los mismos.

Algunas realizaciones describen un conjunto de cebadores oligonucleótidos para uso simultáneo en un proceso de PCR múltiple para la detección de factores de virulencia, comprendiendo el conjunto de cebadores oligonucleótidos: al menos dos conjuntos de cebadores, teniendo cada conjunto al menos un cebador directo y al menos un cebador inverso, que son operables para hibridar con factores de virulencia que comprenden todas las variantes de ácidos nucleicos que codifican toxina Shiga, alelos y fragmentos de los mismos. Los conjuntos de cebadores pueden estar dirigidos hacia un gen *stx*. Un gen *stx* puede ser un gen *stx1*, un gen *stx2*, un alelo de un gen *stx1*, un alelo de un gen *stx2*, o un fragmento de los mismos. Los conjuntos de cebadores en algunas realizaciones pueden ser cebadores degenerados.

Algunas realizaciones de la presente memoria descriptiva se refieren a composiciones que comprenden secuencias aisladas de ácido nucleico que son operables para hibridar con regiones de ácido nucleico que se encuentran de manera única en un microorganismo STEC. Las regiones de ácido nucleico encontradas exclusivamente en un microorganismo STEC específico se denominan en el presente documento ácidos nucleicos objetivo específicos de microorganismos o ácidos nucleicos objetivo específicos de microorganismos STEC.

En algunas realizaciones, la presente divulgación describe una secuencia aislada de ácido nucleico que comprende las la SEQ ID NO: 15-la SEQ ID NO: 32, fragmentos de las mismas, complementos de la mismas, secuencias que comprenden al menos un 90% de identidad de secuencia de ácido nucleico de las mismas, derivados marcados y derivados químicos y/o biológicos de los mismos. Estos ácidos nucleicos aislados son secuencias de cebador y/o sonda que pueden hibridar con ácidos nucleicos objetivo específicos de microorganismos STEC y pueden amplificar y/o

detectar ácidos nucleicos objetivo específicos de STEC en condiciones de amplificación y/o hibridación apropiadas.

Los fragmentos de secuencias de ácido nucleico descritas en la presente memoria incluyen, sin limitación, ácidos nucleicos que tienen al menos 10, al menos 15, o al menos 20 ácidos nucleicos contiguos de una secuencia de ácido nucleico como se describe en este documento. Las secuencias de ácido nucleico de la divulgación, en algunas realizaciones, son cebadores y/o sondas. En algunas realizaciones, los cebadores de la divulgación pueden ser cebadores degenerados. Los cebadores y las sondas pueden estar marcados. En algunas realizaciones, las composiciones de secuencia aisladas de ácido nucleico de la divulgación pueden comprender uno o más marcadores, tales como, pero no se limitan a, un colorante, un isótopo radiactivo, un marcador quimioluminiscente, una unidad estructural fluorescente, un marcador bioluminiscente, una enzima y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, los cebadores y las sondas pueden ser derivados químicos y/o biológicos de las secuencias descritas en la presente memoria.

La presente solicitud describe composiciones y métodos para detectar uno o más microorganismos en muestras. Uno o más microorganismos que pueden detectarse mediante un método de esta divulgación pueden ser cepas diferentes de *E. coli* tales como un organismo *E. coli* O157:H7, un organismo *E. coli* O26, un organismo *E. coli* O45, un organismo *E. coli* O103, un organismo *E. coli* O111, un organismo *E. coli* O121 y un organismo *E. coli* O145 y/o un organismo *Shigella spp.* Algunos métodos divulgados en la presente memoria son métodos sencillos y algunos métodos divulgados en este documento son métodos múltiples.

Las muestras que pueden analizarse mediante métodos de la divulgación para detectar un contaminante microbiano en las mismas incluyen, pero no se limitan a, una muestra de alimento (muestras de alimentos procesados y muestras de alimentos crudos), una muestra de bebida, una muestra agrícola, una muestra de producto, una muestra animal, una muestra clínica, una muestra ambiental, una muestra biológica, una muestra de agua y una muestra de aire.

Algunas realizaciones describen métodos para detectar un microorganismo *E. coli* (STEC) que produce toxina Shiga en una muestra que comprende: hibridar al menos un primer par de cebadores de amplificación de ácido nucleico con un ácido nucleico objetivo STEC, un fragmento del mismo, un complemento del mismo, un alelo del mismo, o una variante del mismo, con al menos una primera secuencia de polinucleótido objetivo presente en la muestra; amplificar al menos la primera secuencia de polinucleótido objetivo o un fragmento o un complemento de la misma para obtener al menos una secuencia amplificada de polinucleótido objetivo; y detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; en el que la detección de al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo es indicativa de la presencia de un microorganismo STEC en la muestra. Ejemplos de organismos STEC detectados son *E. coli* O26, *E. coli* O45, *E. coli* O103, *E. coli* O111, *E. coli* O121 y/o *E. coli* O145.

Algunas realizaciones describen métodos para la detección de una *E. coli* O121 en una muestra que comprende: hibridar con al menos un primer par de cebadores de amplificación de ácido nucleico que comprenden los ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 15 y la SEQ ID NO: 16, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de los mismos, complementos de los mismos, y secuencias que tienen al menos 90% de homología con los mismos, con al menos una primera secuencia del polinucleótido objetivo presente en la muestra; amplificar al menos la primera secuencia de polinucleótido objetivo o un fragmento o un complemento de la misma para obtener al menos una secuencia amplificada de polinucleótido objetivo; y detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; en la que la detección de al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo es indicativa de la presencia de una *E. coli* O121 en la muestra. Un método para detectar *E. coli* O121 puede comprender además usar una sonda para detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo en la que la sonda comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 17, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de la misma, complementos de la misma y secuencias que tienen al menos 90% de homología con la misma.

Algunas realizaciones describen métodos para la detección de una *E. coli* O145 en una muestra que comprende: hibridar al menos un primer par de cebadores de amplificación de ácidos nucleicos que comprenden ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 18 y la SEQ ID NO: 19, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de los mismos, complementos de los mismos, y secuencias que tienen al menos 90% de homología con los mismos, con al menos una primera secuencia del polinucleótido objetivo presente en la muestra; amplificar al menos la primera secuencia de polinucleótido objetivo o un fragmento o un complemento de la misma para obtener al menos una secuencia amplificada de polinucleótido objetivo; y detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; en el que la detección de al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo es indicativa de la presencia de una *E. coli* O145 en la muestra. Un método para detectar una *E. coli* O145 puede comprender además usar una sonda para detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo en la que la sonda comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 20, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de la misma, complementos de la misma y secuencias que tienen al menos 90% de homología con la misma.

Algunas realizaciones describen métodos para la detección de una *E. coli* O26 en una muestra y comprende: hibridar al menos un primer par de cebadores de amplificación de ácido nucleico que comprende ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 21 y la SEQ ID NO: 22, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de los mismos, complementos de los mismos, y secuencias que tienen al menos 90% de homología con los mismos, con al menos una primera secuencia del polinucleótido objetivo presente en la muestra; amplificar al menos la primera secuencia del polinucleótido objetivo o

un fragmento o un complemento de la misma para obtener una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; y detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; en el que la detección de al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo es indicativa de la presencia de una *E. coli* O26 en la muestra. Un método para detectar una *E. coli* O26 puede comprender además usar una sonda para detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo en el que la sonda comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 23, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de la misma, complementos de la misma y secuencias que tienen al menos 90% de homología con la misma.

Algunas realizaciones describen métodos para la detección de una *E. coli* O45 en una muestra que comprende: hibridar al menos un primer par de cebadores de amplificación de ácido nucleico que comprende ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 24 y la SEQ ID NO: 25, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de los mismos, complementos de los mismos, y secuencias que tienen al menos 90% de homología con los mismos, con al menos una primera secuencia del polinucleótido objetivo presente en la muestra; amplificar al menos la primera secuencia de polinucleótido objetivo o un fragmento o un complemento de la misma para obtener una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; y detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; en el que la detección de al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo es indicativa de la presencia de una *E. coli* O45 en la muestra. Un método para detectar una *E. coli* O45 puede comprender además usar una sonda para detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo en el que la sonda comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 26, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de la misma, complementos de la misma y secuencias que tienen al menos 90% de homología con la misma.

Algunas realizaciones describen métodos para la detección de una *E. coli* O103 en una muestra que comprende: hibridar al menos un primer par de cebadores de amplificación de ácido nucleico que comprende ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 27 y la SEQ ID NO: 28, complementos de los mismos, y secuencias que tienen al menos 90% de homología con los mismos con al menos un primera secuencia polinucleótido objetivo presente en la muestra; amplificar al menos la primera secuencia de polinucleótido objetivo o un fragmento o un complemento de la misma para obtener una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; y detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; en la que la detección de al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo es indicativa de la presencia de una *E. coli* O103 en la muestra. Un método para detectar una *E. coli* O103 puede comprender además usar una sonda para detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo en el que la sonda comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 29, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de la misma, complementos de la misma y secuencias que tienen al menos 90% de homología con la misma.

Algunas realizaciones describen métodos para la detección de un *E. coli* O111 en una muestra que comprende: hibridar al menos un primer par de cebadores de amplificación de ácido nucleico que comprende ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 30 y la SEQ ID NO: 31, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de los mismos, complementos de los mismos y secuencias que tienen al menos 90% de homología con los mismos, con al menos una primera secuencia del polinucleótido objetivo presente en la muestra; amplificar al menos la primera secuencia de polinucleótido objetivo o un fragmento o un complemento de la misma para obtener una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; y detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; en el que la detección de al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo es indicativa de la presencia de una *E. coli* O111 en la muestra. Un método para detectar una *E. coli* O111 puede comprender además usar una sonda para detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo en el que la sonda comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 32, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de la misma, complementos de la misma y secuencias que tienen al menos 90% de homología con la misma.

La memoria descriptiva, en algunas realizaciones, describe un método para la detección de uno o más microorganismos, expresando cada microorganismo uno o más factores de virulencia que comprenden: 1) detectar la presencia de uno o más factores de virulencia que comprenden: a) poner en contacto una muestra sospechosa de contener uno o más microorganismos que expresan uno o más factores de virulencia con uno o más conjuntos de cebadores oligonucleótidos específicos para hibridar con porciones o porciones contiguas a uno o más factores de virulencia; b) amplificar al menos una secuencia de ácido nucleico objetivo que codifica al menos uno de los factores de virulencia mediante un método de amplificación múltiple para obtener uno o más ácidos nucleicos específicos del factor de virulencia amplificado; c) detectar uno o más ácidos nucleicos específicos del factor de virulencia amplificado o fragmentos o complementos de los mismos; y d) identificar opcionalmente los ácidos nucleicos específicos del factor de virulencia amplificado, en el que la detección de uno o más ácidos nucleicos específicos del factor de virulencia amplificado o fragmentos o complementos de los mismos es indicativo de la presencia de un microorganismo en la muestra que expresa uno o más factores de virulencia; y 2) determinar la cepa de uno o más microorganismos que expresan uno o más factores de virulencia que comprende: a) poner en contacto la muestra con al menos un conjunto de cebadores oligonucleótidos específicos para hibridar con un objetivo específico de una cepa de uno o más microorganismos; b) amplificar conjuntamente al menos una secuencia de ácido nucleico objetivo específica de una cepa que codifica para objetivos de ácido nucleico específicos para al menos una cepa del microorganismo mediante un método de amplificación múltiple para obtener uno o más ácidos nucleicos específicos de la cepa amplificada; c) detectar uno o más ácidos nucleicos específicos de la cepa amplificada o fragmentos o complementos de la misma; y d) identificar opcionalmente los ácidos nucleicos específicos de la cepa amplificada. En algunas realizaciones del método, cada conjunto de cebadores oligonucleótidos específicos para uno o más factores de virulencia se marca con un

marcador diferente. En algunas realizaciones del método, cada conjunto de cebadores oligonucleótidos específicos para una o más cepas del microorganismo se marca con un marcador diferente y en el que cada conjunto de cebadores oligonucleótidos específicos para uno o más factores de virulencia se marca con un marcador diferente.

5 En algunas realizaciones, las etapas descritas en el método anterior de 1) detectar la presencia de uno o más factores de virulencia y 2) determinar la cepa de uno o más microorganismos que expresan uno o más factores de virulencia se pueden realizar simultáneamente, de forma secuencial y/o en cualquier orden.

10 En algunas realizaciones de un método para la detección de uno o más microorganismos que expresan uno o más factores de virulencia, uno o más conjuntos de cebadores oligonucleótidos específicos para uno o más factores de virulencia comprenden cada uno: al menos un cebador directo y al menos un cebador inverso operable para hibridar con uno o más factores de virulencia. Los factores de virulencia en algunas realizaciones comprenden, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: todas las variantes que codifican ácidos nucleicos que codifican la toxina Shiga (*stx*), alelos y fragmentos de los mismos; y/o todas las variantes de ácidos nucleicos que codifican al gen *eae*, alelos y fragmentos de los mismos. El ácido nucleico que codifica *stx* puede comprender un gen *stx1*, un gen *stx2*, un alelo de un gen *stx1*, un alelo de un gen *stx2*, o fragmentos de los mismos. Por ejemplo, véase la Tabla 1 que enumera varios subtipos y variantes de *stx1* y *stx2*. Los ácidos nucleicos que codifican *eae* pueden comprender un gen *eae*, un alelo de un gen *eae*, o fragmentos de los mismos. Hay más de 25 alelos definidos del gen *eae*, que codifica la proteína intimina. Véase <http://Honlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6968.2006.00328.x/full> para obtener más detalles.

20 Los microorganismos que expresan uno o más factores de virulencia incluyen, por ejemplo, *E. coli* que produce toxina Shiga (STEC) y *Shigella spp.*

25 En algunas realizaciones de un método descrito anteriormente, uno o más conjuntos de cebadores oligonucleótidos específicos para uno o más factores de virulencia comprenden y pueden seleccionarse de: un primer conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2; un segundo conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 5; un tercer conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 6 y la SEQ ID NO: 7; un cuarto conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 9; y/o un quinto conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12; y la SEQ ID NO: 13. Un método puede comprender además las etapas de detectar uno o más ácidos nucleicos amplificados específicos del factor de virulencia o fragmentos o complementos de los mismos que comprende hibridar uno o más ácidos nucleicos específicos del factor de virulencia amplificado o fragmentos o complementos de los mismos con una sonda seleccionada de la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 10, y/o la SEQ ID NO: 14.

35 En algunas realizaciones, no se puede detectar ningún producto amplificado usando los métodos descritos anteriormente para excluir la presencia de un microorganismo que expresa un factor de virulencia en una muestra.

40 En algunas realizaciones de un método como se describió anteriormente, al menos un conjunto de cebadores oligonucleótidos específicos para la cepa de uno o más microorganismos comprende y puede seleccionarse de: un primer conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 15 y la SEQ ID NO: 16; un segundo conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 18 y la SEQ ID NO: 19; un tercer conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 21 y la SEQ ID NO: 22; un cuarto conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 24 y la SEQ ID NO: 25, un quinto conjunto de cebador que tiene la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 28; un sexto conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 30 y la SEQ ID NO: 31; un séptimo conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 33 y la SEQ ID NO: 34; y/o un octavo conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 36 y la SEQ ID NO: 37. En algunas realizaciones, las etapas de detectar uno o más ácidos nucleicos específicos de la cepa amplificada o fragmentos o complementos de los mismos comprende hibridar uno o más ácidos nucleicos específicos de las cepas amplificadas o fragmentos o complementos de los mismos con una sonda seleccionada de la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 23, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 35 y la SEQ ID NO: 38.

50 En algunas realizaciones, no se puede detectar ningún producto amplificado usando los métodos descritos anteriormente para excluir la presencia de un microorganismo de una cepa particular en una muestra.

55 En algunas realizaciones, la detección de un ácido nucleico amplificado comprende uno o más métodos tales como, pero sin limitarse a, hibridación, espectrometría de masas, nanocuerdas, microfluidos, quimioluminiscencia, tecnologías enzimáticas y combinaciones de los mismos. Algunas realizaciones también pueden comprender identificar un microbio y pueden comprender métodos tales como la secuenciación de ADN. En algunos métodos de realizaciones descritos en la presente memoria se pueden ácidos nucleicos (ARN/ADN) de una muestra que se sospecha que contiene un microorganismo a detectar antes de la amplificación o detección.

60 En algunas realizaciones, la divulgación describe métodos para detectar e identificar uno o más microorganismos *E. coli* productores de toxina Shiga (STEC) en una muestra que comprende las etapas de: a) enriquecer opcionalmente los microorganismos STEC; b) extraer ácidos nucleicos de (microorganismos STEC y otros presentes en) la muestra; c) realizar una reacción en cadena de polimerasa múltiple (PCR) en los ácidos nucleicos de la muestra extraída para amplificar y detectar la presencia de al menos un ácido nucleico seleccionado de: ácidos nucleicos que codifican para un gen de toxina Shiga, incluidos ácidos nucleicos que codifican *stx1* y *stx2*; ácidos nucleicos que codifican un gen *eae*; y ácidos nucleicos específicos para una cepa de *E. coli* O157:H7, en el que la detección de al menos un ácido nucleico

anterior indica la presencia de un microorganismo STEC o la presencia de un microorganismo *E. coli* O157:H7 o ambos; y d) si se detecta un ácido nucleico en la etapa c) realizar una segunda ronda de PCR múltiple con cebadores específicos para amplificar y detectar la presencia de uno o más ácidos nucleicos que codifican regiones objetivo asociadas con uno o más microorganismos STEC que incluyen una *E. coli* O157:H7, una *E. coli* O26, una *E. coli* O45, una *E. coli* O103, una *E. coli* O111, una *E. coli* O121 y una *E. coli* O145, detectando o identificando por lo tanto la cepa del microorganismo STEC.

En otras realizaciones, no se puede detectar ningún producto amplificado usando los métodos descritos anteriormente para excluir la presencia de un microorganismo STEC en una muestra.

Se pueden detectar ácidos nucleicos objetivo amplificados de objetivos que incluyen ácido nucleico objetivo amplificado de *stx1*, *stx2*, *eae*, una *E. coli* O157:H7, una *E. coli* O26, una *E. coli* O45, una *E. coli* O103, una *E. coli* O111, una *E. coli* O121 y/o una *E. coli* O145 usando una pluralidad de marcadores en cada conjunto diferente de cebadores y/o sondas. Por ejemplo, en la etapa c) anterior, se pueden usar cebadores y/o sondas con un marcador diferente para cada uno de: *stx1*, *stx2*, *eae* y *E. coli* O157:H7 y en la etapa d) se pueden usar cebadores y/o sondas con un marcador diferente para cada uno de los diferentes microorganismos.

En algunas realizaciones, los métodos de la divulgación pueden realizarse en un sistema automatizado. La automatización disminuye el tiempo y la eficiencia y permite procesar múltiples muestras. Los sistemas automatizados pueden comprender plataformas magnéticas tales como, pero sin limitarse a, el procesador de partículas magnéticas MagMAX^{MR} Express-96 de Life Technologies Corporation y el sistema Pathatrix (<http://www.matrixmsci.com/pathatrix.htm>).

La detección en los métodos anteriores puede realizarse por una variedad de métodos, tales como, pero sin limitarse a, mediante una reacción de amplificación de ácido nucleico, la reacción de amplificación es una determinación de punto final, la reacción de amplificación es cuantitativa, la cuantificación es una PCR en tiempo real, la PCR en tiempo real es un ensayo SYBR[®] Green o la PCR en tiempo real es un ensayo TaqMan[®]. La detección puede en algunos casos realizarse mediante hibridación usando sondas específicas para secuencias de ácido nucleico amplificadas que codifican una secuencia objetivo. Las combinaciones de amplificación e hibridación pueden usarse para la detección de acuerdo con algunas realizaciones.

En algunas realizaciones, la hibridación puede comprender al menos una primera sonda y una segunda sonda, comprendiendo además la primera sonda un primer marcador y dicha segunda sonda que comprende además un segundo marcador, en el que ambos marcadores se seleccionan de un colorante, un isótopo radiactivo, un marcador quimioluminiscente, y una enzima, el colorante comprende un colorante de fluoresceína, un colorante de rodamina o un colorante de cianina, el colorante es un colorante de fluoresceína y la primera sonda está marcada con colorante FAM^{RM} y dicha segunda sonda está marcada con colorante VIC[®].

Algunas realizaciones describen kits adecuados para identificar la presencia de un organismo productor de toxina Shiga. Tal kit puede comprender al menos un conjunto de cebadores oligonucleótidos para usar en un proceso de amplificación (tal como PCR y en algunas realizaciones una PCR múltiple) para la detección de factores de virulencia *stx*, el conjunto de cebadores que comprende cebadores operables para hibridar con factores de virulencia que comprenden todas las variantes, genes, alelos y/o fragmentos y complementos de toxina Shiga. Un kit puede comprender adicionalmente secuencias de sonda para detectar ácidos nucleicos amplificados objetivo *stx*. En un ejemplo de realización, un kit para detectar microorganismos que expresan *stx* comprende cebadores y sondas que tienen las la SEQ ID NOS: 1-10.

Algunas realizaciones describen kits adecuados para identificar la presencia de un organismo que codifica *eae*. Tal kit puede comprender al menos un conjunto de cebadores oligonucleótidos para uso en un procedimiento de PCR para la detección de un factor de virulencia *eae*, el conjunto de cebadores que comprende cebadores operables para hibridar con genes que codifican *eae*, alelos, regiones complementarias de los mismo y fragmentos de los mismos que comprenden todas las variantes de *eae*. Un kit puede comprender adicionalmente secuencias de sonda para detectar ácidos nucleicos amplificados objetivo de *eae*. En un ejemplo de realización, un kit para detectar microorganismos que se expresan *eae* comprende cebadores y sondas que tienen las la SEQ ID NOS: 11-14.

Algunos kits de la divulgación pueden detectar factores de virulencia que incluyen *stx* y *eae* y comprenden conjuntos de cebadores seleccionados de: un primer conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2; un segundo conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 5; un tercer conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 6 y la SEQ ID NO: 7; un cuarto conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 9; un quinto conjunto de cebadores que tiene como cebador directo la SEQ ID NO: 11 y como cebadores inversos la SEQ ID NO: 12 o la SEQ ID NO: 13; y además opcionalmente adicionalmente al menos una sonda más seleccionada entre las sondas que tienen la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 10, y la SEQ ID NO: 14, o secuencias complementarias de las mismas, o secuencias que comprenden al menos 90% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos de la misma, o un derivado marcado de las mismas.

En algunas realizaciones, se describen kits para detección de organismos STEC que incluyen una *E. coli* O26, una *E. coli* O45, una *E. coli* O103, una *E. coli* O111, una *E. coli* O121 y una *E. coli* O145. En una realización de ejemplo, kits

para la detección de microorganismos *E. coli* que producen toxina Shiga (STEC) comprenden: uno o más pares de cebadores de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) directa e inversa seleccionados de un primer conjunto cebador que tiene la SEQ ID NO: 15 y la SEQ ID NO: 16; un segundo conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 18 y la SEQ ID NO: 19; un tercer conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 21 y la SEQ ID NO: 22; un cuarto conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 24 y la SEQ ID NO: 25, un quinto conjunto de cebador que tiene la SEQ ID NO: 27 y la SEQ ID NO: 28; un sexto conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 30 y la SEQ ID NO: 31, o secuencias complementarias de las mismas, o secuencias que comprenden al menos 90% de identidad de secuencia de ácido nucleico de las mismas, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de las mismas, o un derivado marcado de las mismas; opcionalmente al menos una sonda seleccionada de la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 23, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 29 y la SEQ ID NO: 32 o secuencias complementarias de las mismas, o secuencias que comprenden al menos 90% de identidad de secuencia de ácido nucleico de las mismas, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de las mismas, o un derivado marcado de las mismas; y uno o más componentes seleccionados de un grupo que consiste en: al menos una enzima; dNTP, al menos un regulador, al menos una sal, al menos una muestra de ácido nucleico de control y un protocolo de instrucciones. El kit descrito anteriormente se puede usar para detectar uno o más organismos STEC, que incluyen una *E. coli* O26, una *E. coli* O45, una *E. coli* O103, una *E. coli* O111, una *E. coli* O121 y una *E. coli* O145.

