

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 507**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.04.2011 PCT/DE2011/000460**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2011 WO11131178**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2011 E 11731241 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 2561362**

54 Título: **Método para la detección de una infección por salmonela**

30 Prioridad:

23.04.2010 DE 102010018085

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

18.02.2019

73 Titular/es:

**BIOSERV ANALYTIK UND MEDIZINPRODUKTE
GMBH (100.0%)**

**Dr. -Lorenz-Weg 1
18059 Rostock, DE**

72 Inventor/es:

**MEYER, UDO;
STEINMANN, ALAIN;
FAHLANDT, HEIKE y
SCHULZ, BABETTE**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 700 507 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

Método para la detección de una infección por salmonela

5 [0001] La invención se refiere a un método diagnóstico para la identificación de una infección por salmonela según la reivindicación 1. Campos de aplicación son la medicina, medicina veterinaria y diferentes ramas de la industria. Las salmonelas consisten en bastoncillos móviles gram negativos. Taxonómicamente las salmonelas se diferencian por la aparición de antígenos de cuerpo (O) y flagelo (H) y se incorporan en un sistema de serovariedades y se caracterizan mediante su serofórmula. Actualmente se han descrito aproximadamente 2.400 serovariedades de salmonela. En la práctica poseen importancia como agentes patógenos de enfermedades epidemiológicas pero únicamente 20-30 serovariedades (p.ej. S. typhi, S. Paratyphi A, b, C así como una gran cantidad de agentes de enteritis).

10 La salmonelosis se provoca en las personas en su mayoría a través del consumo de alimentos infectados o contaminados. La transmisión del contacto de animales a personas tiene poca importancia. También una transmisión indirecta o directa de ser humano a ser humano es generalmente un acontecimiento raro, puede ocurrir sin embargo en infecciones hospitalarias en personas predispuestas o en condiciones higiénicas desfavorables. Fuentes de infecciones primarias son principalmente comidas provenientes de pescados, cerdos y vacas. Dado que los animales solo raramente enferman, la prueba del anticuerpo o de agente patógeno tiene gran importancia también en la medicina veterinaria y la industria alimentaria. La dosis de infección en personas adultas sanas comprende desde 10^4 hasta 10^6 gérmenes. El tiempo de incubación depende de la dosis de infección entre 5 y 72 horas. En una infección de salmonela-enteritis, la enfermedad se manifiesta con diarrea, náuseas, vómitos y fiebre desde moderada hasta leve. En la mayoría de los casos los síntomas solo duran unas pocas horas hasta días, pero en personas debilitadas o en niños pueden también llevar a la muerte. La eliminación de gérmenes después de una infección por salmonela dura de media 3 hasta 6 semanas, en lactantes eventualmente también varios meses. En casos raros puede también aparecer un transcurso crónico. Según la ley de protección de infección, la sospecha de enfermedad de gastroenteritis infecciosa aguda está sujeta a declaración obligatoria bajo determinadas circunstancias.

La detección de salmonela está siempre sometida al registro obligatorio.

15 En la UE existen muchas disposiciones legales para el tratamiento de salmonela (p.ej. Reglamento de salmonela ovina, Reglamento de salmonela de aves, diferentes preceptos del Derecho de alimentos y pienso, entre otros).

20 El centro de gravedad del diagnóstico clínico o de analítica de alimentos de salmonela se encuentra en el cultivo de agentes patógenos procedentes de un alimento (también piezas de matanza) o de muestras de materias fecales o excrementos y en la exclusión o detección serológica de salmonela en el caso de sospecha mediante búsquedas de salmonela omni o polivalentes. Habitualmente un diagnóstico de este tipo solo se puede emitir aprox. 1 - 2 días después de entrada de la muestra en el laboratorio. Para una declaración segura de que existe una infección por salmonela, se necesitan otros 2 - 3 días. Para ello los clones individuales sospechosos se caracterizan bioquímicamente por tira coloreada y se siguen caracterizando serológicamente. La diferenciación serológica se realiza mediante antisueros contra antígenos O y H en la prueba de aglutinación según el esquema Kaufmann-White. Esto significa que para la detección definitiva de una infección por salmonela son necesarios 3-5 días. Particularmente, en el caso de salmonelosis provocadas por alimentos, representa un gran problema el período largo hasta el diagnóstico, porque entretanto se pueden infectar otras personas. Por ello, en caso de sospecha de salmonela se trata de localizar la fuente de infección e impedir otras infecciones. Para que esto pueda ocurrir a corto plazo, es de importancia fundamental una posición diagnóstica lo más rápida posible.

25 La detección serológica de anticuerpos se usa sobre todo en la industria alimenticia y en la medicina veterinaria en forma de sistemas ELISA. La detección se realiza entre otros a partir de zumo de carne, sangre o muestras de algodón/esponja abrasiva. Desventaja de este procedimiento es que no se pueden detectar de forma segura una serie de serovariedades patógenas de salmonela.

30 [0002] En la medicina humana, por el contrario, en infecciones por salmonela se usa la prueba de aglutinación Widal como complemento de la detección del agente patógeno bacteriológico. La desventaja de este método es que por un lado no todas las infecciones conducen a la formación de anticuerpos contra antígenos O, es decir, los anticuerpos contra antígenos H pueden persistir durante años. Puesto que los títeres contra antígenos O a menudo se han desprendido en unas pocas semanas de tal manera que ya es posible su detección, no se puede distinguir de modo seguro entre una infección aguda y una infección ya pasada. En el cultivo in-vitro de salmonela se elimina por esta en el medio de cultivo una serie de proteínas. Una de estas proteínas es la llamada proteína-SipC (proteína de invasión de salmonela), cuya secuencia de aminoácidos y de nucleótidos está disponible en bases de datos.

