



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 268 913**

② Número de solicitud: 200301407

⑤ Int. Cl.:
C12Q 1/10 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **11.03.2002**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2007**

Fecha de la concesión: **30.01.2008**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.03.2008**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.03.2008

⑰ Número de la solicitud inicial: **200200600**

⑲ Titular/es: **Universidad de Sevilla
Pabellón de Brasil
Paseo de las Delicias, s/n
41012 Sevilla, ES**

⑳ Inventor/es: **Palomares Folia, José Carlos;
Torres Sánchez, María José;
Palomares Quesada, María Concepción;
Torres Rueda, Antonio;
Santos Rosa, Francisco y
Aznar Martín, Javier**

㉑ Agente: **No consta**

㉒ Título: **Método para la detección e identificación rápida de *Lactobacillus plantarum* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.**

㉓ Resumen:

Método para la detección e identificación rápida de *Lactobacillus plantarum* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

El método comprende (i) preparar un conjunto de tubos conteniendo cada tubo una mezcla de reacción específica para la bacteria a detectar (*L. plantarum*), (ii) programar un aparato para el control simultáneo de múltiples amplificaciones de ácido nucleico e comprende un termociclador, una fuente de luz y un sensor para obtener un conjunto de señales, (iii) interpretar las señales obtenidas, y (iv) determinar simultáneamente la presencia o ausencia de dicha bacteria en las muestras ensayadas, mediante el empleo de oligonucleótidos (iniciadores y sondas marcadas) específicos para dicha bacteria. De interés especial en la industria agro-alimentaria y de distribución de alimentos, para la detección de bacterias que deterioran alimentos tales como *Lactobacillus plantarum*.

ES 2 268 913 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Método para la detección e identificación rápida de *Lactobacillus plantarum* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

Campo de la invención

La invención se relaciona, en general, con la detección e identificación de bacterias que deterioran alimentos, tales como *Lactobacillus plantarum*, mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

Antecedentes de la invención

La detección de bacterias que deterioran alimentos, tales como *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) tiene mucho interés en la industria agroalimentaria, tanto la productora como la distribuidora de productos alimenticios (materias primas y/o productos elaborados), por lo que se han descrito diversos métodos para su detección e identificación.

El Código Alimentario Español establece una normativa en la que, para cada alimento, se especifican los microorganismos cuya presencia debe ser detectada, así como las técnicas recomendadas para estos análisis. En general, estas técnicas utilizan metodologías convencionales basadas en el cultivo del microorganismo, que requieren el pre-enriquecimiento en caldo durante 24-48 horas, el sub-cultivo en medios selectivos durante otras 24-48 horas, y, finalmente, realizar una identificación bioquímica y de serotipación, lo que requiere otras 24-48 horas; es decir, en total deben transcurrir entre 72 y 96 horas antes de obtener un resultado. Por otra parte, dicha metodología basada en el cultivo del microorganismo no es totalmente fiable ya que muchos microorganismos son difíciles de cultivar y, más aún, de cuantificar, y, por el tiempo que emplea, requiere largos períodos de almacenamiento de las materias primas y de los productos elaborados, con su correspondiente impacto en los costes y posible disminución de competitividad tanto a nivel nacional como internacional. Lo mismo ocurre con las empresas de distribución, en especial con las grandes superficies, que deben almacenar grandes cantidades de productos, algunos de ellos perecederos, así como con las empresas de hostelería que, en numerosas ocasiones, se ven perjudicadas por el retraso en el control de los alimentos que sirven. Por estos motivos, existe la necesidad de aumentar la sensibilidad y al mismo tiempo la fiabilidad y rapidez en la detección de los microorganismos que pueden llegar a deteriorar los alimentos, en particular, los alimentos procesados.

En algunos casos será necesario sólo aumentar la sensibilidad del método para detectar de forma fiable y rápida la presencia o ausencia del microorganismo, mientras que, en otros casos será necesario, además, cuantificar los microorganismos eventualmente presentes con el fin de establecer los límites de concentración a partir de los cuales la presencia del microorganismo puede representar un problema para la estabilidad del producto alimenticio.