En algunas realizaciones, el kit descrito anteriormente también puede comprender cebadores y sondas para detectar un factor de virulencia. Por consiguiente, un kit de la divulgación también puede comprender uno o más pares de cebadores de PCR directos e inversos seleccionados adicionalmente de un séptimo conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 11 y la SEQ ID NO: 12 y la SEQ ID NO: 13; un octavo conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2; un noveno conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 5; un décimo conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 6 y la SEQ ID NO: 7; un undécimo conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 9; y además opcionalmente adicionalmente al menos una sonda más, seleccionada de sondas que tienen la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 10, o secuencias complementarias de las mismas, o secuencias que comprenden al menos 90% de identidad de secuencia de ácido nucleico de las mismas, o un derivado marcado de las mismas.

En algunas realizaciones, los kits de la divulgación pueden comprender además cebadores para hibridar con, amplificar y, por lo tanto, detectar una *E. coli* O157:H7. Tal kit puede comprender adicionalmente uno o más pares de cebadores de PCR directos e inversos seleccionados adicionalmente de un duodécimo conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 33 y la SEQ ID NO: 34; un decimotercer conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 36 y la SEQ ID NO: 37; y opcionalmente adicionalmente al menos otra sonda más, seleccionada entre las sondas que tienen la SEQ ID NO: 35, la SEQ ID NO: 38, o secuencias complementarias de las mismas, o secuencias que comprenden al menos 90% de identidad de secuencia de ácido nucleico de las mismas, o derivados marcados de las mismas.

Se pueden marcar diferentes cebadores y sondas con diferentes marcadores para permitir la detección de diferentes productos amplificados y/o productos hibridados.

En la siguiente descripción detallada, serán evidentes ciertos aspectos y realizaciones. Debe entenderse que una realización dada no necesita tener todos los aspectos y características descritos en este documento. Debe entenderse que estos aspectos y realizaciones son meramente ilustrativos y explicativos y no son restrictivos de la invención. Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son solo ilustrativas y explicativas y no son restrictivas de la invención, como se reivindica.

Las Figuras adjuntas, que se incorporan y constituyen una parte de esta memoria descriptiva, ilustran varios ejemplos realizaciones de la divulgación y junto con la descripción, sirven para explicar ciertas enseñanzas. Estas y otras características de las presentes enseñanzas se exponen en la presente memoria.

50 Descripción de los dibujos

El experto en la materia entenderá que los dibujos que se describen a continuación son únicamente ilustrativos. Los dibujos no pretenden limitar el alcance de las presentes enseñanzas de ninguna manera.

55 La Fig. 1 ilustra los resultados de un ensayo múltiple usando *E. coli* O157:H7, de acuerdo con una realización de la divulgación;

La Fig. 2 ilustra los resultados de un ensayo múltiple usando *E. coli* O104:H4, de acuerdo con una realización de la divulgación;

60 La Fig. 3 ilustra la detección de *stx1* de un panel de 161 cepas de bacterias (146 cepas de *E. coli* y 15 cepas que no son de *E. coli*), de acuerdo con una realización de la divulgación;

La Fig. 4 ilustra la detección de *stx2* de un panel de 161 cepas de bacterias (146 cepas de *E. coli* y 15 cepas que no son de *E. coli*), de acuerdo con una realización de la divulgación;

Las Figuras 5A y 5B ilustran las pruebas de inclusión y exclusión, de *eae* de acuerdo con una realización de la divulgación;

65 Las Figuras 6A y 6B ilustran los resultados de un ensayo múltiple frente a un ensayo sencillo, de acuerdo con una realización; y

Las Figuras 7A y 7B muestran los resultados de los ensayos de confirmación de STEC de acuerdo con una realización.

Descripción detallada

5 Para los fines de la interpretación de esta memoria descriptiva, pueden aplicarse las siguientes definiciones y, cuando sea apropiado, los términos utilizados en singular también incluirán el plural y viceversa. En el caso de que cualquier definición establecida a continuación entre en conflicto con el uso de esa palabra en cualquier otro documento, la definición establecida a continuación siempre primará a los efectos de la interpretación de esta memoria descriptiva y sus reivindicaciones asociadas, a menos que un significado contrario sea claramente evidente (por ejemplo, en el documento donde el término se usa originalmente). Se observa que, tal como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno, una" y "el, la" incluyen referentes plurales a menos que se limiten expresamente e inequívocamente a un referente. El uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. El uso de "comprende", "que comprende", "incluye" y "que incluye" son intercambiables y no pretenden ser limitantes. Además, cuando la descripción de una o más realizaciones usa el término "que comprende", los expertos en la técnica entenderán que, en algunos casos específicos, la realización o realizaciones se pueden describir alternativamente usando la expresión "que consiste esencialmente en" y/o "que consiste en".

20 Como se usa en el presente documento, la frase "ácido nucleico", "secuencia de ácido nucleico", "oligonucleótido" y "polinucleótidos" son intercambiables y no se pretende que sean limitantes.

25 Como se usa en el presente documento, la frase "condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a condiciones de hibridación que pueden tener lugar bajo varias condiciones de pH, sal y temperatura. El pH puede variar de 6 a 9, preferiblemente de 6,8 a 8,5. La concentración de sal puede variar desde 0,15 M de sodio hasta 0,9 M de sodio, y se pueden usar otros cationes siempre que la fuerza iónica sea equivalente a la especificada para el sodio. La temperatura de la reacción de hibridación puede variar de 30°C a 80°C, preferiblemente de 45°C a 70°C. Adicionalmente, se pueden añadir otros compuestos a una reacción de hibridación para promover la hibridación específica a temperaturas más bajas, tales como a temperatura ambiente o próxima a la misma. Entre los compuestos contemplados para reducir los requisitos de temperatura se encuentra la formamida. De este modo, un polinucleótido es típicamente "sustancialmente complementario" a un segundo polinucleótido si se produce hibridación entre el polinucleótido y el segundo polinucleótido. Como se usa en el presente documento, "hibridación específica" se refiere a la hibridación entre dos polinucleótidos en condiciones de hibridación rigurosa.

35 Como se usa en este documento, el término "polinucleótido" se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sea ribonucleótidos, desoxinucleótidos o ácidos nucleicos peptídicos (PNA), e incluye tanto ARN de cadena doble como de cadena sencilla, ADN y PNA. Un polinucleótido puede incluir secuencias de nucleótidos que tienen diferentes funciones, que incluyen, por ejemplo, regiones codificantes y regiones no codificantes tales como regiones reguladoras. Se puede obtener un polinucleótido directamente de una fuente natural, o se puede preparar con la ayuda de técnicas recombinantes, enzimáticas o químicas. Un polinucleótido puede ser lineal o circular en topología. Un polinucleótido puede ser, por ejemplo, una porción de un vector, tal como un vector de expresión o clonación, o un fragmento. Un "oligonucleótido" se refiere a un polinucleótido de la presente invención, típicamente un cebador y/o una sonda.

45 Como se usa en la presente memoria, un "polinucleótido específico del objetivo" se refiere a un polinucleótido que tiene un segmento de unión al objetivo que es perfecta o sustancialmente complementario a una secuencia objetivo, de manera que el polinucleótido se une específicamente a un objetivo pretendido sin unión significativa a secuencias no objetivo en condiciones de hibridación suficientemente rigurosas. El polinucleótido específico del objetivo puede ser, por ejemplo, un cebador o sonda y el sujeto de hibridación con su secuencia objetivo complementaria.

50 El término "secuencia objetivo", "secuencia de firma objetivo", "ácido nucleico objetivo", "objetivo" o "secuencia de polinucleótido objetivo" se refiere a un ácido nucleico de interés. Ejemplos de objetivos de interés en algunas realizaciones de esta solicitud incluyen ácidos nucleicos que codifican *stx* y fragmentos, complementos y secuencias con un 90% de homología con los mismos; ácidos nucleicos que codifican *eae*; ácidos nucleicos específicamente encontrados en organismos STEC tales como una *E. coli* O157:H7, una *E. coli* O26, una *E. coli* O45, una *E. coli* O103, una *E. coli* O111, una *E. coli* O121 y una *E. coli* O145; y/o secuencias de ácido nucleico específicas de *Shigella spp.* La secuencia objetivo puede ser una secuencia de polinucleótidos que es el sujeto de la hibridación con un polinucleótido complementario, por ejemplo, un cebador o sonda. La secuencia objetivo puede estar compuesta de ADN, ARN, un análogo de las mismas, e incluye combinaciones de las mismas. La secuencia objetivo puede ser conocida o desconocida, en términos de su secuencia real y su amplificación puede ser deseada. La secuencia objetivo puede ser o no de importancia biológica. Típicamente, aunque no siempre, es el significado de la secuencia objetivo que se estudia en un experimento particular. Como ejemplos no limitantes, las secuencias objetivo pueden incluir regiones de ADN genómico, regiones de ADN genómico que se cree que contienen uno o más sitios polimórficos, ADN que codifica o se cree que codifica genes o porciones de genes de función conocida o desconocida, ADN que codifica o se cree que codifica proteínas o porciones de proteínas de función conocida o desconocida, ADN que codifica o se cree que codifica regiones reguladoras tales como secuencias promotoras, señales de empalme, señales de poliadenilación, etc.

65 Como se usa en este documento, un "producto de secuencia amplificada del polinucleótido objetivo" se refiere al

amplicón resultante de una reacción de amplificación tal como una reacción en cadena de la polimerasa. El producto de amplicón resultante surge de la hibridación de cebadores complementarios con una secuencia del polinucleótido objetivo en condiciones de hibridación adecuadas y la repetición de manera cíclica de la reacción en cadena de la polimerasa catalizada por ADN polimerasa para amplificación de ADN o ARN polimerasa para amplificación de ARN.

Como se usa en este documento, la "reacción en cadena de polimerasa" o PCR es una amplificación de ácido nucleico que consiste en una etapa inicial de desnaturalización que separa las cadenas de una muestra de ácido nucleico de doble cadena, seguido de la repetición de (i) una etapa de hibridación, que permite que los cebadores de amplificación se hibriden específicamente con las posiciones que flanquean una secuencia objetivo; (ii) una etapa de extensión que extiende los cebadores en una dirección 5' a 3' formando así un polinucleótido de amplicón complementario a la secuencia objetivo, y (iii) una etapa de desnaturalización que provoca la separación del amplicón de la secuencia objetivo (Mullis et al., editores, *The Polymerase Chain Reaction*, BirkHauser, Boston, Mass. (1994)). Cada uno de las etapas anteriores puede realizarse a una temperatura diferente, preferiblemente utilizando un termociclador automático (Applied Biosystems LLC, una división de Life Technologies Corporation, Foster City, CA). Si se desea, las muestras de ARN se pueden convertir a heterodúplex de ADN/ARN o en dúplex de ADNc mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Como se usa en el presente documento, "amplificar" y "amplificación" se refieren a una amplia gama de técnicas para incrementar las secuencias de polinucleótidos, ya sea lineal o exponencialmente. Los ejemplos de técnicas de amplificación incluyen, pero no se limitan a, PCR o cualquier otro método que emplee una etapa de extensión de cebadores. Otros ejemplos no limitantes de amplificación incluyen, pero no se limitan a, reacción de detección de ligasa (LDR) y reacción en cadena de ligasa (LCR). Los métodos de amplificación pueden comprender ciclos térmicos o pueden realizarse isotérmicamente. En diversas realizaciones, el término "producto de amplificación" o "producto amplificado" incluye productos de cualquier número de ciclos de reacciones de amplificación.

En ciertas realizaciones, los métodos de amplificación comprenden al menos un ciclo de amplificación, por ejemplo, pero sin limitarse a, los procedimientos secuenciales de: hibridación de cebadores con porciones específicas de cebadores de la secuencia objetivo o productos de amplificación de cualquier número de ciclos de una reacción de amplificación; sintetizar una cadena de nucleótidos de una manera dependiente de la plantilla usando una polimerasa; y desnaturalizar el dúplex de ácido nucleico recién formado para separar las cadenas. El ciclo puede o no repetirse.

Las descripciones de ciertas técnicas de amplificación pueden encontrarse, entre otros lugares, en H. Ehrlich et al., *Science*, 252: 1643-50 (1991), M. Innis et al., *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Nueva York, NY (1990), R. Favis et al., *Nature Biotechnology* 18: 561-64 (2000), y HF Rabenau et al., *Infection* 28: 97-102 (2000); Sambrook y Russell, *Molecular Cloning*, tercera edición, Cold Spring Harbor Press (2000) (en lo sucesivo, "Sambrook y Russell"), Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (1993) incluyendo suplementos hasta septiembre de 2005, John Wiley & Sons (en lo sucesivo, "Ausubel et. al.").

El término "marca" se refiere a cualquier unidad estructural que se puede unir a una molécula y: (i) proporciona una señal detectable; (ii) interactúa con un segundo marcador para modificar la señal detectable proporcionada por el segundo marcador, por ejemplo, FRET; (iii) estabiliza la hibridación, es decir, formación del dúplex; o (iv) proporciona una unidad estructural de captura, es decir, afinidad, anticuerpo/antígeno, complejación iónica. La marcación se puede lograr usando cualquiera de una gran cantidad de técnicas conocidas que emplean marcadores conocidos, enlaces, grupos de enlace, reactivos, condiciones de reacción y métodos de análisis y purificación. Los marcadores incluyen compuestos emisores de luz que generan una señal detectable por fluorescencia, quimioluminiscencia o bioluminiscencia (Kricka, L. en *Nonisotopic ADN Probe Techniques* (1992), Academic Press, San Diego, páginas. 3-28). Otra clase de marcadores son unidades estructurales estabilizadores de la hibridación que sirven para potenciar, estabilizar o influir en la hibridación de dúplex, por ejemplo, intercaladores, ligantes de surco menor y grupos funcionales de entrecruzamiento (Blackburn, G. y Gait, M. Eds. "DNA and RNA Structure" en *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, 2da Edición, (1996) Oxford University Press, páginas 15-81). Aún otra clase de marcadores efectúa la separación o inmovilización de una molécula mediante captura específica o no específica, por ejemplo, biotina, digoxigenina y otros haptenos (Andrus, A. "Chemical methods for 5' non-isotopic labelling of PCR probes and primers" (1995) en *PCR 2: A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, páginas 39-54).

Los términos "hibridación" y "apareamiento" se usan indistintamente y significan la interacción de emparejamiento de bases de un ácido nucleico con otro ácido nucleico que da como resultado la formación de un dúplex u otra estructura de orden superior. La interacción primaria es específica de una base, es decir, A/T y G/C, mediante enlaces de hidrógeno de tipo Watson/Crick y Hoogsteen.

El término "análisis de punto final" se refiere a un método en el que la recopilación de datos se produce solo cuando una reacción se completa sustancialmente.

El término "análisis en tiempo real" se refiere a la monitorización periódica durante la PCR. Ciertos sistemas como el Sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems, Foster City, California) conducen el monitoreo durante cada ciclo térmico en un punto predeterminado o definido por el usuario. El análisis en tiempo real de PCR con sondas FRET mide los cambios de la señal de colorante fluorescente de ciclo a ciclo, preferiblemente menos

cualquier señal de control interno.

El término "atenuación" se refiere a una disminución en la fluorescencia de una primera unidad estructural (colorante informador) causada por una segunda unidad estructural (atenuador) independientemente del mecanismo.

Un "cebador", como se usa en el presente documento, es un oligonucleótido que es complementario a una porción del polinucleótido objetivo y, después de la hibridación con el polinucleótido objetivo, puede servir como punto de partida para una reacción de amplificación y la síntesis de un producto de amplificación. Los cebadores incluyen, pero no se limitan a, cebadores que se extienden. Un "par de cebadores" se refiere a dos cebadores que pueden usarse juntos para una reacción de amplificación. Un "cebador de PCR" se refiere a un cebador en un conjunto de al menos dos cebadores que son capaces de amplificar exponencialmente una secuencia de ácido nucleico objetivo en la reacción en cadena de la polimerasa.

El término "sonda" comprende un polinucleótido que comprende una porción específica diseñada para hibridar de una manera específica de la secuencia con una región complementaria de una secuencia de ácido nucleico específica, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico objetivo. En ciertas realizaciones, la porción específica de la sonda puede ser específica para una secuencia particular, o alternativamente, puede ser degenerada, por ejemplo, específica para un conjunto de secuencias. En ciertas realizaciones, la sonda está marcada. La sonda puede ser un oligonucleótido que es complementario a al menos una porción de un producto de amplificación formado usando dos cebadores.

Los términos "complemento" y "complementario" tal como se usan en la presente memoria, se refieren a la capacidad de dos polinucleótidos de cadena sencilla (por ejemplo, un cebador y un polinucleótido objetivo) para formar pares de bases entre sí, donde una adenina en una cadena de un polinucleótido emparejará las bases con una timina o un uracilo en una cadena de un segundo polinucleótido y una citosina en una cadena de un polinucleótido emparejará las bases con una guanina en una cadena de un segundo polinucleótido. Dos polinucleótidos son complementarios entre sí cuando una secuencia de nucleótidos en un polinucleótido puede formar pares de bases con una secuencia de nucleótidos en un segundo polinucleótido. Por ejemplo, 5'-ATGC y 5'-GCAT son complementarios.

Un "marcador" se refiere a una unidad estructural unida (covalente o no covalentemente), o capaz de unirse, a un oligonucleótido, que proporciona o es capaz de proporcionar información sobre el oligonucleótido (por ejemplo, información descriptiva o de identificación sobre el oligonucleótido) u otro polinucleótido con el que interactúa el oligonucleótido marcado (por ejemplo, se hibrida). Los marcadores se pueden usar para proporcionar una señal detectable (y opcionalmente cuantificable). Los marcadores también se pueden usar para unir un oligonucleótido a una superficie.

Un "fluoróforo" es una unidad estructural que puede emitir luz de una longitud de onda particular después de la absorción de luz de longitud de onda más corta. La longitud de onda de la luz emitida por un fluoróforo particular es característica de ese fluoróforo. De este modo, se puede detectar un fluoróforo particular detectando luz de una longitud de onda apropiada después de la excitación del fluoróforo con luz de longitud de onda más corta.

El término "atenuador" tal como se usa en el presente documento se refiere a una unidad estructural que absorbe la energía emitida por un fluoróforo, o interfiere de otro modo con la capacidad del colorante fluorescente para emitir luz. Un atenuador puede volver a emitir la energía absorbida desde un fluoróforo en una señal característica para ese atenuador, y así un atenuador también puede actuar como fluoróforo (un atenuador de fluorescencia). Este fenómeno se conoce generalmente como transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET). Alternativamente, un atenuador puede disipar la energía absorbida de un fluoróforo como calor (un atenuador no fluorescente).

Como se usa en este documento, el término "muestra" se refiere a un material de partida que se sospecha que alberga un microorganismo o grupo de microorganismos particulares. Una "muestra contaminada" se refiere a una muestra que alberga un microbio patógeno que comprende por lo tanto material de ácido nucleico del microbio patógeno. Ejemplos de muestras incluyen, pero no se limitan a, muestras de alimentos (incluyendo, pero sin limitarse a, muestras de alimentos destinados al consumo humano o animal, tales como producción de alimentos procesados, materiales de alimentos crudos, (por ejemplo, frutas y verduras), legumbres, carnes (de animales de ganado y/o animales de caza), pescado, mariscos, nueces, bebidas, caldos de fermentación y/o una matriz de alimentos enriquecida selectivamente que comprenda cualquiera de los alimentos enumerados anteriormente), muestras de agua, muestras ambientales (por ejemplo, muestras de suelo, muestras de suciedad, muestras de basura, muestras de aguas residuales, muestras de efluentes industriales, muestras de aire o muestras de agua de una variedad de cuerpos de agua tales como lagos, ríos, estanques etc.), muestras de aire (del medio ambiente o de una habitación o una construcción), muestras forenses, muestras agrícolas, muestras farmacéuticas, muestras biofarmacéuticas, muestras de superficies de procesamiento y fabricación de alimentos, y/o muestras biológicas.

Se divulgan composiciones, ensayos, métodos y kits para la detección específica de microorganismos que expresan factores de virulencia, así como organismos STEC a partir de muestras que incluyen muestras clínicas, muestras de alimentos, matrices complejas de alimentos, agua, una muestra de bebida, un caldo de fermentación, una muestra forense, una muestra ambiental (por ejemplo, tierra, suelo, basura, aguas residuales, aire o agua), incluidas las superficies de procesamiento y fabricación de alimentos, o una muestra biológica.

Una muestra puede analizarse directamente, o puede prepararse o procesarse de alguna manera antes de la prueba. Por ejemplo, una muestra puede procesarse para enriquecer cualquier microbio contaminante y puede procesarse adicionalmente para separar y/o lisar las células microbianas contenidas en la misma. Las células microbianas lisadas de una muestra pueden procesarse adicionalmente o prepararse para separar, aislar y/o extraer material genético del microbio para análisis para detectar y/o identificar el microbio contaminante. En algunas realizaciones descritas en este documento, la muestra puede someterse a separación para separar inicialmente microbios de interés de otros microbios y otros componentes de la muestra. Por ejemplo, para muestras complejas de alimentos con componentes complejos, se pueden usar métodos de separación para separar microorganismos de los alimentos. Los microbios separados de las muestras también se pueden enriquecer antes del análisis. El análisis de una muestra puede incluir uno o más métodos moleculares. Por ejemplo, de acuerdo con algunos ejemplos de realizaciones de la presente divulgación, una muestra puede someterse a amplificación de ácido nucleico (por ejemplo, mediante PCR) usando cebadores oligonucleótidos apropiados que son específicos para una o más secuencias de ácido nucleico microbiano con los cuales se sospecha está contaminada la muestra. Los productos de amplificación pueden someterse luego a pruebas con sondas específicas (o sondas informadoras) para permitir la detección de secuencias de ácidos nucleicos microbianos que se han amplificado a partir de la muestra. En algunas realizaciones, si se amplifica una secuencia de ácido nucleico microbiana a partir de una muestra, se puede realizar un análisis adicional sobre el producto de amplificación para identificar, cuantificar y analizar adicionalmente el microbio detectado (determinar parámetros tales como, pero sin limitarse a, cepa microbiana, patogenicidad, cantidad etc.).

Como se usa en la presente memoria, "preparar" o "preparar una muestra" o "procesar" o "procesar una muestra" se refiere a uno o más de las siguientes etapas para lograr la separación de microbios de los componentes de la muestra y en algunas realizaciones opcionalmente extracción y/o separación de un ácido nucleico de una muestra: (1) separación opcional de células bacterianas de componentes de la muestra (tal como una muestra de alimento), (2) enriquecimiento bacteriano opcional, (3) lisis celular opcional, y/o (4) opcionalmente extracción y/o purificación del ácido nucleico (por ejemplo, extracción de ADN, extracción total de ácidos nucleicos (es decir, ADN y ARN), extracción de ADN genómico, extracción de ARN). Los tipos de ácido nucleico extraídos incluyen, pero no se limitan a, ADN, ARN, ARNm y miARN.

Como se usa en este documento, "presencia" se refiere a la existencia (y por lo tanto a la detección) de una reacción, un producto de un método o un proceso (que incluye, pero no se limita a, un producto de amplificación resultante de una reacción de amplificación). O a la "presencia" y "detección" de un organismo tal como un organismo patógeno o una cepa o especie particular de un organismo.

Como se usa en el presente documento, "detección" o "detectar" se refiere a la divulgación o revelación de la presencia o ausencia en una muestra de una secuencia de polinucleótido objetivo o producto de la secuencia amplificada del polinucleótido objetivo. La detección puede ser por punto final, enzimática en tiempo real, y resolviendo el producto de amplificación en un gel y determinando si está presente el producto de amplificación esperado, u otros métodos conocidos por un experto en la técnica.