35 [0003] La proteína-SipC forma parte de las proteínas efectoras, que hacen posible la invasión de la salmonela en las células huésped. La invasión se permite a través de la polimerización y condensación de filamentos de actina. Este proceso se designa como "atado". La toma de las bacterias se realiza por macropinocitosis. A esto precede un intercambio de señal intenso entre agente patógeno y célula huésped. Surge un rizado de la membrana de la célula huésped, producida por factores de crecimiento eucarióticos.

40 A través del rizado de la membrana surgen vacuolas ligada por membrana, en las que se alojan las salmonelas. Bajo condiciones normales se evita el rizado de membrana y la invasión de bacterias resultante a través de inhibidores de microfilamento, como p.ej. citocalasina D. Este hecho clarifica la necesidad de polimerización de actina para la invasión de bacterias.

Se mostró que esta proteína SipC por si sola se absorbe por la célula huésped sin los efectos de otros componentes de la célula huésped y conducen al "atado" de los filamentos de actina.

[0004] Se describe la utilización de cebadores PCR y sondas de hibridación contra el gen SipC para la detección de salmonela. No se tuvo en cuenta la utilización de anticuerpos contra la SipC para la detección inmunológica. Por HAYWARD et al. (1999) y también WEIHRAUCH et al. (2002) se describe la detección de SipC en el inmunoblot usando un anticuerpo policlonal. La desventaja de los antisueros utilizados se encuentra en su reactividad cruzada. Por ello no eran adecuados para una detección específica de salmonela. Hay también protecciones legales que se refieren a la detección de infecciones por salmonela. En la publicación de patente de EE.UU. 2007/0031906A1, H. Klein et al, se divulga un sistema de prueba y un método de prueba. Contiene por lo menos un anticuerpo monoclonal que reacciona con la proteína SipC. No se describe contra qué secuencias peptídicas reacciona el anticuerpo reivindicado.

La patente WO 97/18225 divulga un método para la detección de salmonela aplicando anticuerpos contra Ssp que corresponde a la SipC. En este caso WO 97/18225 no divulga contra que secuencia peptídica se dirige el anticuerpo reivindicado. El objetivo de la invención consiste en desarrollar una prueba fiable para la detección de salmonela. Tiene la tarea de desarrollar un método que haga posible una detección lo antes posible y que considere todas las serovariedades. La invención se realiza según las reivindicaciones 1-10.

Base de la invención es la utilización de proteínas de SipC para la detección de una infección por salmonela.

Esta proteína se expulsa en el metabolismo de salmonela.

Punto central de la invención es la sorprendente comprobación de que en la proteína SipC se forman áreas altamente antigénicas.

La invención se basa en que estas áreas se pueden detectar con anticuerpos o secuencias de ácido nucleico correspondientes. En la patente WO/2007/016912 se describe la proteína SipC como una albúmina muy conservada y se remite a que en todas las serovariedades de salmonela las secuencias de aminoácidos de la proteína SipC solo presentan diferencias muy pequeñas y forman las proteínas del tipo HI del sistema de secreción en una fase muy temprana. El fundamento desarrollado sobre esta base para la detección de SipC lo forman diferentes anticuerpos monoclonales contra la proteína. Este sistema de detección permite responder a la pregunta sobre si existe una infección activa por salmonela en el organismo.

Con ocasión del análisis estructural de la secuencia de aminoácidos mediante 3 métodos diferentes, llamó la atención que sorprendentemente en la proteína están formadas 5 áreas altamente antigénicas. Se identificaron las siguientes secuencias de aminoácidos:

1. La sección de proteína 363-378 con la secuencia VASTASDEARESSRKS (SEQ ID NO 1)
2. La sección de proteína 15-30 con la secuencia NNHSVENSSQTASQSV (SEQ ID NO 2)
3. La sección de proteína 343-357 con la secuencia GQYAATQERSEQQIS (SEQ ID NO 3)
4. La sección de proteína 276-289 con la secuencia LGIKDSNKQISPEH (SEQ ID NO 4)
5. La sección de proteína 246-260 con la secuencia LNMKKTGTDATKNLN (SEQ ID NO 5)

[0005] En la proteína total las secciones de péptidos están dispuestas como sigue:

ES 2 700 507 T3

| | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| MLISNMGINP | AAYLNNHSVE | NSSQTASQSV | SAKDILNSIG | ISSSKVSDLG | LSPTLSAPAP |
| 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| GVLTPGTI | TSFLKASIQN | TDMNQDLNAL | ANNVTTKANE | VVQTQLREQQ | AEVGKFFDIS |
| 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| GMSSSAVALL | AAANTLMLTL | NQADSKLSGK | LSLVSFDDAK | TTASSMMREG | MNALSGSISQ |
| 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| SALQLGITGV | GAKLEYKGLQ | NERGALKHNA | AKIDKLTES | HSIKNVLNGQ | NSVKLGAEGV |
| 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
| DSLKSLNMKK | TGTDATKLN | DATLKSNAQT | SATESLGIKD | SNKQISPEHQ | AILSKRLESV |
| 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 |
| ESDIRLEQNT | MDMTRIDARK | MQMTGDLIMK | NSVTVGGIAG | ASGQYAATQE | RSEQQISQVN |
| 370 | 380 | 390 | 400 | | |

NRVASTASDE ARESSRKSTS LIQEMLKTME SINQSKASAL AAIAGNIRA (SEQ ID NO 6)

5 [0006] Aunque los péptidos ya por si solos causan una inducción de anticuerpo, ha resultado adecuado según la invención ligar estos péptidos a sustancias portadoras habituales como p.ej. hemocianina. Para la fabricación de anticuerpos antipeptídicos policlonales se inmunizan de manera conocida con los péptidos animales de experimentación como conejos, coballas, cabras, pollos o pescado. Para la fabricación de anticuerpos monoclonales según la invención los péptidos se usan de manera conocida para la inducción de células B específicas, que después de la fusión con células de mieloma generan células de hibridoma, que se cultivan según métodos de clonación conocidos y después se segregan los anticuerpos monoclonales específicos. Se pudo detectar que los monoanticuerpos reaccionan de forma altamente específica con la proteína SipC.