En comparación con los métodos de cultivo de microorganismos tradicionales, las técnicas moleculares, especialmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [Saiki, R.K., *et al.*, 1988. *Science* 239: 487-491] se están revelando como un método fácil, sensible y ventajoso en su relación costo-beneficio para detectar la presencia de microorganismos. Estos métodos están desplazando rápidamente a los métodos convencionales en el diagnóstico de múltiples enfermedades, aunque en el área alimenticia están desarrollando sus primeros avances con un valor únicamente cualitativo.

Existe la necesidad de disponer de un método rápido, que proporcione resultados en menos de 24 horas, preciso y fiable, que permita la detección cualitativa y, si se desea, cuantitativa, de microorganismos contaminantes eventualmente presentes en una muestra de ensayo, y que permita detectar e identificar individual o simultáneamente uno o más de dichos microorganismos.

Este objetivo puede obtenerse mediante el empleo de una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR en tiempo real), que comprende amplificar el número de copias de un fragmento del genoma de un microorganismo y la detección del producto obtenido en cada paso de la reacción, empleando para ello un aparato termociclador rápido con detección a tiempo real que incorpora una conexión a un ordenador en el que se encuentra el software necesario para el control de todos los procesos paso a paso. Se trata de una técnica reciente cuya principal característica reside en que la amplificación y el análisis ocurren en el mismo tubo de reacción y se obtiene información durante todo el tiempo en que transcurre la técnica sin necesidad de tener que utilizar isótopos o geles de electroforesis, lo que permite reducir el tiempo de detección de ácidos nucleicos de 5 horas a 20 minutos.

Compendio de la invención

La invención se enfrenta, en general, con el problema de desarrollar un método rápido, preciso y fiable, que permita detectar e identificar, bacterias causantes del deterioro de alimentos, tales como *L. plantarum*, basado en el empleo de técnicas moleculares.

La solución proporcionada por esta invención se basa en el diseño y desarrollo de una serie de reactivos (oligonucleótidos iniciadores y sondas específicos) que, en determinadas condiciones de reacción, permiten amplificar un fragmento del genoma específico de *L. plantarum*, y detectar la presencia o ausencia de dicha bacteria en una muestra de ensayo mediante PCR en tiempo real.

Brevemente, el método proporcionado por esta invención para detectar e identificar *L. plantarum* en una muestra de ensayo, mediante PCR en tiempo real, comprende la extracción del ADN eventualmente presente en dicha muestra de ensayo, la amplificación de una secuencia definida de ese ADN mediante PCR y la detección continua de los productos amplificados. Para realizar dicha amplificación y detección es necesario utilizar una serie de reactivos y oligonucleótidos (iniciadores y sondas) específicos. Por tanto, para amplificar y detectar dicho microorganismo se ha diseñado, por una parte, una pareja de iniciadores que permiten amplificar una secuencia de nucleótidos diana presente en el genoma bacteriano que se desea poner de manifiesto, y, por otra parte, una pareja de sondas que permiten identificar con certeza dicha secuencia diana, siendo dichas sondas complementarias a una región presente en los productos de amplificación y estando marcadas, una de ellas, con un fluoróforo y la otra con un colorante que captura la energía liberada por el fluoróforo y la emite a su vez en otra longitud de onda detectable por el sistema. El termociclador rápido con detección a tiempo real, en cada paso de la reacción realiza la duplicación del fragmento de ADN mediante los iniciadores y una polimerasa termorresistente y a cada uno de los dos fragmentos resultantes se unen las sondas. Estas sondas adheridas al fragmento de ADN emitirán energía a una determinada longitud de onda al ser excitadas. Este proceso (unión de los iniciadores, duplicación del fragmento de ADN, unión de las sondas, detección energía emitida) se repite un número determinado de veces, típicamente unas 30 veces, obteniéndose al final gran cantidad del producto amplificado. Con todas las medidas realizadas, se realiza un análisis estadístico que determina el tipo de ADN amplificado, por ejemplo, mediante análisis de la Temperatura de Hibridación (T_m) y, si se desea, la concentración del mismo.