La presencia o ausencia de un producto amplificado se puede determinar o se puede medir su cantidad. La detección de un producto amplificado se puede llevar a cabo mediante métodos estándar bien conocidos en la técnica y usados rutinariamente. La detección puede ocurrir, por ejemplo, después de que se hayan ejecutado múltiples ciclos de amplificación (típicamente denominado como un análisis de punto final), o durante cada ciclo de amplificación (típicamente denominado como en tiempo real). La detección de un producto de amplificación después de que se hayan realizado múltiples ciclos de amplificación se logra fácilmente, por ejemplo, resolviendo el producto de amplificación en un gel y determinando si está presente el producto de amplificación esperado. Para facilitar la detección o cuantificación en tiempo real de los productos de amplificación, se pueden marcar uno o más de los cebadores y/o sondas utilizados en la reacción de amplificación, y hay varios formatos disponibles para generar una señal detectable que indique que está presente un producto de amplificación. Por ejemplo, un marcador conveniente es típicamente un marcador que es fluorescente, que se puede usar en diversos formatos que incluyen, pero no se limitan a, el uso de marcadores fluoróforos donantes, marcadores fluoróforos aceptores, fluoróforos, atenuadores y combinaciones de los mismos. Los ensayos que utilizan estos diversos formatos pueden incluir el uso de uno o más cebadores que están marcados (por ejemplo, cebadores de escorpiones, cebadores Amplifluor), una o más sondas que están marcadas (por ejemplo, sondas adyacentes, sondas TaqMan®, sondas de encendido, balizas moleculares), o una combinación de las mismas. El experto en la materia a la vista de las presentes enseñanzas comprenderá que, además de estos formatos conocidos, se divulgan de forma rutinaria nuevos tipos de formatos. La presente invención no está limitada por el tipo de método o los tipos de sondas y/o cebadores usados para detectar un producto amplificado. Usando marcadores apropiados (por ejemplo, fluoróforos diferentes) es posible combinar (multiplexar) los resultados de varios pares de cebadores diferentes (y, opcionalmente, sondas si están presentes) en una sola reacción. Como alternativa a la detección usando un cebador y/o sonda marcados, se puede detectar un producto de amplificación usando un colorante de unión a polinucleótido tal como un colorante fluorescente de unión a ADN. Los ejemplos incluyen, por ejemplo, colorante SYBR® Green o colorante SYBR® Gold (Molecular Probes). Tras la interacción con el producto de amplificación de doble cadena, dichos colorantes de unión a polinucleótidos emiten una señal de fluorescencia después de la excitación con luz a una longitud de onda adecuada. También se puede usar un colorante de unión a polinucleótido tal como un colorante de intercalación de polinucleótido.

Como se usa en este documento, un "polinucleótido específico objetivo" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que es capaz de hibridarse específicamente con un gen y/o un alelo y/o una porción del mismo y/o un complemento del mismo que codifica un objetivo (toxina Shiga, *eae*, o un objetivo específico para un patógeno Big 6 o para *E. coli* O157: H7), bajo condiciones de hibridación adecuadas y que no hibridan con otras secuencias de ácido nucleico que no codifican para el objetivo o porciones del mismo o complementos del mismo. En algunas realizaciones, un "polinucleótido específico del objetivo" de la divulgación puede ser una secuencia de sonda o cebador descrita en las SEQ ID NOS: 1-38. Está dentro de la capacidad de un experto en la técnica, usando las presentes enseñanzas, determinar condiciones de hibridación adecuadas con base en la longitud de la sonda, el contenido de G+C, y el grado de rigurosidad requerido para una aplicación particular.

Se espera que variaciones de secuencia menores en secuencias de nucleótidos objetivo específicas del factor de virulencia y secuencias de nucleótidos objetivo específicas de microorganismos asociadas con adiciones, eliminaciones y mutaciones de nucleótidos, ya sean naturales o introducidas *in vitro*, no interfieran con la utilidad de las diversas secuencias de ácido nucleico del cebador y la sonda divulgadas en la presente memoria, como entendería un experto en la técnica. Por lo tanto, el alcance de la presente invención según se reivindica pretende abarcar variaciones menores en las secuencias de las descritas en el presente documento y secuencias que tienen al menos un 90% de homología con las secuencias de cebador y sonda divulgadas en la presente memoria.

Una sonda puede ser ARN o ADN. Dependiendo de los medios de detección empleados, la sonda puede estar sin marcar, radiomarcada, marcada en forma quimioluminiscente, marcada con enzima o marcada con un colorante. La sonda puede hibridarse con una muestra en solución o inmovilizarse sobre un soporte sólido tal como nitrocelulosa, un microarreglo o una membrana de nailon, o la sonda puede inmovilizarse en un soporte sólido, tal como un chip de silicio o un microarreglo.

Las condiciones que "permiten" que ocurra un evento o condiciones que son "adecuadas" para que ocurra un evento, tales como hibridación, extensión de cadena y similares, o condiciones "adecuadas" son condiciones que no evitan que tales eventos ocurran. Por lo tanto, estas condiciones permiten, mejoran, facilitan y/o son propicias para el evento. Tales condiciones, conocidas en la técnica y descritas en este documento, pueden depender de, por ejemplo, la naturaleza de la secuencia de nucleótidos, la temperatura y las condiciones del regulador. Estas condiciones también pueden depender de qué evento se desee, tal como hibridación, escisión o extensión de la cadena. Un polinucleótido "aislado" se refiere a un polinucleótido que se ha removido de su entorno natural. Un polinucleótido "purificado" es uno que esta al menos aproximadamente 60% libre, preferiblemente al menos aproximadamente 75% libre, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 90% libre de otros componentes con los que está asociado de forma natural.

Las palabras "preferido" y "preferiblemente" se refieren a realizaciones de la invención que pueden proporcionar ciertos beneficios, en ciertas circunstancias. Sin embargo, también se pueden preferir otras formas de realización, bajo las mismas u otras circunstancias. Además, la mención de una o más realizaciones preferidas no implica que otras realizaciones no sean útiles, y no pretende excluir otras realizaciones del alcance de la invención.

Los términos "comprende" y variaciones de los mismos no tienen un significado limitante cuando estos términos aparecen en la descripción y las reivindicaciones. A menos que se especifique lo contrario, "un", "uno, una", "el, la" y "al menos uno" se usan indistintamente y significan uno o más de uno.

También en este documento, las menciones de rangos numéricos por puntos extremos incluyen todos los números que están dentro de ese intervalo (por ejemplo, 1 a 5 incluye 1; 1,5; 2; 2,75; 3; 3,80; 4; 5, etc.). El término "y/o" significa uno o todos los elementos enumerados o una combinación de dos o más de los elementos enumerados.

Hay muchos métodos conocidos para amplificar secuencias de ácido nucleico que incluyen, por ejemplo, PCR. Véase, por ejemplo, PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (ed. H. A. Erlich, Freeman Press, NY, N.Y., 1992); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (eds. Innis, et al., Academic Press, San Diego, Calif., 1990); Mattila et al., Nucleic Acids Res. 19, 4967 (1991); Eckert et al., PCR Methods and Applications 1, 17 (1991); PCR (eds. McPherson et al., IRL Press, Oxford); y las patentes de Estados Unidos Nos. 4.683.202, 4.683.195, 4.800.159, 4.965.188 y 5.333.675.

Las técnicas de amplificación de ácido nucleico se clasifican tradicionalmente de acuerdo con los requisitos de temperatura del proceso de amplificación. Las amplificaciones isotérmicas se realizan a temperatura constante, en contraste con las amplificaciones que requieren ciclos entre altas y bajas temperaturas. Ejemplos de técnicas de amplificación isotérmica son: amplificación por desplazamiento de cadena (SDA; Walker et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:392-396; Walker et al., 1992, Nuc. Acids. Res. 20: 1691-1696; y el documento EP 0 497 272, replicación de secuencia autosostenida (3SR; Guatelli et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874-1878), el sistema Q β replicasa (Lizardi et al., 1988, BioTechnology 6: 1197-1202) y las técnicas divulgadas en los documentos WO 90/10064 y WO 91/03573.

Ejemplos de técnicas que requieren ciclos de temperatura son: reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Saiki et al., 1985, Science 230: 1350-1354), reacción en cadena de la ligasa (LCR; Wu et al., 1989, Genomics 4: 560-569 Barringer et al., 1990, Gene 89: 117-122, Barany, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 189-193), amplificación basada en la

transcripción (Kwoh et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173-1177) y amplificación de restricción (Patente de los Estados Unidos No. 5.102.784).

Otros ejemplos de técnicas incluyen amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico ("NASBA"; véase la patente de Estados Unidos No. 5.130.238), el sistema Q β replicasa (véase Lizardi et al., BioTechnology 6: 1197 (1988)), y amplificación por círculo rodante (véase Lizardi et al., Nat Genet 19: 225-232 (1998)). Los cebadores de amplificación de la presente invención se pueden usar para llevar a cabo, por ejemplo, pero sin limitarse a, PCR, SDA o tSDA. Cualquiera de las técnicas y métodos de amplificación divulgados en la presente memoria se pueden usar para practicar la invención reivindicada como entenderán los expertos en la técnica.

La PCR es una técnica extremadamente poderosa para amplificar secuencias específicas de polinucleótidos, que incluyen ADN genómico, ADNc de cadena sencilla y ARNm, entre otros. Los expertos en la técnica conocerán diversos métodos para llevar a cabo la amplificación por PCR y el diseño y construcción de cebadores para la amplificación por PCR. En general, en la PCR, se desnaturaliza el ADN de doble cadena que se va a amplificar calentando la muestra. A continuación, se ceba la nueva síntesis de ADN hibridando cebadores con la secuencia objetivo en presencia de ADN polimerasa y dNTP en exceso. En ciclos posteriores, los cebadores hibridan con el ADN recién sintetizado para producir productos discretos con las secuencias de cebador en cada extremo. Los productos se acumulan exponencialmente con cada ronda sucesiva de amplificación.

La ADN polimerasa utilizada en la PCR es a menudo una polimerasa termoestable. Esto permite que la enzima continúe funcionando después de ciclos repetidos de calentamiento necesarios para desnaturalizar el ADN de doble cadena. Las polimerasas que son útiles para la PCR incluyen, por ejemplo, ADN polimerasa Taq, ADN polimerasa Tth, ADN polimerasa Tfl, ADN polimerasa Tma, ADN polimerasa Tli y ADN polimerasa Pfu. Hay muchas formas modificadas disponibles comercialmente de estas enzimas, que incluyen: AmpliTaq® y AmpliTaq Gold®, ambas disponibles a través de Applied Biosystems. Muchas están disponibles con o sin una actividad de exonucleasa de corrección de 3' a 5'. Véase, por ejemplo, Vent® y Vent® (exo-) disponibles a través de New England Biolabs.

Otros métodos de amplificación adecuados incluyen la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (por ejemplo, Wu y Wallace, Genomics 4, 560 (1989) y Landegren et al., Science 241, 1077 (1988)), amplificación de la transcripción (Kwoh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1173 (1989)), y replicación de secuencia autosostenida (Guatelli et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 87, 1874 (1990)) amplificación de secuencia basada en ácido nucleico (NABSA). (Véanse las patentes de Estados Unidos Nos 5.409.818, 5.555.17 y 6.063.603). Los dos últimos métodos de amplificación incluyen reacciones isotérmicas basadas en la transcripción isotérmica, que producen tanto ARN de cadena sencilla (ARNcs) como ADN de cadena doble (ADNcd) como los productos de amplificación en una relación de aproximadamente 30 o 100 a 1, respectivamente.

La presente divulgación, en algunas realizaciones, describe composiciones, kits y métodos para la detección de uno o más microorganismos que expresan el factor de virulencia tal como *eae* y/o *stx*. La presente divulgación, en algunas realizaciones también describe composiciones, kits y métodos para la detección de uno o más microbios STEC que incluyen microorganismos STEC *E. coli* O157:H7 y sin-O157:H7. Algunos microbios STEC sin O157:H7 incluyen una *E. coli* O26, una *E. coli* O45, una *E. coli* O103, una *E. coli* O111, una *E. coli* O121 y una *E. coli* O145.

Algunas especies de *Escherichia coli* (*E. coli*) tienen el potencial de ser patógenas para los seres humanos. Entre estos se encuentran el grupo Shigatoxigénico de *E. coli* (conocido como STEC o VTEC) que produce toxinas Shiga (también conocidas como verotoxinas). Estas toxinas son proteínas codificadas por genes *stx* (*stx1* y/o *stx2*) y pueden producir síntomas que van desde simple diarrea hasta diarrea hemorrágica. Algunos STEC pueden ser letales para los humanos, especialmente los bebés menores de cinco años y los humanos inmunocomprometidos. Algunos STEC no solo producen una o más toxinas Shiga, sino que también se pueden unir a la pared intestinal debido a una proteína intimina (una adhesina) codificada por un gen llamado *eae*. *E. coli* que porta estos dos genes (*stx* y *eae*) se han identificado previamente como responsables del síndrome urémico y hemolítico (UHS). Se conocen comúnmente como *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC). La presente especificación se refiere a las toxinas Shiga y a los genes *eae* como factores de virulencia, ya que contribuyen a la virulencia de los microorganismos STEC.

Además de *E. coli* O157:H7, el USDA-FSIS ha identificado recientemente seis cepas STEC *E. coli* sin -O157:H7 incluyendo los serotipos de *E. coli* O26, O45, O103, O111, O121, O145 como microbios que deben analizarse como contaminantes de los alimentos para prevenir y reducir la incidencia de brotes y muertes por patógenos transmitidos por los alimentos. La Asociación Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) también exige pruebas de al menos cuatro de estos serotipos de *E. coli* que incluyen O26, O103, O111, O145.

Las composiciones, kits y métodos de la presente divulgación proporcionan pruebas rápidas para detectar estos contaminantes microbianos en muestras que incluyen muestras de alimentos complejos.

Algunas realizaciones describen composiciones, kits y métodos para la detección de microorganismos que expresan un factor de virulencia. Los factores de virulencia comprenden uno o más genes, alelos y/o variantes que codifican aun *stx* y/o un *eae*. En algunas realizaciones, la detección de factores de virulencia en un microorganismo puede comprender la detección de uno o más genes, alelos y/o porciones y/o fragmentos y/o complementos de los mismos que codifican una

toxina Shiga y/o un *eae*.

Las toxinas Shiga son una familia de toxinas relacionadas con dos grupos principales, *Stx1* y *Stx2*, cuyos genes codificados por los loci denominados *stx1* y *stx2* respectivamente se consideran parte del genoma de los profagos lambdoides. Estas toxinas se describieron por primera vez para explicar el origen bacteriano de la disentería causada por *Shigella dysenteriae*. Las fuentes más comunes para las toxinas Shiga son las bacterias *S. dysenteriae* y el grupo Shigatoxigénico de *Escherichia coli* (STEC), que incluye los serotipos O157:H7, O104:H4 y otros *E. coli* enterohemorrágicos (EHEC).

En una realización de la especificación actual, se llevaron a cabo comparaciones bioinformáticas y secuenciación directa de ADN de varios organismos que expresan toxinas Shiga en un esfuerzo por identificar secuencias codificantes de toxina Shiga, denominadas colectivamente como loci de *stx*. La alineación de estas secuencias utilizando algoritmos personalizados identificó varias regiones objetivo de *stx* para las que se diseñaron pares de cebadores de la divulgación para cada una de las regiones objetivo de *stx* identificadas para amplificar específicamente solo las secuencias objetivo únicas de *stx* tanto contra la inclusión (organismo que se va a detectar, es decir, organismos productores de toxina Shiga) como genomas de exclusión (organismos que no se van a detectar, organismos que no producen toxina Shiga).

Varios programas para el diseño de cebadores tales como Primer3 (Steve Rozen y Helen J. Skaletsky (2000) "Primer3" en la World Wide Web para usuarios generales y para programadores biólogos como se publica en: Krawetz S, Misener S (editores) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology, Human Press, Totowa, NJ, páginas 365-386), el software Primer Express® (Applied Biosystems), y OLIGO 7 (Wojciech Rychlik (2007). "OLIGO 7 Primer Analysis Software". Methods Mol. Biol. 402: 35-60) y variaciones de los mismos se pueden usar para el diseño de cebadores. Los cebadores y sondas de PCR diseñados posteriormente para uso en ensayos mediante PCR en tiempo real detectaron inequívocamente, específicamente y con gran sensibilidad a los organismos productores de toxinas Shiga y a los organismos que codifican *eae*.

En algunas realizaciones, se describen composiciones que comprenden secuencias de cebador y/o sonda que comprenden secuencias aisladas de ácido nucleico que tienen la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NOS: 1-14, complementos de las mismas y secuencias que tienen aproximadamente 90% de identidad con las secuencias anteriores. En algunas realizaciones, la presente divulgación describe el diseño de cebadores degenerados. En algunas realizaciones, la presente divulgación describe el diseño de cebadores múltiples que pueden ser adecuados para el tipo de ensayos de PCR múltiples. En algunas realizaciones, las composiciones de secuencia aislada de ácido nucleicos de la divulgación pueden comprender adicionalmente uno o más marcadores, tales como, pero sin limitarse a, un colorante, un isótopo radiactivo, un marcador quimioluminiscente, una unidad estructural fluorescente, un marcador bioluminiscente, una enzima y combinaciones de los mismos.

La memoria descriptiva también describe métodos para la detección de un organismo productor de toxina Shiga a partir de una muestra y describe métodos para excluir la presencia de un organismo productor de toxina Shiga en una muestra, donde la detección de al menos una secuencia de ácido nucleico que se expresa en un organismo productor de toxina Shiga es indicativo de la presencia de un organismo productor de toxina Shiga y la ausencia de detección de cualquier secuencia de ácido nucleico única para el organismo productor de toxina Shiga es indicativa de la ausencia de un organismo productor de toxina Shiga en la muestra.

En algunas realizaciones, se describen métodos para detectar en una muestra la presencia de microorganismos de diferentes especies, serotipos y cepas que codifican un factor de virulencia de toxina Shiga. En algunas realizaciones, los métodos para detectar la presencia de cepas de *E. coli* que producen toxina Shiga (se describen organismos STEC). En algunas realizaciones, se describen métodos para detectar la presencia de cepas de *Shigella* productoras de toxina Shiga.

Un método de la divulgación, en algunas realizaciones, puede comprender detectar, en una muestra, al menos una (o más) secuencias de ácido nucleico que tienen al menos 10 a al menos 25 ácidos nucleicos de uno (o más) loci que codifican toxina Shiga tales como *stx1* y/o *stx2* y/o secuencias complementarias de los mismos, en donde la detección de al menos una secuencia de ácido nucleico indica la presencia de un organismo que produce toxina Shiga en la muestra. Los métodos de detección también pueden comprender etapas de identificación y pueden comprender además etapas de preparación de la muestra. Estas realizaciones se describen en detalle en otras secciones de esta solicitud.

La detección de organismos productores de toxina Shiga mediante el uso de métodos descritos en este documento pueden usar una reacción en cadena de la polimerasa para una detección rápida. En general, todos los métodos de la divulgación pueden incluir la comparación de la presencia de un organismo que expresa *stx* usando controles adecuados, por ejemplo, puede usarse un control positivo interno en una reacción de PCR que tendrá una señal detectable/resultado positivo, también puede ser utilizado un control negativo adecuado que no tendrá señal detectable.

En una realización, un método para la detección de un organismo productor de toxina Shiga a partir de una muestra puede comprender: detectar la presencia de un ácido nucleico que codifica *Stx1* y/o un fragmento o un complemento del mismo que comprende: poner en contacto ácidos nucleicos presentes en la muestra con al menos un conjunto de cebadores, que tiene un cebador directo y un cebador inverso, que comprende cebadores que tienen la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2 en condiciones adecuadas para la amplificación; amplificar un ácido nucleico que codifica para el *Stx1*

y/o un fragmento o un complemento del mismo; y detectar un ácido nucleico amplificado, donde la detección/presencia de un ácido nucleico amplificado usando dichos cebadores confirma la presencia de un organismo productor de *stx1* en una muestra y no detectar un ácido nucleico amplificado indica la ausencia de organismo productor de *stx1*. Se puede usar una sonda que tiene la SEQ ID NO: 3 para detectar un producto de amplificación *stx1* amplificado mediante cebadores con la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, respectivamente.

Otro método de realización para la detección de un organismo productor de toxina Shiga a partir de una muestra puede comprender: detectar la presencia de un ácido nucleico que codifica *stx2* y/o un fragmento o un complemento del mismo que comprende: poner en contacto ácidos nucleicos presentes en la muestra con al menos un conjunto de cebadores, teniendo cada conjunto de cebadores un cebador directo y un cebador inverso, que comprende al menos un conjunto de cebadores seleccionado entre: un primer conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 5; y/o un segundo conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 6 y la SEQ ID NO: 7; y/o un tercer conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 9; proporcionar condiciones adecuadas para una reacción de amplificación de ácido nucleico para amplificar un ácido nucleico que codifica *stx2* y/o un fragmento o un complemento del mismo; y detectar un ácido nucleico amplificado, en el que la detección de un ácido nucleico amplificado usando dichos cebadores confirma la presencia de un organismo productor de *stx2* en una muestra y la no detección de un ácido nucleico amplificado indica la ausencia de un organismo productor de *stx2*. En algunas realizaciones, se pueden usar al menos dos conjuntos de cebadores para detectar un microbio con *stx2*. Se puede usar una sonda que tiene la SEQ ID NO: 10 para detectar el producto de amplificación de *stx1* amplificado por cada uno de los conjuntos de cebadores de *stx2* descritos en la presente memoria.

Algunas realizaciones describen un método para la detección de un organismo productor de toxina Shiga a partir de una muestra que comprende: detectar la presencia de uno o más ácidos nucleicos que codifican *stx* incluyendo la detección de un ácido nucleico que codifica *stx1* y/o un fragmento o un complemento del mismo que comprende y/o detecta un ácido nucleico que codifica *stx2* y/o un fragmento o un complemento del mismo que comprende: a) amplificar a partir de una muestra ácido nucleico que codifica *stx1* y/o un fragmento o un complemento del mismo poniendo en contacto ácidos nucleicos presentes en la muestra con al menos un conjunto de cebadores, que tiene un cebador directo y un cebador inverso, que comprende cebadores que tienen la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2; y b) amplificar simultáneamente a partir de la misma muestra un ácido nucleico que codifica *stx2* y/o un fragmento o un complemento del mismo poniendo en contacto simultáneamente ácidos nucleicos presentes en la muestra con al menos un conjunto de cebadores, teniendo cada conjunto de cebadores un cebador directo y un cebador inverso, que comprende el al menos un conjunto de cebadores seleccionado entre: un primer conjunto de cebadores que tienen la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 5; y/o un segundo conjunto de cebadores que tienen la SEQ ID NO: 6 y la SEQ ID NO: 7; y/o un tercer conjunto de cebadores que tienen la SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 9, en la que el contacto se realiza en condiciones adecuadas para una reacción de amplificación de ácido nucleico; y detectar al menos un ácido nucleico amplificado, amplificado por las reacciones de amplificación ya se de las etapas a) y/o b), en la que la detección de al menos un ácido nucleico amplificado indica la presencia de un organismo productor de toxina Shiga en la muestra.

En una realización, el método para la detección de un organismo productor de toxina Shiga a partir de una muestra puede comprender: detectar la presencia de uno o más de los ácidos nucleicos que codifican *stx1* y/o *stx2* y/o un fragmento o un complemento del mismo que comprende: poner en contacto ácidos nucleicos presentes en una muestra con un múltiplex de conjuntos de cebadores que comprende al menos dos conjuntos de cebadores, teniendo cada conjunto de cebadores un cebador directo y un cebador inverso, teniendo el primer conjunto de cebadores la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2 y el segundo conjunto de cebadores seleccionado de: un conjunto de cebadores que tienen la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 5; y/o un conjunto de cebadores que tienen la SEQ ID NO: 6 y la SEQ ID NO: 7; y/o un conjunto de cebadores que tienen la SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 9; proporcionar condiciones óptimas para una reacción de amplificación para obtener uno o más ácidos nucleicos amplificados; y detectar uno o más ácidos nucleicos amplificados, en la que la detección de un ácido nucleico amplificado usando el primer conjunto de cebadores indica la presencia de un organismo productor de *stx1* y la detección de un ácido nucleico amplificado usando el segundo conjunto de cebadores indica la presencia un alelo de *stx2* en la muestra.

En otras realizaciones, se puede usar no detectar ningún producto amplificado usando los métodos descritos anteriormente para excluir la presencia de un organismo productor de toxina Shiga en una muestra.

En algunas realizaciones de los presentes métodos, un solo ensayo no puede ser definitivo para detectar un organismo productor de toxina Shiga debido a la similitud genómica entre las regiones genómicas de otros organismos productores de toxina no Shiga. Sin embargo, cuando dos (o más) ensayos tales como, pero sin limitarse a, los ensayos mostrados en la Tabla 1 se usan ya sea en paralelo o como un ensayo múltiple, por ejemplo, en un ensayo TaqMan® en tiempo real, donde cada sonda en cada uno de los dos (o más) ensayos tiene una marca diferente para distinguir los resultados en un instrumento de PCR en tiempo real, por ejemplo, un sistema de PCR rápida en tiempo real 7500 (Applied Biosystems), un resultado positivo de dicho ensayo es indicativo de la presencia de un organismo productor de toxina Shiga.