15 [0007] La proteína SipC consiste en una parte central hidrófoba (aminoácidos 121 - 199) y dos piezas hidrófilas. Los dominios n-terminales (aminoácidos 1 - 120 y los dominios c-terminales (aminoácidos 200 - 409). Puesto que las partes hidrófilas de la proteína son solubles en concentraciones altas bajo condiciones fisiológicas, estas y la secuencia de la proteína total se identificaron en comparación con las secuencias de los péptidos inmunógenos identificados en E. Coli (cepa BL21, vector pET28a).

| | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| MLISNMGINP | AAYLNNHSVE | NSSQTASQSV | SAKDILNSIG | ISSSKVSDLG | LSPTLSAPAP |
| 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| GVLTPGTI | TSFLKASIQN | TDMNQDLNAL | ANNVTTKANE | VVQTQLREQQ | AEVGKFFDIS |
| 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| GMSSSAVALL | AAANTLMLTL | NQADSKLSGK | LSLVSFDDAK | TTASSMMREG | MNALSGSISQ |
| 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| SALQLGITGV | GAKLEYKGLQ | NERGALKHNA | AKIDKLTES | HSIKNVLNGQ | NSVKLGAEGV |
| 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
| DSLKSLNMKK | TGTDATKLN | DATLKSNAQT | SATESLGIKD | SNKQISPEHQ | AILSKRLESV |
| 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 |
| ESDIRLEQNT | MDMTRIDARK | MQMTGDLIMK | NSVTVGGIAG | ASGQYAATQE | RSEQQISQVN |
| 370 | 380 | 390 | 400 | | |

NRVASTASDE ARESSRKSTS LIQEMLKTME SINQSKASAL AAIAGNIRA (SEQ ID NO 6)

20

Secuencia de ácido nucleico:

atg tta att agt aat gtg gga ata aat ccc gcc gct tat tta **aat aat cat**
tct gtt gag aat agt tca cag aca gct tcg caa tcc gtt agc gct aaa gat
att ctg aat agt att ggt att agc agc agt aaa gtc agt gac ctg ggg ttg
agt cct aca ctg agc gcg cct gcg cca ggg gta tta acg caa acc ccc gga
acg atc acg tcc ttt tta aaa gcc agt att caa aat acc gac atg aat cag
gat ttg aat gct ctg gca aat aat gtc acg act aaa gcg aat gag gtt gtg
caa acc cag tta cgc gag cag cag gca gaa gtc gga aag ttt ttt gat att
agc gga atg tct tcc agt gcc gtt gcg ctg ttg gct gcc gcg aat acg tta
atg ctg acg ttg aac cag gct gat agc aaa ctg tct ggt aag ttg tca tta
gtc agt ttt gat gca gct aaa acg acg gca agc tcc atg atg cgc gaa ggg
atg aat gcg ttg tcc ggt agt att tcc cag agc gcg ctt cag ttg ggg atc
act ggc gtg ggc gcc aaa ctg gaa tat aag ggg ctg cag aat gaa aga ggc
gcg ctt aaa cat aat gcc gcg aag atc gat aaa ctg acc act gaa agc cac
agt att aaa aac gtg ctg aac ggg cag aat agc gtc aaa ctc ggt gct gaa
ggc gtc gat tct ctg aaa tcg **tta aat atg aag aaa acc ggt acc gat gcg**
acg aaa aat ctt aat gat gcg acg ctt aaa tct aat gcc gga acc agc gcc
acg gaa agt **ctg ggt att aaa gac agt aat aaa caa atc tcc cct gaa cat**
cag gct att ctg tcg aaa cgt ctt gag tct gtc gaa tcc gat att cgt ctt
gag cag aat acc atg gat atg acc cga atc gat gcg cgc aag atg cag atg
acg ggc gat ctg att atg aag aac tcg gtc acg gtc ggt ggt att gca ggg
gcg tcc **ggg cag tac gcc gct act cag gaa cgt tcc gag cag caa att agc**
cag gtg aat aac cgg **gtt gcc agc acc gca tcg gac gaa gcc cgt gaa agt**
tca cgt aaa tcg acc agc ctg att cag gaa atg ctg aaa aca atg gag agc
att aac cag tcg aaa gca tcc gca ctc gct gct atc gca ggc aat att cgc
gct taa (SEQ ID NO 7)