Para la puesta en práctica del método proporcionado por esta invención, se requiere un termociclador rápido a tiempo real, el cual, en una realización particular, está unido a un sistema de detección por fluorescencia, lo que permite la monitorización en tiempo real del proceso de amplificación tras cada ciclo. Además, el análisis del producto final de PCR se realiza una vez terminado el proceso de amplificación sin necesidad de ninguna manipulación. Su integración junto con un ordenador permite diseñar los programas de amplificación, detección y análisis de los productos.

Un método como el proporcionado por esta invención presenta la ventaja de que permite la detección e identificación rápida, típicamente en menos de 24 horas, precisa y fiable, de *L. plantarum*, en una muestra de ensayo, así como la cuantificación de los microorganismos eventualmente presentes en dicha muestra de ensayo

Un objeto de esta invención lo constituye un método para la detección e identificación de *L. plantarum*, mediante PCR en tiempo real. Los oligonucleótidos (iniciadores y sondas marcadas) utilizados en la realización de dicho método, así como los kits que los contienen constituyen objetos adicionales de esta invención.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un método para la detección e identificación rápida de *L. plantarum*, en una o más muestras de ensayo, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, en adelante método de la invención, que comprende:

- a) extraer el ADN presente en dicha muestra o muestras de ensayo;
- b) preparar un conjunto de tubos conteniendo cada tubo una mezcla de reacción específica para dicha bacteria a detectar e identificar, comprendiendo cada mezcla de reacción los reactivos necesarios para la amplificación enzimática de ADN e identificación de la bacteria a detectar e identificar;
- c) programar un aparato para el control simultáneo de múltiples amplificaciones de ácido nucleico que comprende (i) un termociclador que incluye un elemento que contiene una pluralidad de orificios en los que se introducen dichos tubos que contienen la mezcla de reacción para la amplificación enzimática de ADN e identificación de la bacteria a detectar e identificar, (ii) una fuente de luz ópticamente acoplada a dicho termociclador y adaptada para distribuir luz sobre dicha pluralidad de orificios, y (iii) un sensor adaptado para detectar simultáneamente la luz emitida desde dicha pluralidad de orificios, con el fin de obtener un conjunto de señales;
- d) interpretar dichas señales; y
- e) determinar simultáneamente la presencia o ausencia de dicha bacteria en dicha muestra o muestras ensayadas;

caracterizado porque

- i) la mezcla de reacción para la amplificación enzimática de ADN e identificación específica de *L. plantarum* comprende un par de iniciadores identificados como SEQ. ID. N°: 1 y SEQ. ID. N°: 2, una sonda identificada como SEQ. ID. N°: 3 unida a un fluoróforo y una sonda identificada como SEQ. ID. N°: 4 unida a un colorante que captura la energía emitida por la activación del fluoróforo y la emite a una longitud de onda diferente; y
- ii) la presencia o ausencia de dicha bacteria en dicha muestra o muestras ensayadas se determina por la aparición de una curva de fusión específica de cada producto amplificado, obteniéndose dicha curva de fusión

ES 2 268 913 B1

por hibridación de las sondas específicas para la identificación de dicha bacteria con el producto de amplificación obtenido en cada tubo, y, si se desea, determinar la temperatura de fusión característica de cada producto amplificado.

5 El método proporcionado por esta invención permite detectar, identificar y, si se desea, cuantificar, bacterias causantes del deterioro de alimentos, tales como *L. plantarum*, en una o más muestras de ensayo, mediante PCR en tiempo real. La muestra de ensayo puede ser cualquier muestra que contiene ADN en la que se desea conocer la posible contaminación por dicha bacteria. En una realización particular, dicha muestra de ensayo es una muestra de un producto alimenticio, por ejemplo, una muestra de una materia prima utilizada en la producción de alimentos o una muestra de un producto alimenticio procesado.