En otras realizaciones, puede usarse un enfoque de ensayo doble o múltiple (más de 2 conjuntos de ensayos) para detectar y distinguir el organismo productor de toxina Shiga. En algunas realizaciones, el ensayo puede comprender detectar la presencia de genes, alelos y/o fragmentos de dichos genes/alelos que codifican uno o más loci génicos que

codifican la toxina Shiga tales como, pero sin limitarse a, *stx1* y *stx2*. Algunas realizaciones describen la detección de todos estos loci génicos como la identificación positiva de un organismo productor de toxina Shiga. Algunas realizaciones describen la detección de al menos dos de estos loci génicos como identificación positiva de un organismo productor de toxina Shiga.

5

En algunas realizaciones, la presente divulgación describe una secuencia aislada de ácido nucleico que comprende las SEQ ID NO: 11-SEQ ID NO: 14, fragmentos de las mismas, complementos de las mismas, secuencias que comprenden al menos un 90% de identidad de secuencia de ácido nucleico y derivados marcados de las mismas. Estas incluyen secuencias de cebador y sonda operables para unirse y/o amplificar y/o detectar y/o identificar cualquiera de los aproximadamente 25 alelos del gen *eae* que codifica intimina.

10

En una realización, el método para la detección de un organismo que expresa *eae* a partir de una muestra puede comprender: detectar la presencia de uno o más ácidos nucleicos que codifican *eae* y/o un fragmento o un complemento del mismo que comprende: poner en contacto ácidos nucleicos presentes en una muestra con al menos un conjunto de cebadores seleccionado entre: un primer conjunto de cebadores que tienen la SEQ ID NO: 11 y la SEQ ID NO: 12, y/o un segundo cebador que tiene la SEQ ID NO: 11 y la SEQ ID NO: 13; proporcionar condiciones óptimas para una reacción de amplificación para obtener uno o más ácidos nucleicos amplificados; y detectar uno o más ácidos nucleicos amplificados, en el que la detección de un ácido nucleico amplificado usando dichos cebadores confirma la presencia de un organismo que expresa *eae* en la muestra. Un ácido nucleico amplificado correspondiente a un gen *eae* o un fragmento del mismo puede detectarse mediante una secuencia de sonda que tiene la SEQ ID NO: 14.

15

20

Algunas realizaciones se refieren a composiciones que comprenden secuencias aisladas de ácido nucleico que son operables para hibridar con regiones de ácido nucleico que se encuentran de manera única en un microorganismo STEC. Las regiones de ácido nucleico encontradas exclusivamente en un microorganismo específico STEC se denominan en la presente memoria como ácidos nucleicos objetivo específicos de microorganismos o ácidos nucleicos objetivo específicos de microorganismos STEC.

25

Se realizaron comparaciones bioinformáticas y secuencia directa de ADN de varios organismos STEC en un esfuerzo para identificar diversas secuencias de ácido nucleico objetivo específicas de STEC, también denominadas aquí ácidos nucleicos objetivo específicos de microorganismos (o regiones de ácido nucleico o regiones objetivo). La alineación de estas secuencias usando algoritmos personalizados identificó varias regiones de ácido nucleico objetivo de STEC con las cuales se diseñaron pares de cebadores descritos en este documento para cada una de las regiones objetivo de STEC identificadas, para amplificar específicamente solo las secuencias objetivo únicas de STEC contra ambas inclusiones (organismo a detectar, es decir, organismos STEC) y genomas de exclusión (organismos que no se van a detectar, organismos no STEC). Las regiones objetivo específicas de STEC también se usaron para diseñar sondas que se pueden usar para hibridar y detectar objetivos amplificados específicos de STEC o regiones específicas de STEC en ácidos nucleicos microbianos aislados.

30

35

En algunas realizaciones, la presente divulgación describe una secuencia aislada de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 15-SEQ ID NO: 32, fragmentos de las misma, complementos de las misma, secuencias que comprenden al menos 90% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos y derivados marcados de los mismos. Estos incluyen secuencias de cebador y sonda operables para unirse a y/o amplificar y/o detectar y/o identificar una STEC *E. coli* de una cepa que incluye O26, O45, O103, O111, O145 y O121.

40

45

En algunas realizaciones, la presente divulgación describe el diseño de cebadores degenerados. En algunas realizaciones, la presente divulgación describe el diseño de cebadores múltiples que pueden ser adecuados para el tipo de ensayos de PCR múltiple. En algunas realizaciones, las composiciones de secuencias aisladas de ácido nucleico de la divulgación incluyen cebadores y sondas que pueden comprender además uno o más marcadores, tales como, pero sin limitarse a, un colorante, un isótopo radiactivo, un marcador quimioluminiscente, una unidad estructural fluorescente, un marcador bioluminiscente, una enzima y sus combinaciones.

50

Secuencias de cebadores y sondas operables para unirse a y/o amplificar y/o detectar y/o identificar un microorganismo *E. coli* O157:H7 se describen en la SEQ ID NOS: 33-SEQ ID NO: 38. Secuencias, composiciones de los mismos y métodos para la detección de una *E. coli* O157:H7 también se describen en la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos, serie No. 61/178.931, presentada el 15 de mayo de 2009 (No. de registro del abogado LT00032Pro); la solicitud de patente, número de serie 12/780,707 presentada el 14 de mayo de 2010 (No. de registro del abogado LT00032US); solicitud PCT serial No. PCT/US2010/034998, presentada el 14 de mayo de 2010 (No. de registro del abogado LT00032PCT); y la solicitud de patente europea con número de serie 10720105.5, presentada el 14 de mayo de 2010 (No. de registro del abogado LT00032EP).

55

60

La presente solicitud, en algunas realizaciones, describe métodos para detectar diversas cepas de STEC de *E. coli* tales como una *E. coli* O157:H7, una *E. coli* O26, una *E. coli* O45, una *E. coli* O103, una *E. coli* O111, una *E. coli* O121 y una *E. coli* O145 en una muestra, en la que la detección de al menos una secuencia de ácido nucleico que se expresa en un organismo STEC es indicativa de la presencia de un organismo STEC en la muestra. Métodos para excluir la presencia de *E. coli* STEC en una muestra también se describen en los que la ausencia de detección de cualquier secuencia de ácido nucleico única para un organismo STEC es indicativa de la ausencia de un organismo STEC en la muestra.

65

Algunos métodos divulgados en la presente memoria son métodos sencillos y algunos métodos divulgados en la presente memoria son métodos múltiples.

5 Un método de la divulgación, en algunas realizaciones, puede comprender detectar, en una muestra, al menos una (o más) secuencias de ácido nucleico que tienen de al menos 10 a al menos 25 ácidos nucleicos de uno (o más) ácidos nucleicos únicos para un organismo STEC, o una secuencia complementaria de los mismos, en la que la detección de al menos una secuencia de ácido nucleico única para un microbio STEC indica la presencia de un organismo STEC en la muestra. Los métodos de detección también pueden comprender etapas de identificación. Estas realizaciones se describen en detalle en las secciones a continuación de esta solicitud.

15 Algunas realizaciones describen métodos para la detección de una *E. coli* O121 en una muestra que comprende: hibridar al menos un primer par de cebadores de amplificación de ácidos nucleicos que comprenden ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 15 y la SEQ ID NO: 16, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de los mismos, complementos de los mismos, y las secuencias que tienen al menos 90% de homología con los mismos, con al menos una primera secuencia del polinucleótido objetivo presente en la muestra; amplificar al menos la primera secuencia del polinucleótido objetivo o un fragmento o un complemento de la misma para obtener al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; y detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; en el que la detección de al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo es indicativa de la presencia de una *E. coli* O121 en la muestra. Un método para detectar *E. coli* O121 puede comprender además usar una sonda para detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo en el que la sonda comprende una secuencia de SEQ ID NO: 17, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de la misma, complementos de la misma y secuencias que tienen al menos 90% de homología con la misma.

25 Algunas realizaciones describen métodos para la detección de una *E. coli* O145 en una muestra que comprende: hibridar al menos un primer par de cebadores de amplificación de ácidos nucleicos que comprenden ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 18 y la SEQ ID NO: 19, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de los mismos, complementos de los mismos, y secuencias que tienen al menos 90% de homología con la misma, con al menos una primera secuencia del polinucleótido objetivo presente en la muestra; amplificar al menos la primera secuencia del polinucleótido objetivo o un fragmento o un complemento de la misma para obtener al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; y detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; en el que la detección de al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo es indicativa de la presencia de una *E. coli* O145 en la muestra. Un método para detectar una *E. coli* O145 puede comprender además usar una sonda para detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo donde la sonda comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 20, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de la misma, complementos de la misma y secuencias que tienen al menos 90% de homología con la misma.

40 Algunas realizaciones describen métodos para la detección de una *E. coli* O26 en una muestra y comprende: hibridar al menos un primer par de cebadores de amplificación de ácidos nucleicos que comprenden ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 21 y la SEQ ID NO: 22, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de los mismos, complementos de los mismos, y secuencias que tienen al menos 90% de homología con los mismos, con al menos una primera secuencia del polinucleótido objetivo presente en la muestra; amplificar al menos la primera secuencia del polinucleótido objetivo o un fragmento o un complemento de la misma para obtener una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; y detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; en el que la detección de al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo es indicativa de la presencia de una *E. coli* O26 en la muestra. Un método para detectar una *E. coli* O26 puede comprender además usar una sonda para detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo en la que la sonda comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 23, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de la misma, complementos de la misma y secuencias que tienen al menos 90% de homología con la misma.

50 Algunas realizaciones describen métodos para la detección de una *E. coli* O45 en una muestra que comprende: hibridar al menos un primer par de cebadores de amplificación de ácidos nucleicos que comprenden ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 24 y la SEQ ID NO: 25, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de los mismos, complementos de los mismos, y secuencias que tienen al menos 90% de homología con la misma, con al menos una primera secuencia del polinucleótido objetivo presente en la muestra; amplificar al menos la primera secuencia del polinucleótido objetivo o un fragmento o un complemento de la misma para obtener una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; y detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; en el que la detección de al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo es indicativa de la presencia de una *E. coli* O45 en la muestra. Un método para detectar una *E. coli* O45 puede comprender además usar una sonda para detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo en el que la sonda comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 26, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de la misma, complementos de la misma y secuencias que tienen al menos 90% de homología con la misma.

65 Algunas realizaciones describen métodos para la detección de una *E. coli* O103 en una muestra que comprende: hibridar al menos un primer par de cebadores de amplificación de ácidos nucleicos que comprenden ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 27 y la SEQ ID NO: 28, complementos de los mismos, y secuencias que tienen al menos 90% de

homología con los mismos, con al menos un primera secuencia del polinucleótido objetivo presente en la muestra; amplificar al menos la primera secuencia del polinucleótido objetivo o un fragmento o un complemento de la misma para obtener una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; y detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; en el que la detección de al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo es
 5 indicativa de la presencia de una *E. coli* O103 en la muestra. Un método para detectar una *E. coli* O103 puede comprender además usar una sonda para detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo en el que la sonda comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 29, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de la misma, complementos de la misma y secuencias que tienen al menos 90% de homología con la misma.

10 Algunas realizaciones describen métodos para la detección de una *E. coli* O111 en una muestra que comprende: hibridar al menos un primer par de cebadores de amplificación de ácidos nucleicos que comprenden ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 30 y la SEQ ID NO: 31, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de los mismos, complementos de los mismos y secuencias que tienen al menos 90% de homología con los mismos, con al menos una
 15 primera secuencia del polinucleótido objetivo presente en la muestra; amplificar al menos la primera secuencia del polinucleótido objetivo o un fragmento o un complemento de la misma para obtener una secuencia amplificada de polinucleótidos objetivo; y detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; en el que la detección de al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo es indicativa de la presencia de una *E. coli* O111 en la muestra. Un método para detectar una *E. coli* O111 puede comprender además usar una sonda para
 20 detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo en el que la sonda comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 32, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de la misma, complementos de la misma y secuencias que tienen al menos 90% de homología con la misma.

La detección de las cepas de STEC descritas en la presente memoria pueden usar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación rápida y la detección de regiones objetivo. En general, todos los métodos de la
 25 divulgación pueden incluir comparar la detección o ausencia de un organismo STEC utilizando un control adecuado, por ejemplo, un control positivo interno puede usarse en una reacción de PCR que tendrá una señal detectable/resultado positivo y también se puede usar un control negativo adecuado que no tendrá señal detectable.

30 En algunas realizaciones, los métodos para detectar en una muestra la presencia de microorganismos STEC pueden comprender además detectar la presencia de ácido nucleico que codifica *stx* y/o un ácido nucleico que codifica *eae*.

La memoria descriptiva, en algunas realizaciones, describe un método para la detección de uno o más microorganismos, cada microorganismo que expresa uno o más factores de virulencia que comprende: 1) detectar la
 35 presencia de uno o más factores de virulencia que comprenden: a) contactar una muestra sospechosa de contener uno o más microorganismos que expresan uno o más factores de virulencia con uno o más conjuntos de cebadores oligonucleótidos específicos para hibridar con secuencias objetivo de uno o más factores de virulencia; b) amplificar al menos una secuencia de ácido nucleico objetivo que codifica al menos uno de los factores de virulencia mediante un método de amplificación múltiple para obtener uno o más ácidos nucleicos específicos de factor de virulencia
 40 amplificados; c) detectar uno o más ácidos nucleicos específicos del factor de virulencia amplificado o fragmentos o complementos de los mismos; y d) identificar opcionalmente los ácidos nucleicos específicos del factor de virulencia amplificado, donde detectar uno o más ácidos nucleicos específicos del factor de virulencia amplificado o fragmentos o complementos de los mismos es indicativo de la presencia de un microorganismo en la muestra que expresa uno o más factores de virulencia; y 2) determinar la cepa de uno o más microorganismos que expresan uno o más factores de virulencia que comprenden: a) poner en contacto la muestra con al menos un conjunto de cebadores oligonucleótidos
 45 específicos para hibridar con ácidos nucleicos objetivo específicos para una cepa de uno o más microorganismos; b) amplificar conjuntamente al menos una secuencia de ácido nucleico objetivo específica de la cepa que codifica para objetivos de ácido nucleico específicos para al menos una cepa del microorganismo mediante un método de amplificación múltiple para obtener uno o más ácidos nucleicos amplificados específicos de la cepa; c) detectar uno o más ácidos nucleicos amplificados específicos de la cepa o fragmentos o complementos de los mismos; y d) identificar
 50 opcionalmente los ácidos nucleicos amplificados específicos de la cepa. En algunas realizaciones del método, cada conjunto de cebadores oligonucleótidos específicos para uno o más factores de virulencia se marca con un marcador diferente. En algunas realizaciones del método, cada conjunto de cebadores oligonucleótidos específicos para una o más cepas del microorganismo se marca con un marcador diferente y en la que cada conjunto de cebadores oligonucleótidos específicos para uno o más factores de virulencia se marca con un marcador diferente.

55 En algunas realizaciones, las etapas descritas en el método anterior de 1) detectar la presencia de uno o más factores de virulencia y 2) determinar la cepa de uno o más microorganismos que expresan uno o más factores de virulencia se pueden realizar simultáneamente o en consecuencia y/o en cualquier orden.

60 En algunas realizaciones de un método para la detección de uno o más microorganismos que expresan uno o más factores de virulencia, uno o más conjuntos de cebadores oligonucleótidos específicos para uno o más factores de virulencia comprenden cada uno: al menos un cebador directo y al menos un cebador inverso operables para hibridar con uno o más factores de virulencia y en condiciones de amplificación apropiadas forman un producto de ácido nucleico específico del factor de virulencia amplificado. Los factores de virulencia en algunas realizaciones comprenden,
 65 pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: todas las variantes de los ácidos nucleicos que codifican la toxina Shiga (*stx*) alelos y fragmentos de los mismos; y/o todas las variantes de ácidos nucleicos que codifican al gen *eae*,

alelos y fragmentos de los mismos. Un ácido nucleico que codifica *stx* puede comprender un gen *stx1*, un gen *stx2*, un alelo de un gen *stx1* y un alelo de un gen *stx2*, o fragmentos de los mismos. La Tabla 1 a continuación enumera varios subtipos y variantes de *stx1* y *stx2* que se detectan mediante los métodos descritos en este documento.

5

Tabla 1:

Tipo de <i>Stx</i>	Subtipo de <i>Stx</i>	Variantes de <i>Stx</i>
<i>Stx1</i>	3	1a, 1c, 1d
<i>Stx2</i>	7	2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f, 2g

10

15

20

25

30

Un método de detección de todas las variantes de *stx*, incluyendo *stx1* (1a, 1c y 1d) y *stx2* (2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f y 2g) comprende detectar todas las variantes conocidas de *stx1* y *stx2* y comprende realizar un ensayo múltiple que comprende hibridar al menos dos pares de cebadores de PCR, un primer par de cebadores de PCR que tienen secuencias de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2; y el segundo conjunto de cebadores seleccionado entre los conjuntos de cebadores que tienen la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 5; y/o la SEQ ID NO: 6 y la SEQ ID NO: 7 y/o la SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 9, (así como los cebadores que tienen fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos a las secuencias descritas anteriormente, complementos de los mismos, y secuencias que tienen al menos un 90% de homología con los mismos), con al menos una primera secuencia del polinucleótido objetivo presente en la muestra; amplificar al menos la primera secuencia del polinucleótido objetivo o un fragmento o un complemento de la misma para obtener una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; y detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; en el que la detección de al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo es indicativa de la presencia de un ácido nucleico que codifica *stx* en la muestra. En algunas realizaciones, todos los cuatro pares de cebadores descritos anteriormente se usan para amplificar una o más secuencias de ácido nucleico objetivo de *stx* en la muestra y en los que la detección de al menos un ácido nucleico amplificado de *stx* objetivo es indicativo de la presencia de un microorganismo que tiene loci que codifica *stx* en sus ácidos nucleicos. Un método para detectar un microbio que expresa un gen *stx* puede comprender además usar una sonda para detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo, donde la sonda comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 3 para detectar el producto amplificado de ácido nucleico de *stx1* usando un par de cebadores que tienen la SEQ. ID NO. 1 y la SEQ ID NO. 2, en el que la sonda comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 10 para detectar el producto amplificado de ácido nucleico de *stx2* mediante el uso de un par de cebadores que tienen la SEQ ID NO. 4 y la SEQ ID NO. 5; y/o la SEQ ID NO. 6 y la SEQ ID NO. 7 y la SEQ ID NO. 8 y la SEQ ID NO. 9. Las sondas que tienen la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 10 también pueden comprender fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de los mismos, complementos de los mismos, y secuencias que tienen al menos 90% de homología con los mismos. Todas las variantes de *stx* pueden detectarse usando estos métodos debido a cebadores y sondas degenerados que contienen bases no coincidentes en sitios polimórficos conocidos.

35

Un ácido nucleico que codifica *eae* puede comprender un gen *eae*, un alelo de un gen *eae*, o uno de sus fragmentos. Los microorganismos que expresan uno o más factores de virulencia incluyen, por ejemplo, *E. coli* que produce toxina Shiga (STEC).

40

45

50

Un método para detectar la presencia de un microbio que expresa *eae* en una muestra comprende hibridar al menos un par de cebadores de PCR tales como un cebador que tiene secuencias de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 11 y la SEQ ID NO: 12 y/o la SEQ ID NO: 13, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de los mismos, complementos de los mismos, y secuencias que tienen al menos 90% de homología con los mismos, con al menos una primera secuencia del polinucleótido objetivo presente en la muestra; amplificar al menos la primera secuencia del polinucleótido objetivo o un fragmento o un complemento de la misma para obtener una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; y detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; en el que la detección de al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo es indicativa de la presencia de un ácido nucleico que codifica *eae* en la muestra. Un método para detectar un microbio que expresa un gen *eae* puede comprender además usar una sonda para detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo, en la que la sonda comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 14 (para detectar un producto de ácido nucleico amplificado de *eae* usando pares de cebadores que tienen la SEQ. ID NO: 11 y la SEQ ID NO: 12 o la SEQ ID NO: 13), fragmentos de los mismos y complementos de los mismos y secuencias que tienen al menos 90% de homología de secuencia con los mismos.

55

60

En algunas realizaciones de un método descrito anteriormente la etapa 1) de determinación de la presencia de uno o más factores de virulencia, uno o más conjuntos de cebadores oligonucleótidos específicos para uno o más factores de virulencia pueden comprender: un primer conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2; un segundo conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 5; un tercer conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 6 y la SEQ ID NO: 7; un cuarto conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 9; y/o un quinto conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12; y la SEQ ID NO: 13. Un método puede comprender además las etapas de detectar uno o más ácidos nucleicos amplificados específicos del factor de virulencia o fragmentos o complementos de los mismos comprende hibridar uno o más ácidos nucleicos amplificados específicos del factor de virulencia o fragmentos o complementos de los mismos con una sonda seleccionada de la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 10, y la SEQ ID NO: 14.

En otras realizaciones, puede utilizarse no detectar ningún producto amplificado usando los métodos descritos anteriormente para excluir la presencia de un microorganismo que expresa un factor de virulencia en una muestra.

5 En algunas realizaciones de un método como se describió anteriormente, la etapa 2) de determinación de la cepa de uno o más microorganismos que expresan uno o más factores de virulencia, al menos un conjunto de cebadores oligonucleótidos específicos para la cepa de uno o más microorganismos pueden comprender un primer conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 15 y la SEQ ID NO: 16; un segundo conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 18 y la SEQ ID NO: 19; un tercer conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 21 y la SEQ ID NO: 22; un cuarto conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 24 y la SEQ ID NO: 25, un quinto conjunto de cebador que tiene la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 28; un sexto conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 30 y la SEQ ID NO: 31; un séptimo conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 33 y la SEQ ID NO: 34; y/o un octavo conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 36 y la SEQ ID NO: 37. En algunas realizaciones, las etapas de detección de uno o más ácidos nucleicos amplificados específicos de la cepa o fragmentos o complementos del mismo comprende hibridar uno o más ácidos nucleicos amplificados específicos de la cepa o fragmentos o complementos de los mismos con una sonda seleccionada de la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 23, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 35 y la SEQ ID NO: 38.

20 En algunas realizaciones, la detección de un ácido nucleico amplificado comprende uno o más métodos tales como, pero sin limitarse a, hibridación, espectrometría de masas, códigos de barras moleculares, microfluidos, quimioluminiscencia, tecnologías enzimáticas y combinaciones de los mismos. Algunas realizaciones también pueden comprender identificar un microbio y pueden comprender métodos tales como la secuenciación de ADN.

25 En algunas realizaciones de los presentes métodos, un ensayo solo puede no ser definitivo para detectar un organismo STEC (o cualquier microbio que exprese un factor de virulencia tal como *Shigella spp.*) debido a la similitud genómica entre las regiones genómicas de otros organismos no STEC (o no *Shigella spp.*). Sin embargo, cuando dos (o más) ensayos tales como, pero sin limitarse a, los ensayos (combinaciones de cebadores para detectar *tsx1* y *stx2*) descritos en este documento, se usan en paralelo o como un ensayo múltiple, por ejemplo, en un ensayo TaqMan® en tiempo real, por ejemplo, donde cada sonda en cada uno de los dos (o más) ensayos tiene un marcador diferente para distinguir los resultados en un instrumento de PCR en tiempo real, por ejemplo, un sistema de PCR rápida en tiempo real 7500 (Applied Biosystems), un resultado positivo de tal ensayo es indicativo de la presencia de un organismo STEC.

35 En otras realizaciones, el enfoque de ensayo doble o múltiple (más de 2 conjuntos de ensayo) se puede usar para detectar y distinguir cepas de organismo STEC entre sí, así como para detectar y distinguir la expresión de alelos/variantes de *stx* y/o *eae*. En algunas realizaciones, el ensayo puede comprender detectar la presencia de genes, alelos y/o fragmentos de tales genes/alelos que codifican uno o más loci génicos que codifican toxina Shiga tales como, pero sin limitarse a *stx1* y *stx2*. Algunas realizaciones describen la detección de todos estos loci génicos como identificación positiva de un organismo que produce toxina Shiga. Algunas realizaciones describen la detección de al menos dos de estos loci génicos como identificación positiva de un organismo productor de toxina Shiga. Algunas realizaciones describen la detección de un loci de *eae*. Algunas realizaciones describen la detección de diferentes productos de amplificación para diferentes cepas de STEC tales como una *E. coli* O157:H7, una *E. coli* O26, una *E. coli* O45, una *E. coli* O103, una *E. coli* O111, una *E. coli* O121 y una *E. coli* O145.