- 5 [0008] A continuación se explican más en detalle los detalles del método según la invención. La identificación de una infección/contaminación de salmonela se realiza en excrementos de pacientes/animales, cadáveres, huevos, alimentos y piensos, donde se detecta la SipC de todas las serovariedades de salmonela conocidas según la reivindicación 1.
- 10 [0009] Esta determinación se realiza mediante sistemas inmunoquímicos usando anticuerpos monoclonales, que se dirigen contra las siguientes secuencias peptídicas:
- NH₂-V-A-S-T-A-S-D-E-A-R-E-S-S-R-K-S-COOH (SEQ ID NO 1),
NH₂-N-N-H-S-V-E-N-S-S-Q-T-A-S-Q-S-V-COOH (SEQ ID NO 2),
15 NH₂-G-Q-Y-A-A-T-Q-E-R-S-E-Q-Q-I-S-COOH (SEQ ID NO 3),
NH₂-L-G-I-K-D-S-N-K-Q-I-S-P-E-H-COOH (SEQ ID NO 4) und
NH₂-L-N-M-K-K-T-G-T-D-A-T-K-N-L-N-COOH (SEQ ID NO 5)
- o con secuencias de ácido nucleico que corresponden a las secuencias citadas.
- 20 Los anticuerpos empleados según la invención se obtienen mediante antígenos, que representan la SipC completa o subunidades de la misma, donde no se usa la secuencia de aminoácidos de la SipC completa.
- [0010] Como antígenos también se usan los péptidos fabricados sintéticamente, que después de las inmunización de animales producen anticuerpos que reconocen SipC o sus subunidades hidrófilas e hidrófobas.
- 25 [0011] Los anticuerpos obtenidos se pueden usar individualmente o en combinación en sistemas de detección inmunoquímicos.

[0012] El método no conforme con la invención para la obtención de anticuerpos monoclonales y/o policlonales que reacciona específicamente con SipC y se produce por métodos habituales de inmunización, se caracteriza por el hecho de que los péptidos mencionados anteriormente

5
 NH₂-V-A-S-T-A-S-D-E-A-R-E-S-S-R-K-S-COOH (SEQ ID NO 1),
 NH₂-N-N-H-S-V-E-N-S-S-Q-T-A-S-Q-S-V-COOH (SEQ ID NO 2),
 NH₂-G-Q-Y-A-A-T-Q-E-R-S-E-Q-Q-I-S-COOH (SEQ ID NO 3),
 NH₂-L-G-I-K-D-S-N-K-Q-I-S-P-E-H-COOH (SEQ ID NO 4),
 10 NH₂-L-N-M-K-K-T-G-T-D-A-T-K-N-L-N-COOH (SEQ ID NO 5)

o péptidos parciales inmunógenos de esos se usan como antígenos para la inmunización de vertebrados, particularmente de pequeños mamíferos y pájaros.

15 [0013] Se ha demostrado como adecuado acoplar los péptidos libres antes de la inmunización a sustancias portadoras adecuadas, preferiblemente hemocianina o albúmina.

[0014] Los anticuerpos policlonales se pueden producir entre otros usando pollos.

20 [0015] Objeto de la invención son los anticuerpos no usados policlonales o monoclonales, que se producen como se ha descrito.

[0016] Todos los sistemas de limpieza y detección de SipC, que contienen al menos uno de los anticuerpos según la invención contra los péptidos mencionados anteriormente, están comprendidos por la solicitud de patente. Con los anticuerpos se construyen kits de prueba inmunológicos con uno o varios anticuerpos para el diagnóstico/determinación de infecciones/contaminaciones de salmonela/iones a partir de excrementos o diferentes matrices. Dichos lotes de prueba pueden contener también 2 anticuerpos diferentes (ELISA-sándwich). El método para la fabricación de un sistema de prueba para el reconocimiento/determinación de infecciones/contaminación de salmonela a partir de muestras de heces o matrices diferentes comprende los pasos:

30
 a. Síntesis química de las secuencias peptídicas identificadas o
 b. Digestión de SipC por división proteolítica/química y uso de los productos de escisión para la inmunización de animales de experimentación con obtención sucesiva de anticuerpos de estos animales o de células de ganglios linfáticos/bazo/sangre u otras partes del cuerpo y fusión de estas células con células de mieloma,
 35 c. Obtención y purificación de los anticuerpos formados en los animales o en un huevo puesto por ellos o aislamiento de anticuerpos monoclonales a partir de líquido de cultivo de células,
 d. Unión de una combinación de los anticuerpos purificados a un soporte adecuado.

[0017] La división de las proteínas contenidas en el sobrenadante de cultivo se realiza mediante bromuro de cianógeno o mediante una o varias proteasas. Como proteasas se usan preferiblemente una combinación de tripsina y pepsina. Cuando los anticuerpos se producen a través de inmunización, los anticuerpos se purifican de un huevo puesto por una gallina. Otras purificaciones de anticuerpos pueden ocurrir por medio de una columna A de proteínas o por otros métodos de cromatografía de iones, de afinidad o de gel, o a través del precipitado fraccionado. Los anticuerpos purificados se pueden ligar químicamente o de forma adsorbente a soportes resistentes.

[0018] El soporte está formado preferiblemente como partícula, membrana o placa. Consiste en membranas de nitrocelulosa, acetato de celulosa o PTFE o en la cavidad de una placa de microtítulo o una placa plana o partícula esférica.

50 [0019] Según la divulgación, el método de diagnóstico/determinación de infecciones por salmonela consiste en las siguientes etapas

a. fabricación de un sistema de pruebas,
 55 b. Incubación del soporte con materias fecales/excrementos/materias enriquecidas con excrementos / precultivos enriquecidos de otros sustratos,
 c. Detección de las proteínas unidas al soporte procedentes de los sustratos de examen citados en b), con ayuda de anticuerpos de detección.

60 [0020] En el caso de los otros sustratos se trata de cerdos y partes del cerdo, entre otros, mamíferos / pájaros (carne, sangre, órganos) muestras del ambiente (excrementos, muestras de algodón, muestras de esponja abrasiva, muestras de botas/calzetas, polvo de establo) alimentos y pienso. En el método se pueden formar tanto los anticuerpos de detección como también los anticuerpos depurados como anticuerpos secundarios.