10 Antes de poner en contacto el ADN de las bacterias eventualmente presentes en dicha muestra o muestras de ensayo a analizar con la mezcla de reacción para la amplificación enzimática de ADN, se procede a extraer la totalidad o parte del ADN presente en las muestras de ensayo. La extracción del ADN se puede realizar mediante métodos convencionales, incluyendo aquéllos que no precisan una purificación del ADN extraído. En una realización particular, la extracción del ADN se realizó utilizando la resina Chelex 100 (véase el Ejemplo que acompaña a esta descripción).

15 Para la puesta en práctica del método de la invención se prepara un conjunto de tubos, en el que cada tubo contiene una mezcla de reacción específica para la bacteria a detectar e identificar (*L. plantarum*), comprendiendo cada mezcla de reacción los reactivos necesarios para la amplificación enzimática de ADN e identificación de la bacteria a detectar e identificar. En general, dicha mezcla de reacción contiene los reactivos necesarios para la realización del método de la invención, por ejemplo, agua calidad PCR, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), un tampón adecuado para la reacción de amplificación enzimática, una ADN polimerasa termoestable, una sal magnésica, etc., junto con un par de iniciadores y un par de sondas marcadas específicos para la bacteria a ensayar.

20 Los iniciadores utilizados en el método de la invención permiten amplificar una secuencia de nucleótidos diana o fragmento específico del genoma bacteriano que se desea poner de manifiesto. En general, puede amplificarse cualquier fragmento del genoma bacteriano que permita la identificación de una bacteria, a nivel de género o especie, correspondiente. La pareja de sondas marcadas permite identificar con certeza dicho fragmento específico del genoma bacteriano a detectar y comprenden una secuencia de nucleótidos complementaria a una región presente en los productos de amplificación y un marcador. En una realización particular, una de dichas sondas está marcada con un fluoróforo que actúa como donador de energía y la otra sonda con un colorante que captura la energía liberada por el fluoróforo y la emite a su vez en otra longitud de onda detectable por el sistema presente en el aparato para la puesta en práctica del método de la invención.

25 En una realización particular, la mezcla de reacción para la amplificación enzimática de ADN e identificación específica de *L. plantarum* comprende un par de iniciadores identificados como SEQ. ID. N°: 1 y SEQ. ID. N°: 2, una sonda identificada como SEQ. ID. N°: 3 unida a un fluoróforo y una sonda identificada como SEQ. ID. N°: 4 unida a un colorante que captura la energía emitida por la activación del fluoróforo y la emite a una longitud de onda diferente. Dicho par de iniciadores SEQ. ID. N°: 1 y SEQ. ID. N°: 2 permite la amplificación de un fragmento de 281 pb del ARN ribosómico (ARNr) de *L. plantarum* (región espaciadora entre los genes de los ARNr 16S y 23S).

30 Como fluoróforo puede utilizarse cualquier grupo o sustancia fluorescente capaz de donar energía tras ser activado, y como colorante puede utilizarse cualquier compuesto capaz de capturar la energía emitida por la activación del fluoróforo y emitirla a una longitud de onda diferente. En una realización particular, dicho fluoróforo es fluoresceína y dicho colorante que captura la energía emitida por la activación del fluoróforo y la emite a una longitud de onda diferente es el colorante Red640.

35 Ejemplos adicionales de fluoróforos y colorantes que pueden utilizarse para la puesta en práctica del método de la invención se recogen en la Tabla 1.