45 Los métodos pueden incluir ensayos múltiples tales como reacciones en cadena de la polimerasa, en los que la hibridación y amplificación de dicho primer par de cebadores de polinucleótidos se produce en un primer recipiente y dicha hibridación y amplificación de dicho segundo par de cebadores de polinucleótidos se produce en un segundo recipiente, o la hibridación y la amplificación de dicho primer par de cebadores de polinucleótidos y dicha hibridación y amplificación de dicho segundo par de cebadores de polinucleótidos se produce en un solo recipiente, la detección es un ensayo en tiempo real, el ensayo en tiempo real es un ensayo con colorante SYBR® Green o Ensayo TaqMan®. Los métodos también pueden comprender el uso de cebadores adicionales tales como un tercer par de cebadores y un cuarto par de cebadores, y así sucesivamente.

55 Un método de la divulgación puede comprender además proporcionar una primera sonda y una segunda sonda (y sondas adicionales tales como una tercera sonda y una cuarta sonda, y así sucesivamente), en el que la primera y la segunda sondas son diferentes entre sí, la primera sonda operable para identificar la primera secuencia amplificada del polinucleótido objetivo y la segunda sonda operable para identificar la segunda secuencia amplificada de nucleótidos objetivo, la primera sonda comprende además una primera marca y dicha segunda sonda comprende además una segunda marca, en la que ambos marcadores se seleccionan de un colorante, un isótopo radiactivo, un marcador quimioluminiscente y una enzima, el colorante comprende un colorante de fluoresceína, un colorante de rodamina o un colorante de cianina, el colorante es un colorante de fluoresceína y la primera sonda está marcada con colorante FAM^{MR} y dicha segunda sonda está marcada con colorante VIC®; e hibridar la primera y la segunda sondas con los fragmentos amplificados por PCR para detectar la presencia de la primera secuencia amplificada del polinucleótido objetivo y la segunda secuencia amplificada del polinucleótido objetivo de la muestra.

65 En algunas realizaciones, una muestra para ser analizada por contaminación potencial por un microbio que expresa un factor de virulencia y/o un microbio STEC, puede analizarse directamente o puede "prepararse" o "procesarse" de

alguna manera antes de la prueba y análisis molecular (tal como mediante PCR). Por ejemplo, una muestra puede procesarse para separar y/o enriquecer un microbio contaminante. Una muestra también puede procesarse adicionalmente para separar ácidos nucleicos microbianos del resto de la muestra mediante lisis de células microbianas. La lisis se puede lograr usando una variedad de reguladores que pueden comprender agentes de lisis tales como, pero sin limitarse a, agentes caotrópicos y/o agentes enzimáticos y/o proteasas. Las células microbianas lisadas de una muestra pueden procesarse adicionalmente para separar, aislar y/o extraer material genético del microbio antes de los métodos de análisis de amplificación descritos en la presente memoria mediante varios métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la extracción de ácido nucleico puede realizarse mediante kits y reactivos de Life Technologies Corporation, tal como el kit de preparación de muestras por centrifugación rápida PrepSEQ^{MR} que se puede usar para preparar ADN de muestras de alimentos y/o ambientales para su uso en reacciones de amplificación por PCR. Usando un protocolo de centrifugación simple, la centrifugación rápida PrepSEQ^{MR} inactiva eficientemente los inhibidores de la PCR. El kit proporciona una solución rápida y rentable para extraer ADN de alta calidad de una amplia gama de tipos de muestras. El kit de extracción de ácido nucleico PrepSEQ[®] de Life Technologies también produce muestras de ADN bacteriano de alta calidad para la detección basada en PCR de una amplia gama de muestras de alimentos y medioambientales.

Algunas realizaciones pueden comprender una o más de las siguientes etapas para lograr la separación de microbios y/o sus ácidos nucleicos de los componentes de la muestra antes del análisis de ácidos nucleicos microbianos como se describe en la presente memoria: (1) enriquecimiento bacteriano opcional para enriquecer ciertos tipos de bacterias (por ejemplo, proporcionando condiciones para aumentar selectivamente un tipo bacteriano), (2) lisis opcional de células bacterianas, (3) extracción y/o purificación opcional de ácidos nucleicos (por ejemplo, extracción de ADN, extracción total de ácido nucleico (es decir, ADN y ARN), extracción de ADN genómico, extracción de ARN usando columnas de centrifugación y/o reguladores y/u otros métodos conocidos en la técnica).

En algunas realizaciones, la divulgación describe flujos de trabajo de métodos para detectar e identificar uno o más microorganismo *E. coli* que producen toxina Shiga (STEC) en una muestra que comprende las etapas de: a) enriquecer opcionalmente los microorganismos STEC separados; b) extraer ácidos nucleicos de STEC; c) realizar una reacción en cadena de polimerasa múltiple (PCR) en los microorganismos STEC separados para amplificar y detectar la presencia de al menos un ácido nucleico seleccionado de: ácidos nucleicos que codifican para un gen de toxina Shiga, incluyendo ácidos nucleicos que codifican *stx1* y *stx2*; ácidos nucleicos que codifican un gen *eae*; ácidos nucleicos específicos para una cepa de *E. coli* O157:H7, en la que la detección de al menos un ácido nucleico anterior indica la presencia de un microorganismo STEC o *E. coli* O157:H7 o ambos; y d) si se detecta un ácido nucleico en la etapa c) realizar una segunda ronda de PCR múltiple con cebadores específicos para amplificar y detectar la presencia de uno o más ácidos nucleicos que codifican regiones objetivo asociadas con uno o más microorganismos STEC que incluyen una *E. coli* O157:H7, una *E. coli* O26, una *E. coli* O45, una *E. coli* O103, una *E. coli* O111, una *E. coli* O121 y una *E. coli* O145. En algunas realizaciones, la divulgación describe un flujo de trabajo para detectar los microorganismos Big 6 STEC identificados por el USDA.

En otras realizaciones, no se puede detectar ningún producto amplificado usando los métodos descritos anteriormente para excluir la presencia de un microorganismo STEC en una muestra.

Amplificación de ácidos nucleicos objetivo de objetivos que incluyen *stx1*, *stx2*, *eae*, *E. coli* O157:H7, una *E. coli* O26, una *E. coli* O45, una *E. coli* O103, una *E. coli* O111, una *E. coli* O121 y una *E. coli* O145 pueden detectarse usando una pluralidad de marcadores en cada conjunto diferente de cebadores y/o sondas. Por ejemplo, en la etapa c) anterior, cebadores y/o sondas con un marcador diferente para cada uno de los siguientes: *stx1*, *sxt2*, *eae* y *E. coli* O157:H7 puede usarse y en la etapa d) se pueden usar cebadores y/o sondas con un marcador diferente para cada uno de los diversos microorganismos.

En algunas realizaciones, los métodos de la divulgación se pueden realizar en un sistema automatizado. La automatización disminuye el tiempo y la eficiencia y permite procesar muestras múltiples. Los sistemas automatizados pueden comprender una plataforma de separación magnética tal como, pero sin limitarse a, la plataforma procesadora de partículas magnéticas MagMAX^{MR} Express-96 (Life Technologies Corporation), Pathatrix (Matrix Microsciences).

Las composiciones y métodos de la presente divulgación son idealmente adecuadas para la preparación de kits. Un ejemplo es un kit adecuado para detectar la presencia de un microorganismo que expresa un factor de virulencia. Tal kit puede comprender al menos un conjunto de cebadores oligonucleótidos para uso en un proceso de amplificación de ácido nucleico para la detección de factores de virulencia asociados con microbios, comprendiendo dicho conjunto de cebadores un conjunto de cebadores operables para hibridar con factores de virulencia que comprenden todas las variantes de toxina Shiga y/o *eae*.

Algunas realizaciones describen kits adecuados para identificar la presencia de un organismo productor de toxina Shiga. Tal kit puede comprender al menos un conjunto de cebadores oligonucleótidos para usar en un proceso de amplificación (tal como PCR y en algunas realizaciones una PCR múltiple) para la detección de factores de virulencia de *stx*, el conjunto de cebadores que comprende cebadores operables para hibridar con factores de virulencia que comprenden todas las variantes, genes, alelo y/o fragmentos y complementos de toxina Shiga. El kit de detección de *stx* puede comprender además secuencias de sonda para detectar ácidos nucleicos objetivo *stx* amplificados. En un ejemplo de

realización, un kit para detectar microorganismos que expresan las variantes *stx1* y *stx2* comprende cebadores y sondas que tienen las SEQ ID NOS: 1-10.

5 Algunas realizaciones describen kits adecuados para identificar la presencia de un organismo que codifica *eae*. Tal kit puede comprender al menos un conjunto de cebadores oligonucleótidos para uso en un procedimiento de PCR para la detección de un factor de virulencia de *eae*, el conjunto de cebadores que comprende cebadores operables para hibridar con genes que codifican *eae*, alelos, regiones complementarias de los mismos y fragmentos de los mismos que comprenden todas las variantes de *eae*. Un kit puede comprender adicionalmente secuencias de sonda para detectar ácidos nucleicos objetivo de *eae* amplificados. En un ejemplo de realización, un kit para detectar microorganismos que se expresan *eae* comprende cebadores y sondas que tienen las SEQ ID NOS: 11-14.

15 Algunos kits de la divulgación pueden detectar factores de virulencia que incluyen *stx* y *eae* y comprenden conjuntos de cebadores seleccionados de: un primer conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2; un segundo conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 5; un tercer conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 6 y la SEQ ID NO: 7; un cuarto conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 9; un quinto conjunto de cebadores que tiene como cebador directo la SEQ ID NO: 11 y como cebadores inversos la SEQ ID NO: 12 o la SEQ ID NO: 13; y además opcionalmente adicionalmente al menos una sonda más seleccionada entre las sondas que tienen la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 10, y la SEQ ID NO: 14, o secuencias complementarias de las mismas, o secuencias que comprenden al menos 90% de identidad de secuencia de ácido nucleico de las mismas, o derivados marcados de las mismas.

20 En algunas realizaciones, un kit de la divulgación puede, solo o además del cebador y las sondas del factor de virulencia descritos anteriormente, comprender además uno o más conjuntos de cebadores operables para hibridar con objetivos de ácido nucleico únicos de una o más cepas de STEC tales como, pero sin limitarse a una *E. coli* O157:H7, una *E. coli* O26, una *E. coli* O45, una *E. coli* O103, una *E. coli* O111, una *E. coli* O121 y una *E. coli* O145.

25 Todos los kits de la divulgación pueden comprender adicionalmente uno o más reactivos tales como, pero sin limitarse a, reguladores, trifosfatos de nucleótidos, ADN polimerasas, colorantes de intercalación, cebadores, sondas, sales e instrucciones para el uso del kit.

30 Un ejemplo de un kit para la detección de un microorganismo *E. coli* que produce toxina Shiga (STEC) comprende: dos o más pares de cebadores de reacción en cadena de polimerasa directa e inversa (PCR) seleccionados de un primer conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 15 y la SEQ ID NO: 16; un segundo conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 18 y la SEQ ID NO: 19; un tercer conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 21 y la SEQ ID NO: 22; un cuarto conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 24 y la SEQ ID NO: 25, un quinto conjunto de cebador que tiene la SEQ ID NO: 27 y la SEQ ID NO: 28; un sexto conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 30 y la SEQ ID NO: 31, o secuencias complementarias de las mismas, o secuencias que comprenden al menos 90% de identidad de secuencia de ácido nucleico con las mismas, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de las mismas, o un derivado marcado de las mismas; opcionalmente al menos una sonda y uno o más componentes seleccionados de un grupo que consiste en: al menos una enzima; dNTP, al menos un regulador, al menos una sal, al menos una muestra de ácido nucleico de control y un protocolo de instrucciones. Tal como un kit puede detectar la presencia de uno o más organismos STEC incluyendo una *E. coli* O26, una *E. coli* O45, una *E. coli* O103, una *E. coli* O111, una *E. coli* O121 y una *E. coli* O145.

35 40 45 En algunas realizaciones, un kit de la divulgación también puede también o alternativamente comprende uno o más pares de cebadores de PCR directos e inversos seleccionados adicionalmente de un séptimo conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 11 y la SEQ ID NO: 12 y la SEQ ID NO: 13; un octavo conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2; un noveno conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 5; un décimo conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 6 y la SEQ ID NO: 7; un undécimo conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 9; y además opcionalmente adicionalmente al menos una sonda más seleccionada de sondas que tienen la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 10, o secuencias complementarias de las mismas, o secuencias que comprenden al menos 90% de identidad de secuencia de ácido nucleico de las mismas, o derivados marcados de las mismas. Tal kit puede detectar la presencia de uno o más organismos STEC que expresan factores de virulencia *stx* y *eae*. Estos kits también pueden detectar la presencia de la cepa STEC específica tal como si el contaminante es una *E. coli* O26, una *E. coli* O45, una *E. coli* O103, una *E. coli* O111, una *E. coli* O121 y una *E. coli* O145.

50 55 60 En algunas realizaciones, los kits de la divulgación pueden comprender además adicionalmente uno o más pares de cebadores de PCR directa e inversa además seleccionados de un duodécimo conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 33 y la SEQ ID NO: 34; un decimotercer conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 36 y la SEQ ID NO: 37; y opcionalmente adicionalmente al menos otra sonda más seleccionada entre las sondas que tienen la SEQ ID NO: 35, la SEQ ID NO: 38, o secuencias complementarias de las mismas, o secuencias que comprenden al menos 90% de identidad de secuencia de ácido nucleico de las mismas, o derivados marcados de las mismas. Tal kit puede detectar adicionalmente la presencia de una *E. coli* O157:H7 en la muestra.

65 En algunas realizaciones, los cebadores del kit pueden marcarse. Un kit que comprende múltiples pares de cebadores

5 puede tener pares de cebadores, cada uno marcado con diferentes marcadores que pueden detectarse por separado. Las sondas incluidas en los kits de la divulgación pueden estar marcadas. Si un kit comprende múltiples sondas, cada sonda puede marcarse con un marcador diferente para permitir la detección de diferentes productos que pueden ser el objetivo de cada sonda diferente. Los componentes pueden proporcionarse como soluciones o como polvos liofilizados que pueden reconstituirse posteriormente si es necesario en soluciones y/o reguladores que también pueden proporcionarse.

10 Los componentes de kits pueden estar individualmente y en diversas combinaciones comprendidas en uno o una pluralidad de medios contenedores adecuados. Está dentro del alcance de estas enseñanzas proporcionar kits de prueba para usar en aplicaciones manuales o kits de prueba para usar con la preparación automática de muestras, la configuración de la reacción, los detectores o los analizadores. En algunas realizaciones, un producto de amplificación del kit puede analizarse adicionalmente por métodos tales como, pero sin limitarse a, electroforesis, hibridación, espectrometría de masas, códigos de barras moleculares, microfluidos, quimioluminiscencia y/o tecnologías enzimáticas.

15 Los expertos en la técnica, a la luz de esta memoria descriptiva, comprenderán que son posibles muchas modificaciones, alternativas y equivalentes de las realizaciones descritas anteriormente. Todas las modificaciones, alternativas y equivalentes de este tipo pretenden incluirse en este documento.

20 Ejemplos

Los siguientes procedimientos son ejemplos representativos de realizaciones de acuerdo con la divulgación que pueden emplearse para la detección de un organismo STEC y/o un organismo que expresa un factor de virulencia. Estos ejemplos no pretenden limitar el alcance de las reivindicaciones y/o la divulgación de ninguna manera.

25 Ejemplo 1: Composiciones y métodos para detectar organismos productores de toxina Shiga

El presente ejemplo describe ejemplos de ensayos diseñados para detectar organismos productores de toxina Shiga utilizando secuencias de sonda y cebador diseñadas por los presentes inventores. Las secuencias de cebador que comprenden pares de cebadores directo e inverso y secuencias de sonda correspondientes se muestran en la Tabla 2 a continuación.

35 Un ejemplo de un método para detectar la presencia de un organismo productor de toxina Shiga en una muestra comprende: extraer (y/o aislar) ácido nucleico de una muestra y detectar la presencia de al menos un locus de *stx1* o *stx2* o un fragmento del mismo o un complemento del mismo como se muestra usando un ensayo descrito en la Tabla 2 a continuación. En algunas realizaciones, las células microbianas pueden someterse directamente a la detección de loci o fragmentos de ácido nucleico de *stx* objetivo sin ninguna extracción de ácido nucleico.

40 Como se muestra en la Tabla 2, se asigna un número de ID del ensayo (tal como 14252, 14254, etc.) para describir un par de cebadores asociados (o pares de cebadores para ensayos múltiples) y sondas asociadas que pueden usarse para la detección de una secuencia de *stx* objetivo (véase *stx1*, *stx2*, tanto *stx1* como *stx2* en la Tabla 2). Estas combinaciones específicas de pares de cebadores y secuencias de sonda se han diseñado para amplificar selectivamente los genes presentes de loci de *stx*. En algunas realizaciones, estos pares de cebadores son degenerados.

45 Como se muestra en la Tabla 2, un par de cebadores directo e inverso se muestra en una fila, si se usa en una reacción de amplificación, amplificará el correspondiente ácido nucleico de *stx1* o *stx2* objetivo. Por ejemplo, el número de ID del ensayo número 14252 puede usarse para detectar la presencia de un organismo productor de toxina Shiga que tiene un gen *stx1* mediante: la puesta en contacto de una muestra sospechosa de estar contaminada con un cebador directo que tiene la secuencia de ácido nucleico GTGACAGTAGCTATACCACGTTACA (SEQ ID NO: 1) y un cebador inverso que tiene la secuencia de ácido nucleico AGTGGTGTACGAAATCCCCTCT (SEQ ID NO: 2) en condiciones para amplificar una secuencia de ácido nucleico objetivo de loci del gen *stx1* (o fragmento o complemento del mismo). Las temperaturas de fusión T_m para cebadores directos e inversos también se muestran en la Tabla 2. En algunas realizaciones, un producto amplificado, que usa los cebadores de una fila puede detectarse usando un cebador descrito en la misma fila, por ejemplo, en el ensayo ID 14252, puede usarse una sonda que tiene la secuencia de ácido nucleico ATGGCGATTTATCTGCATCCC (SEQ ID NO: 3).

50 Las ID del ensayo de la Tabla 2 se pueden combinar para formar ensayos múltiples. Por ejemplo, un ensayo múltiple combina ensayos con el ID del ensayo 14252 o con el ensayo ID 14254, 29133 y/o 29134 de la Tabla 2 y puede detectar todos los alelos *stx1* y *stx2*. Los ensayos múltiples se pueden realizar poniendo en contacto simultáneamente una muestra con uno o más pares de cebadores. En algunas realizaciones, los ensayos múltiples se pueden realizar en paralelo o se pueden realizar secuencialmente.

65

Tabla 2: Ensayos y temperaturas de fusión para detectar ácidos nucleicos del objetivo principal:

*ID del ensayo stx1	*Cebador directo	*Cebador inverso	*Sonda	*Tm directo	*Tm inverso	*Sonda
14252	GTGACAGTAGCTATACCAC GTACA (SEQ ID NO: 1)	AGTGTGTACGAAATCCC CTCT (SEQ ID NO: 2)	ATGGCGAATTTATCTGCAT CCC (SEQ ID NO: 3)	61,26	60,73	71,89
14254	CGTTTGGACCACTTCGTC TGATT (SEQ ID NO: 4)	TGGACACGGTTGCAGAGT (SEQ ID NO: 5)	ACGGACAGCAGTTATAC (SEQ ID NO: 10)	61,09	62,37	70,1
29133	CGTTTGGACCACTTCGTC TGATT (SEQ ID NO: 6)	TGGACACGGTTGCAGCGT (SEQ ID NO: 7)	ACGGACAGCAGTTATAC (SEQ ID NO: 10)	61,09	65,99	70,1
29134	GATTTCTCACATATTTCCAG TGCCTGATG (SEQ ID NO: 8)	CCAGATCTGGGATTCGCT GTAAT (SEQ ID NO: 9)	ACGGACAGCAGTTATAC (SEQ ID NO: 10)	61,64	62,51	70,1

* La ID del ensayo describe un ensayo que comprende el uso de cebadores directos y cebadores inversos descritos en una fila y en algunas realizaciones la sonda descrita en la misma fila.
* Para Tm describe la Tm de los cebadores directos; Tm inversa describe la Tm de los cebadores inversos y la Tm de la sonda describe la Tm de la sonda.

La detección también puede comprender métodos tales como amplificación, hibridación, espectrometría de masas, nanocuerdas, microfluidos, quimioluminiscencia, tecnologías de enzimas y combinaciones de los mismos. La etapas de detección que usan sondas pueden comprender proporcionar al menos una primera sonda (y en algunas realizaciones tales como ensayos múltiples con sondas adicionales, tales como una segunda sonda, una tercera sonda, una cuarta sonda, etc.), en las que la primera y la segunda sondas son diferentes entre sí, la primera sonda operable para identificar la primera secuencia amplificada del polinucleótido objetivo y la segunda sonda operable para identificar la segunda secuencia amplificada de nucleótidos objetivo, la primera sonda comprende además un primer marcador y dicha segunda sonda comprende además un segundo marcador, en el que ambos marcadores se seleccionan de un colorante, un isótopo radioactivo, un marcador quimioluminiscente y una enzima, el colorante comprende un colorante de fluoresceína, un colorante de rodamina o un colorante de cianina, el colorante es un tinte de fluoresceína y la primera sonda está marcada con colorante FAM^{MR} y dicha segunda sonda está marcada con colorante VIC®; y la hibridación de la primera y la segunda sondas con los fragmentos amplificados por PCR para detectar la presencia de la primera secuencia amplificada del polinucleótido objetivo y la segunda secuencia amplificada del polinucleótido objetivo a partir de la muestra.

Ejemplo 2: Métodos múltiples para detectar *E. coli* que expresa factores de virulencia que comprenden loci que codifican toxina Shiga

En algunas realizaciones, se describen métodos que comprenden ensayos múltiples diseñados para detectar combinaciones de múltiples loci génicos que son organismos STEC presentes que incluyen *E. coli* O157:H7 y *E. coli* O104:H4. La detección de combinaciones de estos genes indica la presencia de un organismo que expresa la toxina Shiga.

De acuerdo con algunas realizaciones, detectar la presencia de combinaciones de genes objetivo de genes de loci *stx* de *E. coli* O157:H7 que es intrínsecamente positivo tanto para *stx1* como para *stx2* se muestra en la Figura 1. La Fig. 1 muestra los resultados de un ensayo múltiple que muestra la presencia de *stx1* mostrada por medio de una sonda VIC como *stx1VIC* Ct ~ 31,3 y muestra la presencia de *stx2* mostrada por una sonda FAM como *stx2FAM* Ct ~ 30,3. El control positivo interno (IPC) se muestra utilizando otra sonda NED marcada como IPC NED Ct ~ 33.

En algunas realizaciones, detectar la presencia de combinaciones de genes objetivo de loci de *stx* de *E. coli* O104:H4 que es intrínsecamente negativo para *stx1* y positiva para *stx2* se muestra en la Figura 2. La Fig. 2 muestra los resultados de un ensayo múltiple que muestra la ausencia de *stx1* mostrado por medio de una sonda VIC como *stx1VIC* Ct es "indeterminada" y muestra la presencia de *stx2* mostrada por medio de una sonda FAM como *stx2FAM* Ct ~ 28,5. El control positivo interno (IPC) se muestra usando otra sonda NED marcada como IPC NED Ct ~ 33.

En los métodos de la divulgación descrita, la detección de cada uno de los genes o loci de genes mencionados anteriormente para identificar la combinación de genes, usando las sondas y cebadores descritos en esta memoria descriptiva, puede comprender el uso de métodos tales como, pero sin limitarse a, amplificación, hibridación, espectrometría de masas, nanocuerdas, microfluidos, quimioluminiscencia, tecnologías enzimáticas y combinaciones de los mismos. La amplificación puede comprender una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), RT-PCR, PCR asíncrona (A-PCR) y PCR asimétrica (AM-PCR), amplificación de desplazamiento de cadena (SDA), amplificación de desplazamiento múltiple (MDA), amplificación con base en una cadena de ácido nucleico (NASBA), amplificación de círculo rodante (RCA), amplificación mediada por transcripción (TMA). Los métodos también pueden comprender además aislar ácido nucleico de una muestra.