65 [0021] En otros casos se usan también anticuerpos de reacción cruzada y/o una combinación de anticuerpos de origen diferente.

[0022] El método se caracteriza por el hecho de que se usa un método de detección inmunológico, pudiendo tratarse de ELISA, un ensayo por tiras o migración. Los anticuerpos de detección están preferiblemente marcados, pudiendo entrar en consideración biotina, peroxidasa, oro o colorantes fluorescentes. Donde tiene sentido, se puede usar sustrato de peroxidasa y/o estreptavidina marcada con peroxidasa. Como sustrato de peroxidasa sirve preferiblemente TMB. La transformación del sustrato de peroxidasa se detecta a través de un producto visible ópticamente.

Ejemplo de realización 1 - fabricación de anticuerpos anti-peptídicos específicos, que se dirigen contra secciones definidas de la proteína SipC (no según la invención).

[0023] Mediante la síntesis en fase sólida de Merrifield los péptidos se sintetizan con las secuencias de aminoácidos NH₂-V-A-S-T-A-S-D-E-A-R-E-S-S-R-K-S-COOH (SEQ ID NO 1), NH₂-N-N-H-S-V-E-N-S-S-Q-T-A-S-Q-S-V-COOH (SEQ ID NO 2), NH₂-G-Q-Y-A-A-T-Q-E-R-S-E-Q-Q-I-S-COOH (SEQ ID NO 3), NH₂-L-G-I-K-D-S-N-K-Q-I-S-P-E-H-COOH (SEQ ID NO 4) und NH₂-L-N-M-K-K-T-G-T-D-A-T-K-N-L-N-COOH (SEQ ID NO 5). Los péptidos se acoplan con métodos conocidos a hemocianina de lapa californiana (KLH) (1 mg de péptido/mg KLH). 300 µg de este conjugado se usan respectivamente con el adyuvante de Freund para la inmunización de conejos o pollos. Después de inmunizar 3 veces, los animales se desangran. Después de la obtención del suero, se prueba la especificidad de los antisueros en un ELISA. Para ello, el péptido libre de la superficie de las cavidades se adsorbe por placas de microtítulo. Después de incubar las cavidades con los antisueros, se lavan a conciencia. Bajo aplicación de conjugado POD anticonejo y antipollo y TMB como sustrato, se detecta de modo habitual la reacción de anticuerpos de antígenos. Cada antisuero solo reacciona con los péptidos homólogos.

Ejemplo de realización 2 - detección de la especificidad de los anticuerpos (no según la invención)

[0024] La especificidad de SipC se puede probar en western blot. Para ello la SipC limpiada en profundidad o limpiada de modo superficial procedente de sobrenadantes de cultivo de Salmonella ssp. se separa mediante electroforesis de poli-acrilamida en correspondencia con su peso en mol, de impurezas presentes. Las zonas de proteínas del gel se pasan con ayuda de un aparato de "transferencia en seco" a nitrocelulosa. Después de saturación de los sitios de enlace libres de la membrana con leche desnatada en seco resuspendida, las membranas se incuban con los sueros de anti-peptídicos diluidos 1:500. Después del lavado intenso de las membranas para la eliminación de todos los anticuerpos ligados de modo no específico, las membranas se incuban con anticuerpos de antiespecies marcados con fosfatasa.

[0025] Los anticuerpos secundarios específicamente ligados, que después del lavado permanecen sobre la membrana, se hacen visibles después de la adición del sustrato. Se muestra en este caso que en las muestras utilizadas exclusivamente de detectó SipC.

Ejemplo de realización 3 - determinación de SipC en el sobrenadante de cultivo de Salmonella spp. usando el anticuerpo en un ELISA (no según la invención)

[0026] La SipC en los sobrenadantes de Salmonella ssp. se determina en un ensayo inmunoenzimático que está basado en la técnica sándwich. Un anticuerpo policlonal que está dirigido contra el epítipo de la SipC se disuelve en una mezcla de tampón de carbonato/bicarbonato, pH 9,6 y se introduce en los pocillos de una placa de microtítulo. Después de la incubación a 4° C durante 12 h se eliminan los anticuerpos no ligados por lavado con PBS. Los sitios de enlace todavía libres del material portador se bloquean por un tampón PBS, que contiene albúmina de suero bovino y Tween 20. El bloqueo se realiza a temperatura ambiente durante 90 min. Después del lavado se introducen en pocillos los sobrenadantes de cultivo diluidos en PBS. La incubación de 60 minutos a temperatura ambiente es finalizada por lavado. Un segundo anticuerpo policlonal específico de SipC, que se conjuga con biotina, se entrega a la SipC ligada al primer anticuerpo.

[0027] Después de una incubación de 30 min y el proceso de lavado el anticuerpo marcado con biotina se detecta con estreptavidina marcada con peroxidasa. A través del último paso de lavado se realiza la eliminación de la estreptavidina no ligada. A continuación, se añade TMB como sustrato para la peroxidasa y después de un tiempo definido de detiene la reacción de coloración mediante la adición de HCl. Se mide el cambio de la densidad óptica. La intensidad de la reacción de color es proporcional a la concentración de SipC en la muestra.