40 TABLA 1
Fluoróforos y Colorantes

55		Marcador
60	Fluoróforo	Fluoresceína SybrGreen TAMRA
65	Colorante	LC Red 640 LC Red 705 Fluoresceína Cy5

ES 2 268 913 B1

El método de la invención se realiza en un aparato para el control simultáneo de múltiples amplificaciones de ácido nucleico que comprende (i) un termociclador que incluye un elemento que contiene una pluralidad de orificios en los que se introducen dichos tubos que contienen la mezcla de reacción para la amplificación enzimática de ADN e identificación de la bacteria a detectar e identificar, (ii) una fuente de luz ópticamente acoplada a dicho termociclador y adaptada para distribuir luz sobre dicha pluralidad de orificios, tal como una fuente de radiación láser; y (iii) un sensor adaptado para detectar simultáneamente la luz emitida desde dicha pluralidad de orificios, con el fin de obtener un conjunto de señales, tal como un detector de fluorescencia. Dichos aparatos son conocidos [véase, por ejemplo, la solicitud de patente europea EP 640 828 A].

El termociclador rápido con detección a tiempo real, en cada paso de la reacción realiza la duplicación de un fragmento de ADN (secuencia diana presente en el genoma bacteriano que se desea detectar) mediante el empleo de los iniciadores correspondientes y de una polimerasa termorresistente y, a cada uno de los dos fragmentos resultantes, se unen las sondas marcadas. Estas sondas adheridas al fragmento de ADN emitirán energía a una determinada longitud de onda al ser excitadas. Este proceso (unión de los iniciadores, duplicación del fragmento de ADN, unión de las sondas, detección energía emitida) se repite un número determinado de veces, típicamente unas 30 veces, obteniéndose al final gran cantidad del producto amplificado. Con todas las medidas realizadas, se realiza un análisis estadístico que determina el tipo de ADN amplificado, por ejemplo, mediante análisis de la Temperatura de Hibridación (T_m) y, si se desea, se determina la concentración del mismo.

En una realización particular, el aparato utilizado para la puesta en práctica del método de la invención comprende un termociclador rápido a tiempo real unido a un sistema de detección por fluorescencia, lo que permite la monitorización en tiempo real del proceso de amplificación tras cada ciclo, tal como el termociclador LightCycler (Roche Biochemicals) [véase el Ejemplo que acompaña a esta descripción]. En este caso, el análisis del producto final de PCR se realiza una vez terminado el proceso de amplificación sin necesidad de ninguna manipulación. Su integración junto con un ordenador permite diseñar los programas de amplificación, detección y análisis de los productos.

Tras interpretar las señales obtenidas se puede determinar simultáneamente la presencia o ausencia de *L. plantarum*. En una realización particular, la presencia o ausencia de dicha bacteria en dicha muestra o muestras ensayadas se determina por la aparición de una curva de fusión específica de cada producto amplificado, obteniéndose dicha curva de fusión por hibridación de las sondas específicas para la identificación de dicha bacteria con el producto de amplificación obtenido en cada tubo. Adicionalmente, si se desea, se puede determinar la temperatura de fusión característica de cada producto amplificado así como la concentración del mismo.

El método de la invención permite detectar, identificar y, si se desea, cuantificar, bacterias que deterioran alimentos, tales como *L. plantarum*, en muestras de ensayo, mediante PCR en tiempo real. Por tanto, dicho método se puede aplicar al análisis microbiológico de todos los alimentos susceptibles de ser deteriorados por dichas bacterias, permitiendo su detección en pocas horas, generalmente en menos de 24 horas, colaborando de este modo en garantizar la estabilidad del producto alimenticio y acortando el tiempo de almacenamiento previo a la comercialización del mismo.

En una realización particular, el método de la invención se utiliza en la detección rápida (cualitativa y cuantitativa) en alimentos del genoma de bacterias que causan deterioro en alimentos (*L. plantarum*). Los alimentos que pueden ser analizados pueden ser tanto materias primas, por ejemplo, leche, huevos, carnes, verduras, etc., como sus derivados, alimentos procesados o no, aceites, salsas, etc., tanto en las empresas productoras como en las distribuidoras y hostelería.