Se describe un ejemplo de realización para el uso de dos sondas para detección, que también se pueden aplicar al uso de más de dos sondas para detectar múltiples loci génicos. Por ejemplo, en una etapa de detección de un método como se describe en la presente memoria, se puede usar una primera sonda y una segunda sonda, en el que la primera y la segunda sondas son diferentes entre sí, la primera sonda operable para identificar la primera secuencia amplificada del polinucleótido objetivo y la segunda sonda operable para identificar la segunda secuencia amplificada de nucleótidos objetivo, la primera sonda comprende además un primer marcador y dicha segunda sonda comprende además un segundo marcador, en la que ambos marcadores se seleccionan entre un colorante, un isótopo radiactivo, un marcador quimioluminiscente y una enzima, el colorante comprende un colorante de fluoresceína, un colorante de rodamina o un colorante de cianina, el colorante es un colorante de fluoresceína y la primera sonda se marca con colorante FAM^{MR} y dicha segunda sonda se marca con colorante VIC®; e hibridar la primera y la segunda sondas con los fragmentos amplificados por PCR para detectar la presencia de la primera secuencia amplificada del polinucleótido objetivo y la segunda secuencia amplificada del polinucleótido objetivo a partir de la muestra.

Ejemplo 3: Detección de loci *stx1* y *stx2* en un panel de microbios

Los métodos de la presente divulgación se usaron para seleccionar un panel de microbios para detectar organismos que expresan loci de *stx*.

Por ejemplo, como se muestra en la Fig. 3 un panel de 161 cepas bacterianas que comprende 146 cepas de *E. coli* y 15 cepas no *E. coli* fueron sometidas a la detección de genes *stx1* usando el ensayo ID 14251 y 14252 respectivamente. Los resultados obtenidos por los ensayos se muestran en la Fig. 3 que muestra que se detectaron loci de *stx1* en

algunas bacterias y no en otras utilizando los ensayos de la divulgación.

Como se muestra en la Fig. 4 un panel de 161 cepas bacterianas que comprende 146 cepas de *E. coli* y 15 cepas no *E. coli* se sometieron a detección de genes *stx2* utilizando el ensayo ID 14254 y 29133, respectivamente. Los resultados obtenidos por los ensayos se muestran en la Fig. 4 que muestra que se detectaron loci de *stx2* en algunas bacterias y no en otras usando los ensayos de la divulgación.

Ejemplo 4: Composiciones y métodos para detectar microorganismos STEC

Se desarrollaron métodos de PCR en tiempo real para detectar una o más cepas de *E. coli*. Algunas de estas cepas son adulterantes en muestras de carne de res. El USDA ha clasificado *E. coli* O157:H7 como adulterante desde 1994 y ha agregado a la lista de adulterantes en 2011 varios serotipos de *E. coli* productores de toxina Shiga (STEC) sin O157:H7 si contienen ambos factores de virulencia *stx* y *eae* que incluye seis serotipos O26, O45, O103, O111, O121 y O145. Estos 6 serotipos de STEC sin O157:H7 también se conocen como los "big 6" o "top seis".

En algunas realizaciones, varios métodos de ensayo de PCR sencilla se desarrollaron actualmente para cada microorganismo *E. coli* STEC adulterante que incluyen O26, O45, O103, O111, O121, y O145 y extensivamente se probaron la especificidad y la sensibilidad.

El presente ejemplo describe métodos que comprenden ensayos sencillos diseñados para detectar microorganismos *E. coli* STEC que incluye los serotipos O26, O45, O103, O111, O121 y O145 en una muestra que usa secuencias de sonda y cebador diseñadas en este documento. El presente ejemplo también describe métodos que comprenden ensayos sencillos diseñados para detectar la presencia del factor de virulencia *eae* presente en *E. coli* STEC adulterantes en una muestra que usa secuencias de sonda y cebador diseñadas en este documento. Secuencias de cebador que comprenden pares de cebadores directos e inversos y secuencias de sonda correspondientes para la detección de los serotipos big 6, *eae*, así como *stx1*, *stx2* y *E. coli* O157:H7 se muestran en la Tabla 3 a continuación.

En una realización, un ejemplo de un método para detectar la presencia de organismos STEC en una muestra, puede comprender: 1) separar o aislar un microorganismo STEC presente en una muestra de otros componentes de la muestra; y 2) detectar la presencia de al menos una región objetivo de ácido nucleico única de un serotipo de STEC de O26, O45, O103, O111, O121 y O145 y/o fragmentos de los mismos y/o complemento de los mismos (y en algunas realizaciones detectar adicionalmente la presencia de ácidos nucleicos objetivo de factores de virulencia tales como *stx* y/o *eae* y/o fragmentos de los mismos y/o sus complementos) usando diversos cebadores y/o combinaciones de sonda descritas en la Tabla 3 a continuación.

En algunas realizaciones, un ejemplo de un método para detectar la presencia de organismos STEC en una muestra puede comprender 1) separar o aislar opcionalmente un microorganismo STEC presente en una muestra de otros componentes de la muestra; 1) extraer o aislar el ácido nucleico de una muestra; y 2) detectar la presencia de al menos una región objetivo de ácido nucleico única de los serotipos STEC O26, O45, O103, O111, O121 y O145 y/o fragmentos de los mismos y/o sus complementos. Un método de acuerdo con la presente divulgación, en algunas realizaciones puede además de las etapas descritas anteriormente (o sin las etapas descritas anteriormente) también comprende detectar la presencia de factores de virulencia de STEC tales como *stx* y/o *eae* y/o fragmentos de los mismos y/o complementos de los mismos usando diversas combinaciones de cebador y/o sonda descritas en la Tabla 3 a continuación.

Se muestran diversos ensayos que comprenden combinaciones de sonda y cebador para PCR en la Tabla 3. La primera columna de la Tabla 3 describe un gen objetivo o nombre del microbio tal como *stx1*, *stx2*, *eae*, *E. coli* O121, *E. coli* O145, *E. coli* O26, *E. coli* O45, *E. coli* O103, *E. coli* O111, y *E. coli* O157:H7. La segunda columna describe un ensayo ID número (tal como 14252, 14254, etc.) que se asigna para describir un par de cebadores y una sonda asociada que puede usarse para la detección de esa secuencia de ácido nucleico objetivo. La columna 3 de la Tabla 3 describe el nombre de cada una de las secuencias del cebador y la sonda descritas por el ensayo de la columna 2 (por ejemplo, "14252 FOR" describe el cebador directo, 14252 REV describe el cebador inverso, y 14252 VIC describe una secuencia de sonda, las tres secuencias de cebador y sonda diseñadas para el ensayo ID número 14252 que es un ensayo para detectar el ácido nucleico específico de *stx1*). La columna 4 de la Tabla 3 describe la secuencia de ácido nucleico de la sonda o cebador descrita en la columna 3. Estas combinaciones específicas de pares de cebadores y secuencias de sonda se han diseñado para amplificar selectivamente un ácido nucleico objetivo de un microbio o un factor de virulencia descrito en la columna 1. En algunas realizaciones, estos pares de cebadores son degenerados.

Por ejemplo, en la Tabla 3, se muestra un par de cebadores directo (con sufijo FOR) e inverso (con sufijo REV) para cada gen objetivo, que, si se usa en una reacción de amplificación, amplificará el ácido nucleico objetivo correspondiente específico para un factor de virulencia o un microbio.

La Tabla 3 describe ensayos sencillos como se describió anteriormente con las secuencias de cebador y sonda para *stx1* (1 ensayo 14252) con una sonda descrita en la SEQ ID NO: 3 que puede detectar el producto de amplificación de *stx1*; para *stx2* (3 ensayos 14254, 29133 y 29134) con una sonda "Allstx2VIC" descrita en la SEQ ID NO: 10 que puede detectar los tres productos amplificados con el ensayo de *stx2*; para *eae* (1 ensayo 29131 que comprende un cebador

directo y dos cebadores inversos y una sonda); para *E. coli* O121 (1 ensayo 28292); para *E. coli* O145 (1 ensayo 28408); para *E. coli* O26 (1 ensayo 28611); para *E. coli* O45 (1 ensayo 28689); para *E. coli* O103 (1 ensayo 28191); para *E. coli* O111 (1 ensayo 28230) y para *E. coli* O157:H7 (2 ensayos 18158 y 19055). Los cebadores y las sondas para un control interno positivo (IPC) también se usan como controles (no se describen expresamente).

5

Tabla 3: Ensayos para la detección de factores de virulencia y microorganismos STEC

Objetivo Génico o Microorganismo a ser detectado	Ensayo ID Número	Nombre del Cebador o Sonda	Secuencia de Ácido Nucleico del Cebador o Sonda
stx1	14252	14252 FOR	GTGACAGTAGCTATAACCACGTTACA SEQ ID NO. 1
		14252 REV	AGTGTGTGTACGAAATCCCCTCT SEQ ID NO. 2
		14252 VIC	ATGGCGATTTATCTGCATCCC SEQ ID NO. 3
stx2	14254	14254 FOR	CGTTTTGACCATCTTCGTCTGATT SEQ ID NO. 4
		14254 REV	TGCGACACGTTGCAGAGT 18nt SEQ ID NO. 5
	29133	29133 FOR	CGTTTTGACCATCTTCGTCTGATT SEQ ID NO. 6
		29133 REV	TGCGACACGTTGCAGCGT SEQ ID NO. 7
	29134	29134 FOR	GATTICTCACATATTTTCAGTGCCTGATG SEQ ID NO. 8
		29134 REV	CCAGATCTGCGATTTCGCTGTAAT SEQ ID NO. 9
Allstx2 VIC	ACGGACAGCAGTTATAC SEQ ID NO. 10		
eae	29131	62396 FOR	GCGAATACTGGCGAGACTATTTCAA SEQ ID NO. 11
		62396 REV	GCTCATCATAGTCTTTCTTATTGTATGACTCA SEQ ID NO. 12
		62397 REV	GCTCGTCATAGTCTTTCTTGTGTATGACTCA SEQ ID NO. 13
		62396 NED-EQ	CCGCTCATGCGGAAATAGCCGTT SEQ ID NO. 14
E. coli O121	28292	28292 FOR	TGGAAACTATCGAACAACATCAAGGT SEQ ID NO. 15
		28292 REV	TGAATACTTCATCTTTGGTTAGCCATCC SEQ ID NO. 16
		28292 FAM	ATTGTACAAGGCGATTTC SEQ ID NO. 17
E. coli O145	28408	28408 FOR	ATGTTATTGGATGCCGTTATCTCCAT SEQ ID NO. 18
		28408 REV	GCTTGTAACGTGAAATGTAACCATCA SEQ ID NO. 19
		28408 FAM	CCGAACTCATCATAAAAAG SEQ ID NO. 20
E. coli O26	28611	28611 FOR	GAAATAATTCTTTGATCAGGGTAGAGGT SEQ ID NO. 21
		28611 REV	AATATTTGAAGAAGGAAGGCATAAGGACAT SEQ ID NO. 22
		28611 FAM	CAGGCTCCAATACCCATATGT SEQ ID NO. 23
E. coli O45	28689	28689 FOR	ACAGAGTATTGGGAGAGGTTTATGAGAA SEQ ID NO. 24
		28689 REV	GAAGAAAACCTACCAAGACAACAATTGAA SEQ ID NO. 25
		28689 FAM	TTGAGGTTTGTCTTTATTTC

			SEQ ID NO. 26
E. coli O103	28191	28191 FOR	CATGCGTTATAGAAATGCAATTGATAGACA SEQ ID NO. 27
		28191 REV	CCACTGAACAGATGAATAACAGAACCA SEQ ID NO. 28
		28191 FAM	AACGCGAATTATTTTCG SEQ ID NO. 29
E. coli O111	28230	28230 FOR	GGCACTGATGCTAAAGCTGTAAAC SEQ ID NO. 30
		28230 REV	GCAGGCCTAAAATACCTTGGATCTA SEQ ID NO. 31
		28230 FAM	CCGGGCGATGTAATTA SEQ ID NO. 32
E. coli O157:H7	18158	18158 FOR	CTTCTGCAACTTGCAACTTGAA SEQ ID NO. 33
		18158 REV	CTCGCTGATCGACAACAAAATG SEQ ID NO. 34
		18158 FAM	AGCTGGCGTAATACTTATACTCTA SEQ ID NO. 35
	19055	19055 FOR	TGACAGTATCATTACAAAGCCAAATCAGT SEQ ID NO. 36
		19055 REV	GGCCACTACGCCCTTAATCTC SEQ ID NO. 37
		19055 VIC	ACTGAATAAAGAGTTAAACGCC SEQ ID NO. 38

Los ensayos descritos en la Tabla 3 anterior se pueden realizar individualmente como ensayos sencillos o combinados como ensayos múltiples.

5

En una realización, se describe en la Tabla 3 un ejemplo de un método para detectar la presencia de un microbio que expresa el factor de virulencia *eae* en una muestra y comprende hibridar al menos un par de cebadores de PCR tales como un cebador directo que tiene secuencias de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 11 y un cebador inverso que tiene una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12 y/o la SEQ ID NO: 13, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de los mismos, complementos de los mismos, y secuencias que tienen al menos 90% de homología con los mismos, con al menos una primera secuencia del polinucleótido objetivo presente en la muestra; amplificar al menos la primera secuencia del polinucleótido objetivo o un fragmento o un complemento de la misma para obtener una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; y detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; en el que la detección de al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo es indicativa de la presencia de un ácido nucleico que codifica *eae* en la muestra. Un método para detectar un microbio que expresa un gen *eae* puede comprender además usar una sonda para detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo, en el que la sonda comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 14 (para detectar un producto de ácido nucleico *eae* amplificado usando pares de cebadores de la SEQ ID NO: 11 y la SEQ ID NO: 12 y/o la SEQ ID NO: 13), fragmentos de los mismos y complementos de los mismos y secuencias que tienen al menos 90% de homología de secuencia con los mismos.

20

La Tabla 3 también describe un ejemplo de métodos para la detección de una *E. coli* O121 en una muestra que comprende: hibridar al menos un primer par de cebadores de PCR que comprenden ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 15 (como cebador directo) y la SEQ ID NO: 16 (como cebador inverso), fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de los mismos, complementos de los mismos, y secuencias que tienen al menos un 90% de homología con los mismos, con al menos, una primera secuencia del polinucleótido objetivo presente en la muestra; amplificar al menos la primera secuencia del polinucleótido objetivo o un fragmento o un complemento de la misma para obtener al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; y detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; en el que la detección de al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo es indicativa de la presencia de una *E. coli* O121 en la muestra. Un método para detectar *E. coli* O121 puede comprender además usar una sonda para detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo en el que la sonda comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 17, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de la misma, complementos de la misma y secuencias que tienen al menos 90% de homología con la misma.

25

La Tabla 3 también describe un ejemplo de un método para la detección de una *E. coli* O145 en una muestra que comprende: hibridar al menos un primer par de cebadores de PCR que comprenden ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 18 y la SEQ ID NO: 19, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos del mismo, complementos del mismo y secuencias que tienen al menos 90% de homología con el mismo, a al menos una primera secuencia del polinucleótido objetivo presente en la muestra; amplificar al menos la primera secuencia del polinucleótido objetivo o un

35

5 fragmento o un complemento de la misma para obtener al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; y detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; en el que la detección de al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo es indicativa de la presencia de una *E. coli* O145 en la muestra. Un método para detectar una *E. coli* O145 puede comprender además usar una sonda para detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo en el que la sonda comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 20, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de la misma, complementos de la misma y secuencias que tienen al menos 90% de homología con la misma.

10 La Tabla 3 también describe un ejemplo de un método para la detección de una *E. coli* O26 en una muestra y comprende: hibridar al menos un primer par de cebadores de PCR que comprenden ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 21 y la SEQ ID NO: 22, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de los mismos, complementos de los mismos, y secuencias que tienen al menos 90% de homología con los mismos, con al menos, una primera secuencia del polinucleótido objetivo presente en la muestra; amplificar al menos la primera secuencia del polinucleótido objetivo o un fragmento o un complemento de la misma para obtener una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; y
15 detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; en el que la detección de al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo es indicativa de la presencia de una *E. coli* O26 en la muestra. Un método para detectar una *E. coli* O26 puede comprender además usar una sonda para detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo en el que la sonda comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 23, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de la misma, complementos de la misma y secuencias que
20 tienen al menos 90% de homología con la misma.

La Tabla 3 también describe un ejemplo de un método de detección de una *E. coli* O45 en una muestra que comprende: hibridar al menos un primer par de cebadores de PCR que comprenden ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 24 y la SEQ ID NO: 25, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos del mismo, complementos del mismo y secuencias que tienen al menos 90% homología con las mismas, con al menos una primera secuencia del polinucleótido objetivo presente en la muestra; amplificar al menos la primera secuencia del polinucleótido objetivo o un fragmento o un complemento de la misma para obtener una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; y detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; en el que la detección de al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo es indicativa de la presencia de una *E. coli* O45 en la muestra. Un método para detectar una *E. coli* O45 puede comprender además usar una sonda para detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo en el que la sonda comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 26, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de la misma, complementos de la misma y secuencias que tienen al menos 90% de homología con la misma.

35 La Tabla 3 también describe un ejemplo de un método para la detección de una *E. coli* O103 en una muestra que comprende: hibridar al menos un primer par de cebadores de PCR que comprenden ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 27 y la SEQ ID NO: 28, complementos de los mismos, y secuencias que tienen al menos 90% de homología con los mismos con al menos una primera secuencia del polinucleótido objetivo presente en la muestra; amplificar al menos la primera secuencia del polinucleótido objetivo o un fragmento o un complemento de la misma para obtener una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; y detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; en el que la detección de al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo es indicativa de la presencia de una *E. coli* O103 en la muestra. Un método para detectar una *E. coli* O103 puede comprender además usar una sonda para detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo en el que la sonda comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 29, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de la misma, complementos de la misma y secuencias que tienen al menos 90% de homología con la misma.

La Tabla 3 también describe un ejemplo de un método para la detección de una *E. coli* O111 en una muestra, que comprende: hibridar al menos un primer par de cebadores de PCR que comprenden ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 30 y la SEQ ID NO: 31, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de los mismos, complementos de los mismos, y secuencias que tienen al menos 90% homología con los mismos, con al menos una primera secuencia del polinucleótido objetivo presente en la muestra; amplificar al menos la primera secuencia del polinucleótido objetivo o un fragmento o un complemento de la misma para obtener una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; y detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo; en el que la detección de al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo es indicativa de la presencia de una *E. coli* O111 en la muestra. Un método para detectar una *E. coli* O111 puede comprender además usar una sonda para detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo en el que la sonda comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 32, fragmentos que tienen al menos 10 nucleótidos contiguos de la misma, complementos de la misma y secuencias que tienen al menos 90% de homología con la misma.

60 La Tabla 3 también describe ejemplos de cebadores, sondas y métodos de ensayo para detectar *E. coli* O157:H7, que incluye los dos ensayos 18158 y 19055 que también se describen en la solicitud provisional de patente de los Estados Unidos, serial No. 61/178.931, presentada el 15 de mayo de 2009 (No. de registro del abogado LT00032Pro); solicitud de patente de Estados Unidos, serial número 12/780,707 presentada el 14 de mayo de 2010 (No. de registro del abogado LT00032US); Solicitud PCT serial No. ie PCT/US2010/034998, presentada el 14 de mayo de 2010 (No. de registro del abogado LT00032PCT); y la solicitud de patente europea Serial No. 10720105.5, presentada el 14 de mayo de 2010, (No. de registro del abogado No.)

La Tabla 3 también describe un ejemplo de secuencias de cebador y de sonda operables para unirse y/o amplificar y/o detectar y/o identificar un gen *stx* en la SEQ ID NO: 1- SEQ ID NO: 10. Métodos de ensayo para *stx1*: Ensayo ID No. 14252 y para *stx2*: ensayos ID Nos.14254, 29133 y 29134 se describen en la solicitud provisional de patente de Estados Unidos, serial No. 61/527.107, presentada el 24 de agosto de, 2011 (No. de registro del abogado LT00569Pro). Los cebadores y sondas y los ensayos para *stx*, que incluyen ensayos múltiples para la detección de todas las variantes de *stx*, también se describen en el Ejemplo 1 anterior.

Ejemplo 5: Especificidad de los ensayos serotipo-O de Big 6, *eae*, y *stx*: Datos de Inclusión-Exclusión

El presente ejemplo describe la prueba de especificidad realizada con los ensayos descritos en la Tabla 3 para mostrar la detección específica del microbio o factor de virulencia para el que se diseñó el ensayo. Los ensayos se probaron en diversas especies de microbios y la detección específica de solo microbios para los que se diseñaron los ensayos, es decir la detección de los patógenos Big 6 y se observó la detección de microbios que expresan *eae* y/o *stx*.

La prueba de inclusión de *stx1* se realizó usando un panel de cepas de *E. coli* que contienen todos los serotipos *stx* conocidos (Tabla 4 a continuación). Todos los serotipos *stx1* conocidos se detectaron con un solo ensayo de *stx*, y se detectaron todos los serotipos *stx2* conocidos mediante uno de los tres ensayos de *stx2*. Cuando se combinaron los ensayos de *stx1* y los tres de *stx2* en una sola mezcla de ensayo, entonces se detectaron todos los serotipos *stx1* y *stx2* en una mezcla de reacción.

Este panel de referencia de las cepas contiene todos los subtipos de *stx1* y *stx2* conocidos que consisten en *stx1a*, *stx1c*, *stx1d*, *stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f*, y *stx2g* (PCH Feng et al., (2011) Appl Environ Microbiol 77: 6699-6702). Cada cepa se probó con un ensayo sencillo de PCR en tiempo real y con el ensayo múltiple de PCR en tiempo real creado mediante la combinación de los ensayos para *stx1*, *stx2*, *eae* y O157:H7 en una única mezcla de reacción. Para el ensayo múltiple de PCR en tiempo real, se detectaron *stx1* y *stx2* con VIC, O157:H7 se detectó con FAM, y *eae* se detectó con NED. La detección positiva se indica con un "+" y la no detección se deja en blanco.

Las pruebas de inclusión y exclusión de *eae* se realizaron con 161 cepas independientes y se muestra en las Figuras 5A y 5B. La presencia de *eae* en el panel de las cepas de *E. coli* no se conocían y, por lo tanto, la capacidad para detectar *eae* se determinó en función de la consistencia de la detección de *eae* con dos ensayos independientes de *eae*. Los resultados de la Fig. 5A y la Fig. 5B muestran una detección casi idéntica de *eae* en 85 de las 161 cepas de *E. coli*.

En estos estudios, un panel de 161 cepas independientes de *E. coli* se seleccionaron por la presencia de un gen *eae* objetivo usando dos ensayos de PCR en tiempo real contra *eae*. El genotipo de *eae* de las cepas no era conocido. La Fig. 5A muestra los resultados para el ensayo de *eae* 29128, y la Fig. 5B muestra los resultados para el ensayo de *eae* 29131. Los resultados indican una detección similar por los dos ensayos independientes. Las designaciones de la cepa se enumeran en el eje X, y la detección positiva se indica mediante la presencia de una barra en el gráfico por encima de la cepa (en función de la puntuación de Ct).

Los ensayos para el Big 6 STEC descritos en la presente memoria son únicos y altamente específicos. Cada ensayo se probó frente a un panel de inclusión/exclusión de 242 cepas de bacterias *E. coli* y 31 de bacterias que no son *E. coli* para determinar la especificidad y la sensibilidad del ensayo. El panel de inclusión incluye todos los tipos O conocidos de *E. coli*, perteneciendo las cepas a diversos serogrupos STEC, y 62 de las big 6 sin cepas STEC O157. Los resultados de cada ensayo mostraron un 100% de detección de cepas de inclusión dentro del serotipo objetivo, y no se detectaron cepas de exclusión de otros serotipos. La Tabla 4 se muestra a continuación.