Ejemplo de realización 4 - determinación del SipC en materia fecal/excrementos usando el anticuerpo (no según la invención)

[0028] La SipC en la materia fecal/excrementos se determina de tal manera que primero se realiza un pre-enriquecimiento de la salmonela durante 4 hasta 8 h en agua de peptona. A continuación, se determina la SipC con un ELISA de fases sólidas que se basa en la técnica sándwich. A continuación, se disuelven anticuerpos individuales o una mezcla correspondiente de varios anticuerpos en una mezcla de tampón de carbonato/bicarbonato, pH 9,6, y se introducen en los pocillos de una placa de microtítulo. Después de la incubación a 4°C, los anticuerpos no ligados se eliminan a través del lavado con PBS. Los sitios de enlace todavía

libres del material portador se bloquean por un tampón PBS, que contiene albúmina de suero bovino y Tween 20. El bloqueo se realiza a temperatura ambiente durante 90 min. Después del lavado, las muestras fecales diluidas en PBS se introducen en pipetas. La incubación de 60 minutos a temperatura ambiente finalizó por el lavado. Como anticuerpos de detección se usan anticuerpos individuales o una mezcla correspondiente de varios anticuerpos, que fueron conjugados con biotina. Después de una incubación de 30 min y el proceso de lavado, el anticuerpo marcado con biotina se detectó con estreptavidina marcada con peroxidasa. A través del último paso de lavado se realiza la eliminación de la estreptavidina no ligada. A continuación se determina la concentración de peroxidasa con TMB como sustrato. Después de añadir HCl para terminar la reacción enzimática, se mide el cambio de la densidad óptica. La intensidad de la reacción de color es proporcional a la concentración de SipC en la muestra.

[0029] **Ejemplo de realización 5** - Determinación de la SipC en examen de materiales diferentes como:

- Cerdos y piezas del cerdo, entre otros, mamíferos / pájaros (carne, sangre, órganos)
- Muestras del ambiente (excrementos, muestras de algodón, muestras de estropajo abrasivo, muestras de botas/calzetines, polvo de establo)
- Alimentos y pienso

Usando los anticuerpos según la invención se determina de tal manera que en primer lugar tiene lugar un preenriquecimiento de *Salmonella spp.* Una cantidad definida del material de examen se incuba durante 4 - 8 h a 37° C en agua de peptona taponada u otros medios de preenriquecimiento para la inducción de la secreción. El sobrenadante se centrifuga sin más aislamiento ni enriquecimiento selectivo y la SipC obtenida se determina con un ELISA de fase sólida, que se basa en la técnica sándwich. Para ello se disuelven anticuerpos individuales o una mezcla correspondiente de varios de los anticuerpos en una mezcla de tampón de carbonato/bicarbonato, pH 9,6, u otro tampón y se introducen en los pocillos de una placa de microtítulo. Después de la incubación a 4°C, los anticuerpos no ligados se eliminan a través del lavado con PBS. Después de la incubación a 4° C se eliminan los anticuerpos no ligados a través del lavado con PBS. Los sitios de enlace todavía libres del material portador se bloquean por un tampón PBS, que contiene albúmina de suero bovino y Tween 20. El bloqueo se realiza a temperatura ambiente durante 90 min. Después del lavado, las muestras fecales diluidas en PBS se introducen en pipetas. La incubación de 60 minutos a temperatura ambiente finalizó la reacción por el lavado. Como anticuerpos de detección se usan anticuerpos individuales o una mezcla correspondiente de varios anticuerpos, que fueron conjugados con biotina. Después de una incubación de 30 min y el proceso de lavado, el anticuerpo marcado con biotina se detectó con estreptavidina marcada con peroxidasa. A través del último paso de lavado se realiza la eliminación de la estreptavidina no ligada. A continuación, se determina la concentración de peroxidasa con TMB como sustrato. Después de añadir HCl para terminar la reacción enzimática, se mide el cambio de la densidad óptica. La intensidad de la reacción de color es proporcional a la concentración de SipC en la muestra.

[0030] **Ejemplo de realización 6** - determinación de la SipC en el examen de diferentes materiales como

- Cerdos y piezas del cerdo, entre otros, mamíferos / pájaros (carne, sangre, órganos)
- Muestras del ambiente (excrementos, muestras de algodón, muestras de estropajo abrasivo, muestras de botas/calzetines, polvo de establo)
- Alimentos y pienso
- Materia fecal/excrementos

en una prueba de tira reactiva (ensayo directo)

Esquema de la prueba: véase la ilustración 1

[0031] La SipC en sobrenadantes de cultivos de *Salmonella ssp.* se determina en un test cualitativo inmunocromatográfico de tiras reactivas. El test se basa en una reacción específica de anticuerpos de antiSipC conjugados con oro con SipC libre en la muestra. El dispositivo del test consiste en una base de plástico con membrana de nitrocelulosa colocada encima (Sigma Aldrich). Los anticuerpos de antiSipC y los anticuerpos limpiados de antiespecies se inmovilizan sobre dos líneas (línea de prueba y línea de control). A los anticuerpos limpiados orientados hacia el epítipo de la proteína SipC se ligaron partículas de oro (40 nm, British Biocell Internacional, Cardiff, GB). Los anticuerpos conjugados se llevaron a un cojín de conjugación (Arista Biologicals, Allentown, PA, USA). Este cojín de conjugación se solapa con la membrana de nitrocelulosa. La muestra se aplica sobre la zona de muestras. En caso de que la muestra contenga SipC, esta se enlaza a los anticuerpos conjugados con oro. Después de la adición del tampón de muestra, circulan la muestra y los anticuerpos a través de las fuerzas capilares a lo largo de la membrana de nitrocelulosa. Los anticuerpos antiSipC resuspendidos a través de la adición del tampón circulan en dirección de la línea de prueba y línea de control. En el caso de que SipC esté atado por los anticuerpos marcados con oro y que la proteína enlace con otra determinante inmunógena en los anticuerpos inmovilizados sobre la línea de prueba, surge en este punto una línea roja. En la línea de control se hace visible una banda roja, tan pronto como los anticuerpos que circulaban con el tampón de muestras quedan ligados por los anticuerpos de antiespecies sobre la línea control. En el caso de que en la muestra no haya SipC, los anticuerpos de antiSipC marcados con oro no se inmovilizan por la proteína SipC en los anticuerpos sobre la línea

de prueba y únicamente se forma una banda roja en la línea de control. La configuración de la reacción de color se ha terminado para ambas líneas después de aproximadamente 10 - 15 minutos.