Cepa	Serotipo	Subtipo Stx	Ensayo ID 14252 de Stx1	Ensayo ID 14254 de Stx2	Ensayo ID 29134 de Stx2	Ensayo ID 29133 de Stx2	Ensayo de selección múltiple		
							Stx1/2	eae	O157: H7
AA1	O174:H8	1c, 2b	++++	++++			++++	+++	
BB2	O55:H7	1a	++++				++++	++++	+
CC3	O128ac [H2]	2f				++++	++++	++++	
DD4	O177: [H25]	2c, 2d		++++			++++	++++	
EE5	O111: [H8]	1a, 2a	++++	++++			++++	++++	
FF6	O113:H4	1c, 2b	++++	++++			++++	+++	
GG7	O103:H2	1a	++++				++++	++++	
HH8	O26:H11	1a	++++				++++	++++	
H9	O41:H26	1d	++++				++++		
JJ10	O157:H7	2c		++++			++++	++++	++++
O5622	O138	2e		++++			++++		

(continuación)

Cepa	Serotipo	Subtipo Stx	Ensayo ID 14252 de Stx1	Ensayo ID 14254 de Stx2	Ensayo ID 29134 de Stx2	Ensayo ID 29133 de Stx2	Ensayo de selección múltiple		
							Stx1/2	eeae	O157: H7
B2F1	O91:H21	2d		++++			++++		
D3509	O2:H25	2g			++++		++++		

Ejemplo 6: Métodos de detección múltiple de organismos STEC

- 5 En algunas realizaciones, los ensayos sencillos descritos en los ejemplos anteriores se han combinado en ensayos múltiples. En la presente memoria se describen dos ejemplos de métodos de ensayo de PCR múltiples en tiempo real que trabajan juntos para seleccionar inicialmente una muestra para detectar la presencia de un organismo STEC adulterante y luego para confirmar la presencia de un adulterante STEC en la muestra.
- 10 En un ejemplo de un método, un primer ensayo múltiple, también denominado a veces un primer "ensayo de selección", detecta la presencia en una muestra de una o más secuencias de ácido nucleico objetivo de *E. coli* O157:H7, *stx1*, *stx2*, y *eeae*. Si una muestra es positiva, puede tener un ácido nucleico objetivo correspondiente a cualquiera de *E. coli* O157:H7 y/o *stx* (*stx1* y/o *stx2*) y/o *eeae*, o tener dos de los tres objetivos, o tener todos los tres objetivos. Posteriormente, tal muestra positiva se prueba de nuevo mediante un segundo "ensayo de confirmación" múltiple que es operable para detectar todos los 6 serotipos STEC, incluido *E. coli* O26, O45, O103, O111, O121 y O145, y también es operable para confirmar la presencia de *E. coli* O157:H7. Los resultados de ambos ensayos indicarán la ausencia o posible presencia de todos los serotipos de *E. coli* STEC que han sido identificados actualmente por el USDA como adulterantes.
- 15
- 20 Los ensayos múltiples como se describen en la presente memoria permiten la detección individual de todos los objetivos de ácido nucleico de los microorganismos STEC que se desean detectar dentro de dos tubos de reacción mediante el uso de fluoróforos múltiples. Por ejemplo, en un ejemplo, un ensayo múltiple de "detección" detecta *E. coli* O157:H7 con el fluoróforo FAM; detecta *stx1* y *stx2* con el fluoróforo VIC; detecta *eeae* con el fluoróforo LIZ; y detecta un control positivo interno (IPC) con el fluoróforo NED. El ensayo múltiple de "confirmación" detecta *E. coli* O157:H7 con VIC; los STEC sin O157:H7 big 6 con FAM; y detecta IPC con LIZ. Los resultados de estos dos ensayos revelan el genotipo de los microorganismos dentro de una matriz de muestra que se está probando, lo que permite que un usuario (como un analista de muestras de alimentos) decida si la muestra está potencialmente adulterada y necesita más pruebas.
- 25
- 30 En algunos ejemplos de realizaciones, se usó la química de TaqMan para diseñar un método de PCR en tiempo real para detectar *E. coli* O157:H7 y los serotipos STEC sin O157:H7 "big 6". Se diseñaron un mínimo de cuatro ensayos de PCR en tiempo real TaqMan® contra cada uno de los 6 serotipos O de STEC sin O157 utilizando el software patentado de diseño del ensayo de Life Technologies. También se diseñaron ensayos adicionales contra los factores de virulencia *stx1*, *stx2*, y *eeae*. Se probó cada ensayo frente a un panel de inclusión/exclusión de 241 cepas de *E. coli* que consisten en 167 de los 180 tipos O conocidos de *E. coli* para determinar la especificidad y sensibilidad del ensayo (los resultados se describen en el Ejemplo 5). Múltiples ensayos para cada uno de los 6 STEC sin O157 detectaron todas las cepas de inclusión dentro del serotipo objetivo y ninguna cepa de exclusión de otros serotipos. Los ensayos de *stx* detectaron todas las variantes de *stx1* y *stx2* probados incluyendo *stx2f* y *stx2g*. Los ensayos se combinaron en dos ensayos múltiples separados y se optimizaron usando métodos estadísticos tales como Diseño de Experimentos (DOE) (véanse las Figuras 6A y 6B).
- 35
- 40

Ejemplo 7: Flujos de trabajo y kits para detección de múltiples organismos STEC

- 45 La presente divulgación también describe un flujo de trabajo que combina las composiciones y los métodos descritos en este documento para proporcionar un flujo de trabajo de prueba rápida para el ensayo de muestras, tal como el análisis de muestras de alimentos complejos para determinar la presencia de adulterantes. Los flujos de trabajo actuales proporcionan un método de prueba rápido para obtención de resultados para analizar muestras de alimentos, en menos de 10 horas, para determinar rápidamente si las muestras de alimentos están contaminadas con organismos STEC.
- 50 Las muestras de carne molida y recortes de carne de res que comprenden 375 g de carne se pueden combinar con 1 litro de caldo TSB precalentado (precalentado a 48°C) y se homogenizan mediante mezcla manual. Las muestras de carne se pueden incubar a 42°C en una incubadora de aire forzado durante 8 horas, y luego las muestras de carne enriquecida se pueden analizar para adulterantes de *E. coli* utilizando la selección por PCR en tiempo real de STEC y ensayos de confirmación de PCR en tiempo real. Las muestras enriquecidas se pueden preparar para la PCR en tiempo real mediante uno de varios métodos. Un método utiliza el kit de extracción de ácido nucleico PrepSEQ (Life Technologies Corporation, Carlsbad, California) junto con el procesador de partículas magnéticas MagMAX Express-96 para extraer ADN para la PCR en tiempo real. El protocolo combina 200 µL de muestra enriquecida con los reactivos de lisis del kit y luego captura ácidos nucleicos en perlas magnéticas. Las perlas magnéticas se lavan y los ácidos nucleicos se liberan en 140 µL de regulador de elución que se puede usar directamente en una reacción de PCR en tiempo real. La PCR en tiempo real se puede realizar en un instrumento 7500 Fast en menos de 50 minutos.
- 55
- 60 Un método de flujo de trabajo para obtener un resultado rápido de acuerdo con un ejemplo comprende: 1) preparación

de la muestra que puede comprender, por ejemplo, extracción de ácido nucleico PrepSEQ; 2) ensayo de selección que puede comprender, por ejemplo: a) ensayo de perlas liofilizadas estándar que consiste en cebadores y sondas para todos los ensayos, solución de mezcla maestra y excipientes requeridos para la liofilización, b) un ensayo para *E. coli* O157:H7 (uno de los dos ensayos para O157:H7), ensayos para *stx1/2* (capaces de detectar todas las variantes conocidas), un ensayo para *eae* (capaz de detectar todas las variantes conocidas) y un ensayo para un control positivo interno (IPC); y realizar 3) un ensayo de confirmación que comprende: a) ensayo de perlas liofilizadas estándar que consiste en cebadores y sondas para todos los ensayos, solución de mezcla maestra y excipientes requeridos para la liofilización, b) un ensayo para *E. coli* O157:H7 (uno de los dos ensayos para O157:H7), un ensayo cada uno para los tipos O de big 6 de *E. coli* como se describe en la Tabla 3 anterior (big 6 son como se define por la regulación de USDA); y un ensayo para IPC.

Un flujo de trabajo para resultados rápidos de acuerdo con un ejemplo incluye la detección de PCR en tiempo real usando el instrumento Applied Biosystems 7500 Fast y la selección de condiciones de ciclo rápido. Las condiciones de ciclado predeterminadas para el instrumento 7500 Fast (usando el modo de ciclado rápido) incluyen una etapa de desnaturalización de 95°C durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos que constan de una etapa de desnaturalización de 95°C durante 3 segundos y una etapa de polimerización a 60°C durante 30 segundos. Las condiciones de ciclado predeterminadas para PCR se pueden cambiar para aumentar la etapa de desnaturalización de 95°C hasta 5 minutos, y la etapa de amplificación para ciclar entre 95°C durante 5 segundos y 60°C durante 30 segundos.

Un flujo de trabajo para obtener resultados rápidos de acuerdo con un ejemplo incluye una herramienta de análisis de software para interpretar resultados de PCR en tiempo real con el fin de proporcionar una llamada de presencia/ausencia simple. Un ejemplo de una herramienta de análisis de software es el software Rapid Finder Express, o RFE. El software RFE contiene ajustes para el número de ciclos de PCR y la intensidad relativa de la señal de fluorescencia para establecer umbrales que deben cumplirse para determinar si una muestra es positiva.

Aunque la especificación anterior enseña los principios de la presente invención, con ejemplos proporcionados con fines de ilustración, un experto en la técnica se dará cuenta mediante la lectura de esta divulgación que se pueden realizar diversos cambios en forma y detalle sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. Estos métodos no están limitados a ningún tipo particular de muestra o ácido nucleico contenido en ellos, por ejemplo, el ADN genómico total, ARN, ADNc y similares se pueden analizar usando algunos o todos los métodos descritos en esta divulgación. Los métodos tampoco están limitados por los ejemplos múltiples específicos descritos en los ejemplos y cualquier combinación de ensayos sencillos pueden usarse para hacer un diseño múltiple. Esta divulgación proporciona herramientas potentes para el análisis de muestras complejas de ácidos nucleicos. Desde el diseño del experimento hasta la detección de microbios que expresan la toxina Shiga, la divulgación anterior proporciona métodos rápidos, eficientes y económicos para la detección de organismos patógenos.

Aunque la presente invención se ha descrito con algún detalle a modo de ilustración y ejemplo a efectos de claridad y comprensión, será evidente que pueden practicarse ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Listado de secuencias

<110> LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION

<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE MÚLTIPLES MICROORGANISMOS

<130> LT00569 PCT

<140>

<141>

<150> 61/666.325

<151> 2012-06-29

<150> 61/527.107

<151> 2011-08-24

<160> 38

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

5 <400> 1
 gtgacagtag ctataccacg ttaca 25

<210> 2
 <211> 22
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 15 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 2
 agtgtgttac gaaatcccct ct 22

20 <210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: sonda sintética"

30 <400> 3
 atggcgattt atctgcatcc c 21

<210> 4
 <211> 24
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

40 <400> 4
 cgttttgacc atcttctgtct gatt 24

45 <210> 5
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

55 <400> 5
 tgcgacacgt tgcagagt 18

<210> 6
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

65 <400> 6
 cgttttgacc atcttctgtct gatt 24

<210> 7
 <211> 18
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

10 <400> 7
 tgcgacacgt tgcagcgt 18

15 <210> 8
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

25 <400> 8
 gatttctcac atatttcagt gcctgatg 28

30 <210> 9
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

35 <400> 9
 ccagatctgc gattcgctgt aat 23

40 <210> 10
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: sonda sintética"

<400> 10
 acggacagca gttatac 17

50 <210> 11
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

60 <400> 11
 gcgaatactg gcgagactat ttaa 25

65 <210> 12
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

5 <400> 12
 gctcatcata gctttctta ttgatgact ca 32

<210> 13
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 13
 gctcgcata gctttcttg ttgatgact ca 32

20 <210> 14
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: sonda sintética"

30 <400> 14
 ccgctcatgc ggaaatagcc gtt 23

<210> 15
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

40 <400> 15
 tggaactat cgaacaacat caaggt 26

45 <210> 16
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

55 <400> 16
 tgaatacttc atcttgggt agccatcc 28

<210> 17
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <221> fuente
 <223> /note = "Descripción de la secuencia artificial: sonda sintética"

65 <400> 17
 attgtacaag gcgatttc 18

<210> 18
 <211> 27
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"
 10
 <400> 18
 atgtatttg gatgccgta tctccat 27

 <210> 19
 <211> 27
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"
 20
 <400> 19
 gcttgaacg tgaaatgtaa accatca 27
 25
 <210> 20
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <221> fuente
 <223> /note = "Descripción de la secuencia artificial: sonda sintética"
 35 <400> 20
 ccgaactcat cataaaaag 19

 <210> 21
 <211> 29
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"
 45
 <400> 21
 gaaataattc ctttgatcag ggtagaggt 29
 50
 <210> 22
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"
 55
 <400> 22
 60 aatattgaa gaaggaaggc ataaggacat 30

 <210> 23
 <211> 21
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: sonda sintética"

5 <400> 23
 caggctcaa tacccatag t 21

<210> 24
 <211> 28
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 15 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 24
 acagagtatt gggagaggtt tatgagaa 28

20 <210> 25
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

25 <400> 25
 gaagaaaacc taccaagaca acaattgaa 29

30 <210> 26
 <211> 22
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /note = "Descripción de la secuencia artificial: sonda sintética"

40 <400> 26
 ttgaggttg ttcttattt cc 22

45 <210> 27
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

50 <400> 27
 catgcggtat agaaatgcaa ttgatagaca 30

55 <210> 28
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

65 <400> 28
 ccactgaaca gatgaataac agaacca 27

5 <210> 29
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: sonda sintética"
 <400> 29
 aacgcgaatt atttcg 17

15 <210> 30
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"
 <400> 30
 ggcaactgatg ctaaagctgt aaac 24

25 <210> 31
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"
 <400> 31
 gcaggcctaa aataccttgg atcta 25

35 <210> 32
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: sonda sintética"
 <400> 32
 ccgggcgatg taatta 16

45 <210> 33
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"
 <400> 33
 cttcctgcaa cttgcaact gaa 23

55 <210> 34
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <210> 34
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

5 <400> 34
 ctcgcctgat cgacaacaaa atg 23

<210> 35
 <211> 24
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 15 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: sonda sintética"

<400> 35
 agctggcgta atacttatac tcta 24

20 <210> 36
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

30 <400> 36
 tgacagtatc attacaaagc caaatcagt 29

<210> 37
 <211> 21
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

40 <400> 37
 ggccactacg cccttaatct c 21

45 <210> 38
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: sonda sintética"

55 <400> 38
 actgaataaa gagttaaacg cc 22

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de uno o más microorganismos que expresan uno o más factores de virulencia que comprende:

- a) poner en contacto una muestra sospechosa de contener uno o más microorganismos que expresan uno o más factores de virulencia con al menos dos conjuntos de cebadores oligonucleótidos específicos para hibridar con ácidos nucleicos objetivo específicos para uno o más factores de virulencia;
- b) amplificar al menos una secuencia de ácido nucleico objetivo específica para uno o más factores de virulencia mediante un método de amplificación múltiple para obtener uno o más ácidos nucleicos específicos de factor de virulencia amplificados;
- c) detectar uno o más ácidos nucleicos amplificados específicos del factor de virulencia o fragmentos o complementos de los mismos; y
- d) identificar los ácidos nucleicos amplificados específicos del factor de virulencia, en el que uno o más ácidos nucleicos amplificados específicos del factor de virulencia o fragmentos o complementos de los mismos es indicativa de la presencia de un microorganismo en la muestra que expresa uno o más factores de virulencia, en el que al menos dos conjuntos de cebadores oligonucleótidos específicos para uno o más factores de virulencia comprenden al menos un cebador directo y al menos un cebador inverso operable para hibridar con un ácido nucleico objetivo específico de toxina Shiga (*stx*) y al menos un cebador directo y al menos un cebador inverso operable para hibridar con ácido nucleico objetivo específico de *eae*,

en el que los cebadores oligonucleótidos específicos para hibridar con ácido nucleico objetivo específico de *stx* comprenden uno o más conjuntos de cebador seleccionados de un primer conjunto de cebador que tiene la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2; un segundo conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 5; un tercer conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 6 y la SEQ ID NO: 7; o un cuarto conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 9 y los cebadores oligonucleótidos específicos para hibridar con ácido nucleico objetivo específico de *eae* comprenden uno o más conjuntos de cebadores seleccionados de un conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 11 y la SEQ ID NO: 12 o un conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 11 y la SEQ ID NO: 13.

2. El método de la reivindicación 1, que comprende detectar un organismo STEC o *Shigella spp.*

3. Un método de la reivindicación 1, en el que uno o más factores de virulencia es una toxina Shiga que comprende:

- a) poner en contacto ácidos nucleicos presentes en la muestra con al menos un conjunto de cebadores *stx1*, que tiene un cebador directo y un cebador inverso, que comprende cebadores que tienen la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO 2 bajo condiciones para amplificar a partir de la muestra un ácido nucleico que codifica *stx1*, un fragmento o un complemento del mismo por; y
- b) amplificar simultáneamente a partir de la misma muestra un ácido nucleico que codifica *stx2*, un fragmento o un complemento del mismo poniendo en contacto simultáneamente ácidos nucleicos presentes en la muestra con al menos un conjunto de cebadores específicos de *stx2*, cada conjunto de cebadores de *stx2* con un cebador directo y uno inverso, seleccionados de: un primer conjunto de cebadores de *stx2* que tiene la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO 5; y/o un segundo conjunto de cebadores de *stx2* que tiene la SEQ ID NO: 6 y la SEQ ID NO: 7; y/o un tercer conjunto de cebadores de *stx2* que tiene la SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 9, en el que el contacto se realiza bajo condiciones adecuadas para una reacción de amplificación de ácido nucleico; y
- c) detectar al menos un ácido nucleico amplificado, amplificado ya sea mediante las reacciones de amplificación de las etapas a) y/o b), en las que la detección de al menos un ácido nucleico amplificado indica la presencia de un organismo productor de toxina Shiga en la muestra.

4. El método de la reivindicación 1, que comprende, además:
determinar la cepa de uno o más microorganismos que expresan uno o más factores de virulencia que comprende:

- a) poner en contacto la muestra con al menos un conjunto de cebadores oligonucleótidos específicos para la cepa de uno o más microorganismos;
- b) amplificar conjuntamente al menos una secuencia de ácido nucleico objetivo específica de la cepa que codifica para objetivos de ácido nucleico específicos para al menos una cepa del microorganismo mediante un método de amplificación múltiple para obtener uno o más ácidos nucleicos amplificados específicos de la cepa;
- c) detectar uno o más ácidos nucleicos amplificados específicos de la cepa o fragmentos o complementos de los mismos; y
- d) identificar los ácidos nucleicos amplificados específicos de la cepa.

5. El método según la reivindicación 4, en el que cada conjunto de cebadores oligonucleótidos específicos para uno o más factores de virulencia se marca con un marcador diferente y/o en el que cada conjunto de cebadores oligonucleótidos específicos para una o más cepas del microorganismo se marca con un marcador diferente.

6. El método de la reivindicación 4, en el que el microorganismo es una *E. coli* O26, una *E. coli* O45, una *E. coli* O103, una *E. coli* O111, una *E. coli* O121 o una *E. coli* O145.

7. El método de la reivindicación 6, en el que el microorganismo es una *E. coli* O121 y en el que los cebadores oligonucleótidos específicos para la cepa comprenden ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 15 y la SEQ ID NO: 16, complementos de los mismos, y secuencias que tienen al menos un 90% de homología con los mismos; y el método comprende opcionalmente además usar una sonda para detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo de *E. coli* O121 en la que la sonda comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 17, complementos de la misma, y secuencias que tienen al menos 90% de homología con la misma.

8. El método de la reivindicación 6, en el que el microorganismo es una *E. coli* O145 y en el que los cebadores oligonucleótidos específicos para la cepa comprenden ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 18 y la SEQ ID NO: 19, complementos de los mismos, y secuencias que tienen al menos un 90% de homología con los mismos; y el método que comprende opcionalmente además usar una sonda para detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo de *E. coli* O145 en el que la sonda comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 20, complementos de la misma, y secuencias que tienen al menos 90% de homología con la misma.

9. El método de la reivindicación 6, en el que el microorganismo es una *E. coli* O26 y en el que los cebadores oligonucleótidos específicos para la cepa comprenden ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 21 y la SEQ ID NO: 22, complementos de los mismos, y secuencias que tienen al menos 90% de homología con los mismos; y el método comprende opcionalmente además usar una sonda para detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo de *E. coli* O26 en el que la sonda comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 23, complementos de la misma, y secuencias que tienen al menos 90% de homología con la misma.

10. El método de la reivindicación 6, en el que el microorganismo es una *E. coli* O45 y en el que los cebadores oligonucleótidos específicos para la cepa comprenden ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 24 y la SEQ ID NO: 25, complementos de los mismos, y secuencias que tienen al menos un 90% de homología con los mismos; y el método que además comprende opcionalmente usar una sonda para detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo de *E. coli* O45 en el que la sonda comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 26, complementos de la misma, y secuencias que tienen al menos 90% de homología con la misma.

11. El método de la reivindicación 6, en el que el microorganismo es una *E. coli* O103 y en el que los cebadores oligonucleótidos específicos para la cepa comprenden ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 27 y la SEQ ID NO: 28, complementos de los mismos, y secuencias que tienen al menos un 90% de homología con los mismos; y el método que además comprende opcionalmente usar una sonda para detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo de *E. coli* O103 en el que la sonda comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 29, complementos de la misma, y secuencias que tienen al menos 90% de homología con la misma.

12. El método de la reivindicación 6, en el que el microorganismo es una *E. coli* O111 y en el que los cebadores oligonucleótidos específicos para la cepa comprenden ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 30 y la SEQ ID NO: 31, complementos de los mismos, y secuencias que tienen al menos 90% de homología con los mismos; y el método que comprende opcionalmente usar una sonda para detectar al menos una secuencia amplificada del polinucleótido objetivo de *E. coli* O111 en el que la sonda comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 32, complementos de la misma, y secuencias que tienen al menos 90% de homología con la misma.

13. Un kit para la detección de uno o más microorganismos que expresan uno o más factores de virulencia que comprende:

al menos dos conjuntos de cebadores oligonucleótidos específicos para hibridar con ácidos nucleicos objetivo específicos para uno o más factores de virulencia, en el que los cebadores oligonucleótidos específicos para uno o más factores de virulencia comprenden al menos un cebador directo y al menos un cebador inverso operable para hibridar con un ácido nucleico objetivo específico de toxina Shiga (*stx*) y al menos un cebador directo y al menos un cebador inverso operable para hibridar con ácido nucleico objetivo específico de *eae*, en el que uno o más conjuntos de cebadores oligonucleótidos específicos para el organismo productor de ácido nucleico objetivo específico de toxina Shiga (*stx*) comprenden:

al menos un par de conjuntos de cebadores de PCR directos e inversos seleccionados de un primer conjunto de cebadores que tienen la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO 2; y/o un segundo conjunto de cebadores que tienen la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO 5; y/o un tercer conjunto de cebadores que tienen la SEQ ID NO: 6 y la SEQ ID NO: 7; y/o un cuarto conjunto de cebadores que tienen la SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO 9, y/o secuencias que comprenden al menos 90% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos de las mismas, o un derivado marcado de las mismas; y que comprende opcionalmente al menos una sonda seleccionada de las sondas seleccionadas de la SEQ ID NO: 3, y la SEQ ID NO: 10 o secuencias que comprenden al menos 90% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos de las mismas, o un derivado marcado de las mismas; y

en el que uno o más conjuntos de cebadores oligonucleótidos específicos para el organismo productor de ácidos nucleicos objetivo específicos de *eae* comprenden:

5 al menos un par de conjuntos de cebadores de PCR directo e inverso seleccionados de un primer conjunto de cebadores que tienen la SEQ ID NO: 11 y la SEQ ID NO: 12; o que tiene la SEQ ID NO: 11 y la SEQ ID NO: 13 o
 10 secuencias complementarias de las mismas, o secuencias que comprenden al menos 90% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos de las mismas, o un derivado marcado de las mismas; y
 opcionalmente al menos una sonda se selecciona adicionalmente de la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 10, o secuencias complementarias de las mismas, o secuencias que comprenden al menos 90% de identidad de
 15 secuencia de ácidos nucleicos de las mismas, o un derivado marcado de las mismas; y
 uno o más componentes seleccionados de un grupo que consiste en: al menos una enzima, dNTP, al menos un regulador, al menos una sal, al menos una muestra de ácido nucleico de control y un protocolo de instrucciones.

14. El kit de la reivindicación 13, adicionalmente útil para determinar la cepa de uno o más microorganismos que expresan uno o más factores de virulencia, que comprende:
 uno o más conjuntos de cebadores oligonucleótidos específicos para la cepa de uno o más microorganismos seleccionados de:

- 20 a) la SEQ ID NO: 15 y la SEQ ID NO: 16, complementos de las mismas, y secuencias que tienen al menos 90% de homología con las mismas y derivados marcados de las mismas y el kit que comprende opcionalmente además una sonda que tiene la SEQ ID NO: 17, complementos de la misma, un derivado marcado de la misma y secuencias que tienen al menos un 90% de homología con la misma para detección de una cepa de *E. coli* O121;
- 25 b) la SEQ ID NO: 18 y la SEQ ID NO: 19 complementos de las mismas, derivados marcados de las mismas y secuencias que tienen al menos 90% de homología con las mismas; y el kit que comprende opcionalmente además una sonda que tiene la SEQ ID NO: 20, complementos de la misma, derivados marcados de la misma y secuencias que tienen al menos 90% de homología con la misma para la detección de una cepa de *E. coli* O145;
- 30 c) la SEQ ID NO: 21 y la SEQ ID NO: 22, complementos de las mismas, derivados marcados de las mismas y secuencias que tienen al menos 90% de homología con las mismas; y el kit que comprende opcionalmente además una sonda que tiene la SEQ ID NO: 23, complementos de la misma, derivados marcados de la misma y secuencias que tienen al menos un 90% de homología con la misma para la detección de una cepa de *E. coli* O26;
- 35 d) la SEQ ID NO: 24 y la SEQ ID NO: 25, complementos de las mismas, derivados marcados de los mismos y secuencias que tienen al menos 90% de homología con las mismas; y el kit que comprende opcionalmente además una sonda que tiene la SEQ ID NO: 26, complementos de la misma, derivados marcados de la misma y secuencias que tienen al menos un 90% de homología de la misma para la detección de una cepa de *E. coli* O45;
- 40 e) la SEQ ID NO: 27 y la SEQ ID NO: 28, complementos de las mismas, derivados marcados de los mismos y secuencias que tienen al menos 90% de homología con los mismos; y el kit que comprende opcionalmente además una sonda que tiene la SEQ ID NO: 29, complementos de la misma, y secuencias que tienen al menos 90% de homología con la misma para la detección de una cepa de *E. coli* O103;
- 45 f) la SEQ ID NO: 30 y la SEQ ID NO: 31, complementos de las mismas, derivados marcados de las mismas y secuencias que tienen al menos 90% de homología con las mismas; y el kit que comprende opcionalmente además una sonda que tiene la SEQ ID NO: 32, derivados marcados de la misma complementos de la misma, y secuencias que tienen al menos 90% de homología con la misma para la detección de una cepa de *E. coli* O111.

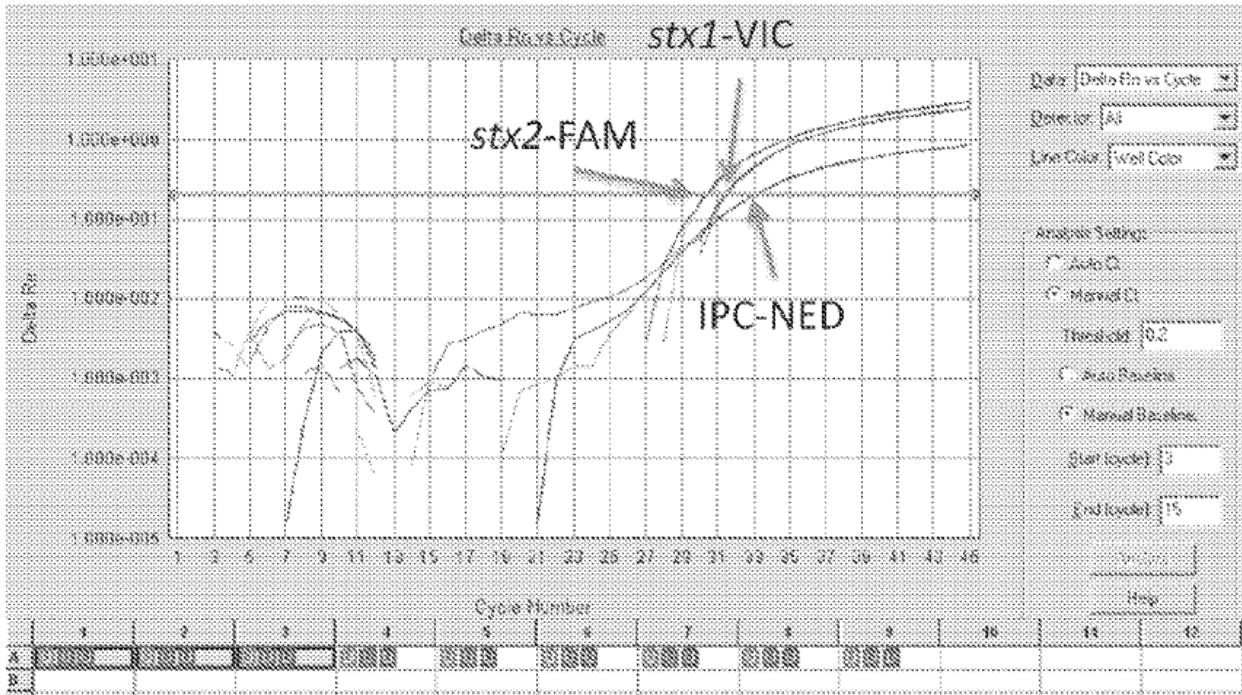
15. El kit de la reivindicación 14 que comprende:

45 dos o más pares de cebadores de reacción en cadena de la polimerasa directa e inversa (PCR) seleccionados de un primer conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 15 y la SEQ ID NO: 16; un segundo cebador que tiene la SEQ ID NO: 18 y la SEQ ID NO: 19; un tercer conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 21 y la SEQ ID NO: 22; un
 50 cuarto conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 24 y la SEQ ID NO: 25, un quinto conjunto de cebador que tiene la SEQ ID NO: 27 y la SEQ ID NO: 28; un sexto conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 30 y la SEQ ID NO: 31, o secuencias complementarias del mismo, o secuencias que comprenden al menos 90% de identidad de secuencia de ácido nucleico con el mismo, o un derivado marcado del mismo;
 opcionalmente al menos una sonda seleccionada de la SEQ ID NO: 17; la SEQ ID NO: 20; la SEQ ID NO: 23; la SEQ ID NO: 26; la SEQ ID NO: 29; y la SEQ ID NO: 32 y/o secuencias que comprenden al menos 90% de identidad de
 55 secuencia de ácidos nucleicos con la misma, o un derivado marcado de la misma;
 y opcionalmente además en el que los dos o más pares de cebadores de PCR directos e inversos se seleccionan adicionalmente de un séptimo conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 11 y la SEQ ID NO: 12 y la SEQ ID NO: 13; un octavo conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2; un noveno conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 5; un décimo conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 6 y la SEQ ID NO:
 60 NO: 7; un undécimo conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 9 y/o secuencias que comprenden al menos 90% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos de los mismos, o un derivado marcado de los mismos; y
 opcionalmente al menos una sonda adicional se selecciona la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 10, o secuencias complementarias de la misma, o secuencias que comprenden al menos 90% de identidad de secuencia de
 65 ácidos nucleicos con la misma, o un derivado marcado de la misma; y

5 adicionalmente, opcionalmente, en el que los dos o más pares de cebadores de PCR directa e inversa se seleccionan además de un duodécimo conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 33 y la SEQ ID NO: 34; un decimotercer conjunto de cebadores que tiene la SEQ ID NO: 36 y la SEQ ID NO: 37 y/o secuencias que comprenden al menos 90% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos de los mismos, o un derivado marcado de los mismos; y opcionalmente, al menos una sonda se selecciona adicionalmente de la SEQ ID NO: 35, la SEQ ID NO: 38; o secuencias complementarias a la misma, o secuencias que comprenden al menos 90% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos con la misma, o un derivado marcado de la misma.

FIG. 1:

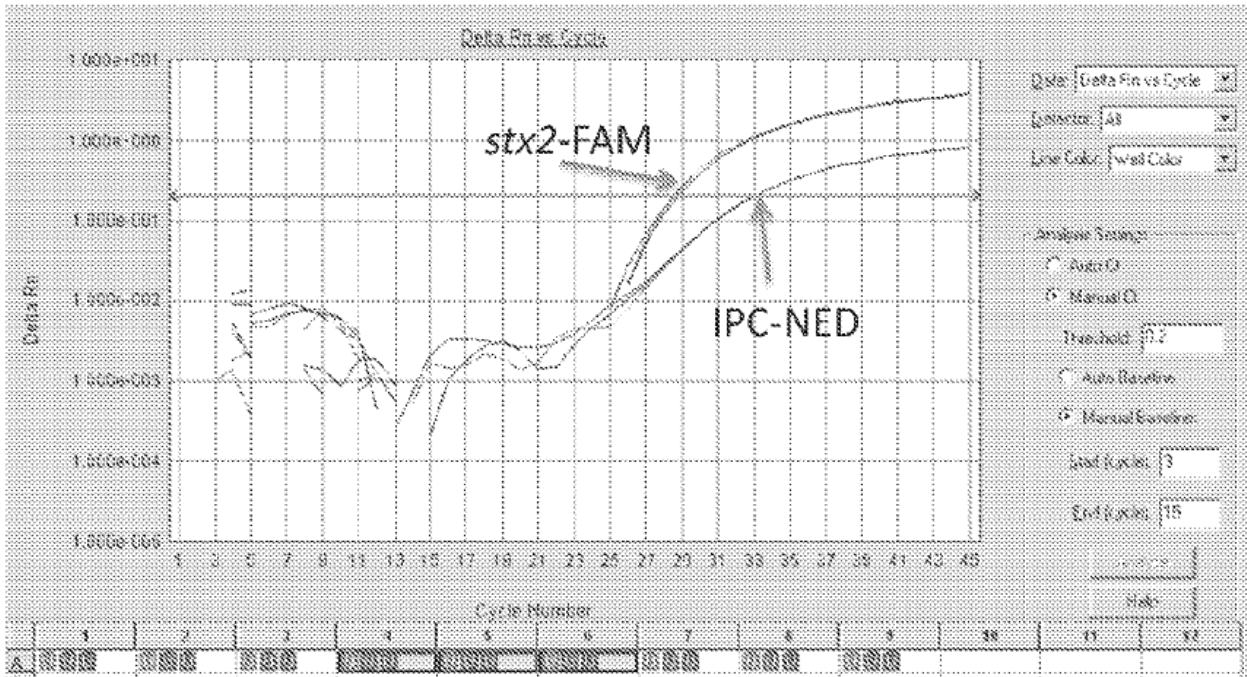
Datos múltiples usando *E. coli* O157:H7 (ATCC BAA-460) como molde (10.000 Copias)



- O157:H7 es positivo tanto para *stx1* como para *stx2*
 - *stx1* VIC Ct ~ 31.3
 - *stx2* FAM Ct ~ 30.3
 - IPC NED Ct ~ 33

FIG. 2:

Datos múltiples usando *E. coli* O104:H4 (Cepa de brote alemán 2011) como molde (10.000 copias)



- *E. coli* O104:H4 es negativa para stx1 y positiva para stx2
 - *stx1* VIC Ct es "indeterminado"
 - *stx2* FAM Ct ~ 28.5
 - IPC NED Ct ~ 33

FIG. 3:

Detección de *stx1* de un panel de 161 cepas bacterianas (146 cepas de *E. coli* y 15 no son de *E. coli*)

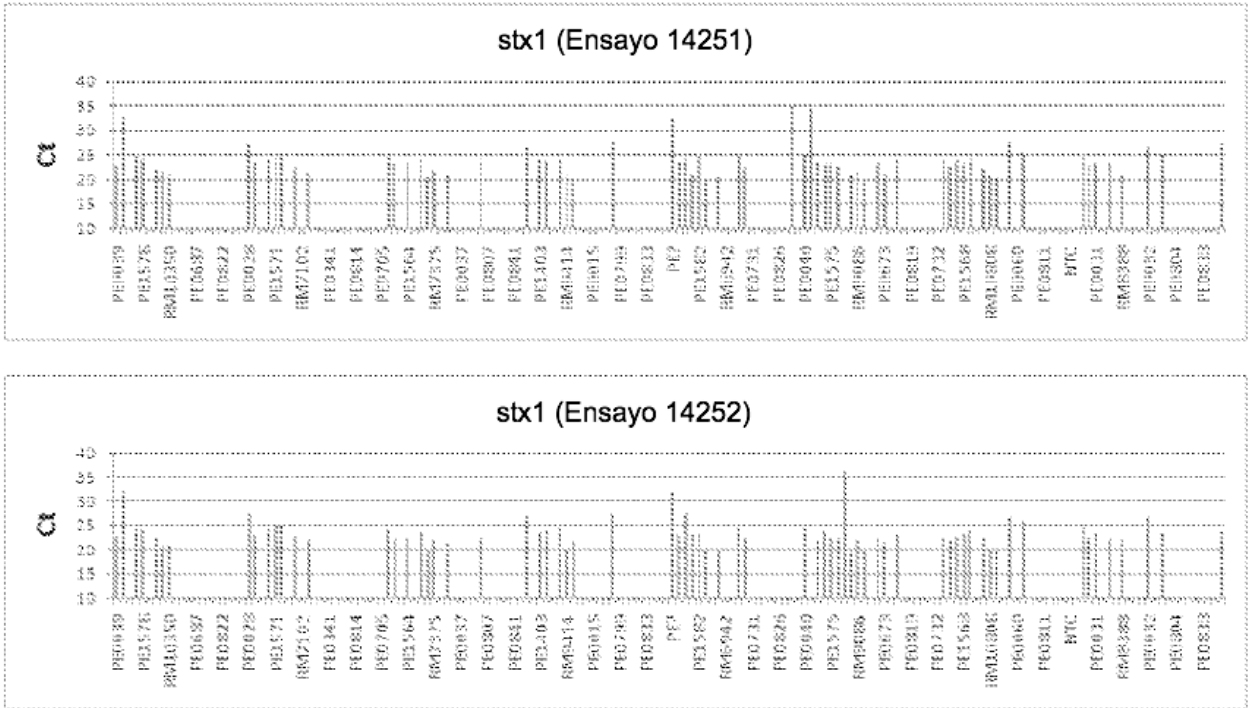


FIG. 4:

Detección de *stx2* de un panel de 161 cepas bacterianas (146 cepas de *E. coli* y 15 no son de *E. coli*)

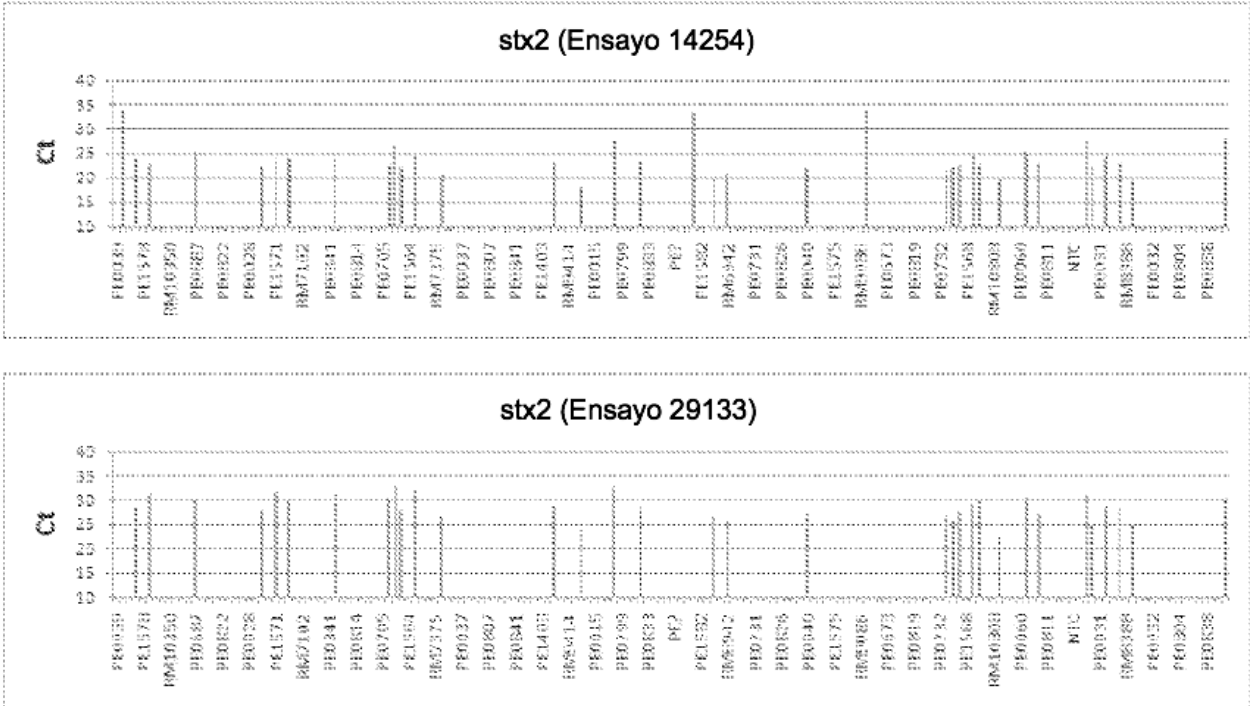


FIG 5A y FIG 5B: prueba de inclusión/exclusión de eae

FIG 5A:

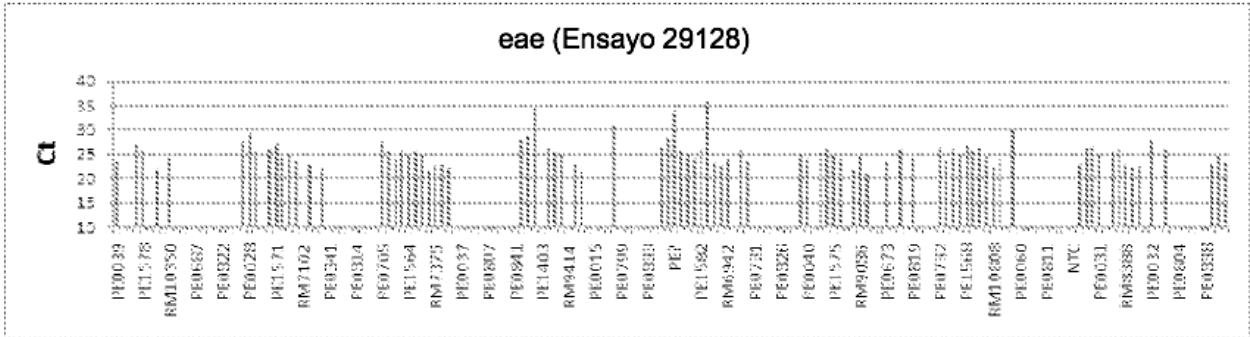


FIG 5B:

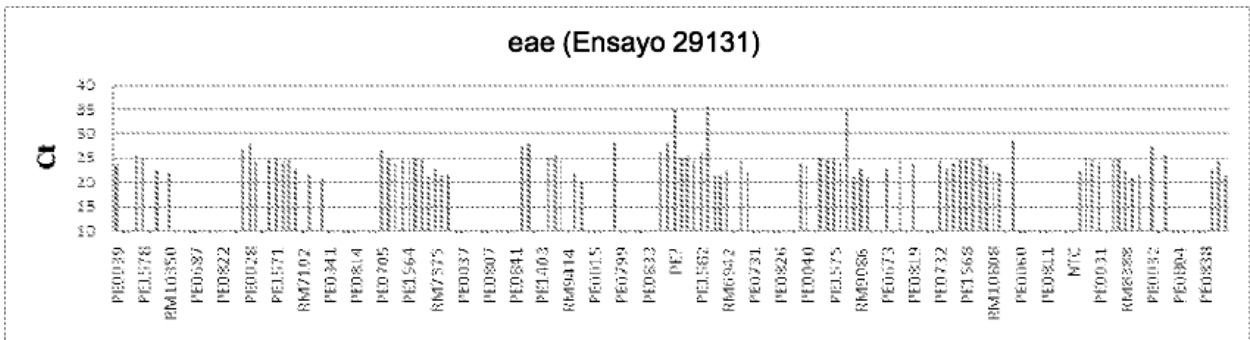


FIG. 6: Ensayos múltiples frente a sencillos del DOE

FIG 6A:

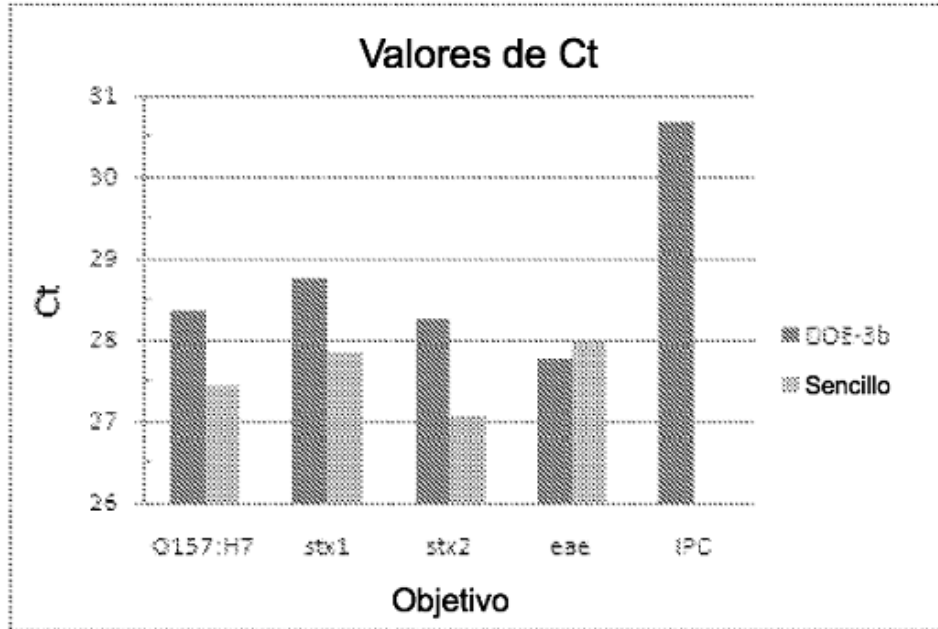
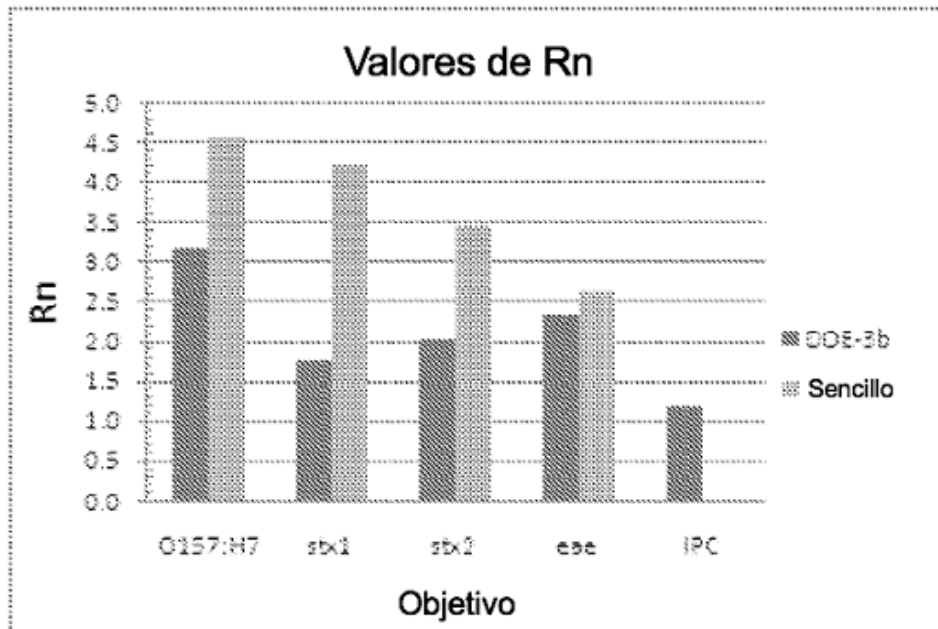


FIG 6B:



100.000 copias (lisado)

FIG: 7A y 7B