Ejemplo de realización 7 - determinación de SipC en cultivos de *Salmonella ssp.* mediante hibridación fluorescente in situ (FISH) usando sondas marcadas contra las secciones de la secuencia de ácido nucleico del SipC (no según la invención)

[0032] El método se basa en la hibridación de oligonucleótidos, que están marcados con un fluorocromo (p.ej. CY3), a su secuencia complementaria sobre la molécula de destino (DNA/RNA). Los oligonucleótidos consisten generalmente en 15-25 nucleótidos, tienen una proporción equilibrada de A/T respecto a G/C, tienen un punto de fusión entre 50° C y 70° C, no soportan en ellos zonas complementarias y soportan bases G/C en sus extremos. Las sondas de ácido nucleico se pueden ligar a ácidos nucleicos extraídos o se pueden usar para la "preparación de célula completa". Para este último método es necesario permeabilizar las células. Para las bacterias gram negativas esto generalmente ocurre a través de la fijación de las muestras con (para)-formaldehído. La hibridación de la sonda marcada con fluorocromo en la secuencia objetivo depende de la accesibilidad del ADN objetivo, las características de la sonda (longitud, temperatura de fusión, proporción A/T:C/G) y las condiciones de hibridación (tampón, temperatura, tiempo de incubación). Puesto que el ADN generalmente está presente de forma bicatenaria, este se debe separar previamente. Esto ocurre normalmente a través del desplazamiento del valor de pH o a través del aumento de la temperatura. Con la desnaturalización de calor la temperatura de fusión bajó añadiendo formaldehído. La desnaturalización se puede lograr por consiguiente ya con temperaturas de aproximadamente 70 °C. La denominada astringencia (fuerza de enlace a temperatura determinada) de la sonda a la secuencia objetivo depende de la concentración de sal, formaldehído de muestras. Mientras la temperatura de hibridación permanezca igual, la concentración ascendente de formaldehído y concentración descendente de sal conduce a una mayor astringencia. Los oligonucleótidos no ligados se eliminan por un paso de lavado de las células. De esta manera las células que no han unido específicamente la sonda, se pueden distinguir de las células objetivo. Las células que no han unido la sonda no presentan ninguna señal de fluorescencia FISH, pero se pueden marcar por el contracolor DAPI. Durante el paso de lavado la temperatura es igual a la temperatura de incubación. Únicamente la concentración de sal del tampón de lavado es más pequeña que la del tampón de hibridación. De esta manera aumenta la astringencia de las muestras atadas.

[0033] Las siguientes muestras se probaron con éxito a modo de ejemplo:

5'-GGATTGCGAAGCTGTCTGTGAAGTATTCTC-3' (SEQ ID NO 8)
 5'-CGTCGCATCGGTACC-3' (SEQ ID NO 9)
 5'-GAGATTTGTTTATTACTG-3' (SEQ ID NO 10)
 5'-GAACGTTCTGAGTAGCGGC-3' (SEQ ID NO 11)
 5'-CACGGGCTTCGTCCGATGCGGTGCTGGC-3' (SEQ ID NO 12)

En el extremo 5' las sondas están marcadas con el colorante de fluorescencia Cy3.

[0034] Después del precultivo de las muestras por examinar, estas se fijan con formaldehído (concentración final de 2 %) y las células bacterianas por consiguiente se permeabilizan. Después de una incubación de 30 minutos a 4° C, los depósitos se calientan a 75° C calentado para desnaturalizar el ADN bicatenario. Las sondas se diluyen en tampón de hibridación y se introducen en los depósitos. La hibridación se realiza a una temperatura de 45 ± 1° C. Después de 3 h de incubación los depósitos se centrifugaron a 5000 g-1 y el sedimento se recogió a continuación en una mezcla de etanol/PBS (proporción 1+1). Este paso de lavado se repite dos veces, para retirar por lavado de las células las sondas no ligadas. Las muestras resuspendidas se llevan a un portaobjetos y se secan a una temperatura de 45 ± 1° C. Después del secado el portaobjetos se deshidrata respectivamente durante 2 minutos en etanol al 50 %, 80 % y 96 % y después se seca al aire. Después del secado los portaobjetos se pueden evaluar usando un microscopio de fluorescencia.

Ejemplo de realización 8 - determinación de SipC en cultivos de *Salmonella ssp.* mediante técnicas de amplificación de ácido nucleico (PCR) usando cebadores específicos para la secuencia de ácido nucleico del SipC (no según la invención)

[0035] En general PCR es un método para multiplicar (amplificar) *in vitro* partes definidas de una cadena de ADN. PCR es uno de los métodos más seguros de detección de bacterias (y otros organismos) a nivel de ADN, pero debido a su carácter selectivo precisa de información segura respecto a tipo y clase de bacterias. La elección del iniciador debe configurarse de tal manera que se amplifique un fragmento de ADN que sea específico para el tipo de organismo por identificar. Para la detección de salmonelas se eligieron parejas de cebadores que son respectivamente complementarias a una cadena de la secuencia de ADN de la proteína SipC. Los siguientes pares de cebadores se probaron con éxito a modo de ejemplo:

[0036]

ES 2 700 507 T3

| Dirección | 5'-Pos | Secuencia de cebador (5'->3') | Longitud de producto (bp) |
|-------------|--------|--|---------------------------|
| Sentido | 25 | ATCCCGCCGCTTATTTAAATAATCATTCTG (SEQ ID NO 13) | 1186 |
| antisentido | 1210 | CGATAGCAGCGAGTGCGG (SEQ ID NO 14) | |
| Sentido | 25 | ATCCCGCCGCTTATTTAAATAATCATTCTG (SEQ ID NO 15) | 1176 |
| antisentido | 1200 | GAGTGCGGATGCTTTTCTGACTGG (SEQ ID NO 16) | |
| Sentido | 62 | TAGTTCACAGACAGCTTCGCA (SEQ ID NO 17) | 1117 |
| Antisentido | 1178 | TTAATGCTCTCCATTGTTTTTTCAGCATTTC (SEQ ID NO 18) | |
| Sentido | 68 | ACAGACAGCTTCGCAATCCGTTAG (SEQ ID NO 19) | 1108 |
| Antisentido | 1175 | ATGCTCTCCATTGTTTTTTCAGCATTTCCTG (SEQ ID NO 20) | |
| Sentido | 68 | ACAGACAGCTTCGCAATCCGTTAG (SEQ ID NO 21) | 1152 |
| Antisentido | 1219 | TATTGCCTGCGATAGCAGCGAG (SEQ ID NO 22) | |

5 [0037] La invención pone a disposición un método según la reivindicación 1, que permite una detección rápida de infecciones por salmonela. Mientras que los métodos conocidos necesitan 3-5 días para una declaración segura, el método según la invención ya conduce según la reivindicación 1 a un resultado después de aprox. 10 horas.

[0038] Otra ventaja reside en la utilidad universal, todas las serovariedades importantes se detectan de modo fiable.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método diagnóstico para la identificación de una contaminación/infección por salmonela en excrementos de pacientes/animales, cadáveres, huevos y alimentos/piensos a través de la detección de la proteína SipC secretada por las salmonelas, **caracterizado por el hecho de que** la determinación de SipC se realiza a través del uso de anticuerpos monoclonales, que se dirigen contra las siguientes secuencias peptídicas de SipC:
- 10 • NH₂-V-A-S-T-A-S-D-E-A-R-E-S-S-R-K-S-COOH (SEQ ID NO 1)
• NH₂-N-N-H-S-V-E-N-S-S-Q-T-A-S-Q-S-V-COOH (SEQ ID NO 2),
• NH₂-G-Q-Y-A-A-T-Q-E-R-S-E-Q-Q-I-S-COOH (SEQ ID NO 3),
• NH₂-L-G-I-K-D-S-N-K-Q-I-S-P-E-H-COOH (SEQ ID NO 4)
- 15 2. Método diagnóstico según la reivindicación 1, **caracterizado por el hecho de que** los anticuerpos se usan individualmente o en una combinación de sistemas de detección inmunoquímicos.
3. Método diagnóstico según la reivindicación 1 - 2, **caracterizado por el hecho de que** dos anticuerpos diferentes se utilizan como ELISA de sándwich.

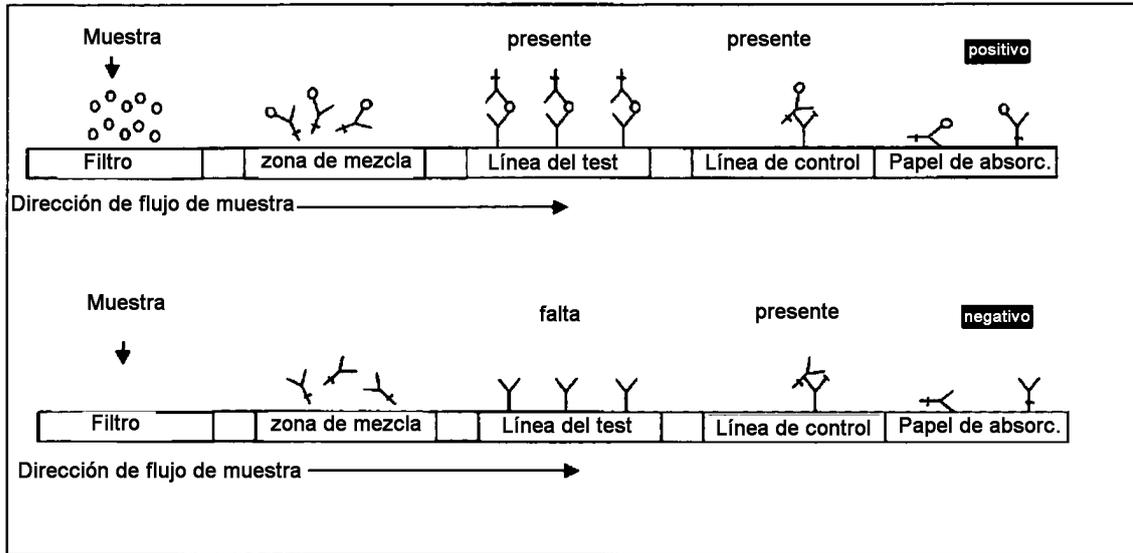


Figura 1: Principio de funcionamiento del test de tiras para la detección de SipC en sobrenadantes de cultivo de *Salmonella ssp.* (ensayo directo)