Un método para la detección e identificación de bacterias que deterioran alimentos como el proporcionado por esta invención presenta, entre otras, las siguientes ventajas:

- a) requiere un tiempo sustancialmente inferior a los métodos habitualmente utilizados, típicamente 24 horas en comparación con los métodos convencionales que requieren entre 72 y 96 horas;
- b) una vez realizado el pre-enriquecimiento y la extracción del ADN, todo el proceso se lleva a cabo en el mismo tubo, evitando manipulaciones y contaminaciones externas;
- c) es un método cuantitativo, que no sólo detecta e identifica las bacterias eventualmente presentes en una muestra de ensayo sino que permite, además, si se desea, determinar la concentración de dichas bacterias presentes en la muestra de ensayo;
- d) es posible su automatización completa; y
- e) permite realizar la detección de varias bacterias simultáneamente.

La invención también proporciona un oligonucleótido para la detección e identificación de bacterias causantes de deterioro en alimentos, tales como *L. plantarum*, en adelante oligonucleótido de la invención, que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo formado por las secuencias identificadas como SEQ. ID. N°: 1, SEQ. ID. N°: 2, SEQ. ID. N°: 3 y SEQ. ID. N°: 4.

Asimismo, la invención proporciona una sonda marcada, en adelante sonda marcada de la invención, que compren-

ES 2 268 913 B1

de (i) un oligonucleótido, seleccionado del grupo formado por los oligonucleótidos identificados como SEQ. ID. N°: 3 y SEQ. ID. N°: 4, y (ii) un marcador, tal como un fluoróforo, por ejemplo, fluoresceína, o un colorante capaz de capturar la energía emitida por la activación del fluoróforo y emitirla a una longitud de onda diferente, por ejemplo, el colorante Red640. En una realización particular, dicha sonda marcada de la invención se selecciona del grupo formado por:

el oligonucleótido identificado como SEQ. ID. N°: 3 unido a fluoresceína,

el oligonucleótido identificado como SEQ. ID. N°: 4 unido al colorante Red640, y sus mezclas.

La invención también proporciona un kit para la detección e identificación rápida de *L. plantarum*, en una o más muestras de ensayo, mediante PCR en tiempo real, que comprende, al menos, un oligonucleótido de la invención o una sonda marcada de la invención. En una realización particular, dicho kit comprende los oligonucleótidos identificados como SEQ. ID. N°: 1 y SEQ. ID. N°: 2, y las sondas marcadas compuestas por el oligonucleótido SEQ. ID. N°: 3 unido a fluoresceína y el oligonucleótido SEQ. ID. N°: 4 unido al colorante Red640.

En general, los kits de la invención contienen la pareja de iniciadores correspondientes a la bacteria a detectar (*L. plantarum*) en un tubo individualizado, al igual que la pareja de sondas marcadas para dicha bacteria, con el fin de poder elegir entre realizar la detección de una sola bacteria (usando solo el tubo de sus iniciadores y el de sus sondas marcadas), o bien para la detección simultánea de dicha bacteria y otra bacteria que deteriora alimentos, por ejemplo, *Bacillus cereus*, dependiendo de las necesidades.

Los kits proporcionados por esta invención pueden presentarse en forma de estuche conteniendo, además de unos recipientes con uno o más de dichos oligonucleótidos y/o sondas marcadas mencionados previamente, unos recipientes con la totalidad o parte del resto de reactivos necesarios para la realización del método en cuestión, por ejemplo, agua ultrapura, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), un tampón adecuado para la reacción de amplificación enzimática, una ADN polimerasa termoestable (por ejemplo, ADN polimerasa Taq), una sal magnésica (por ejemplo, cloruro magnésico), etc. Adicional y opcionalmente, los kits proporcionados por esta invención pueden incluir unos recipientes con ADN de *L. plantarum*, para su empleo como controles positivos.

El siguiente ejemplo ilustra la invención y no debe ser considerado como limitativo del alcance de la misma.

Ejemplo 1

Detección e identificación de L. plantarum en un producto alimenticio mediante PCR en tiempo real

1. Materiales y Métodos

El equipo diagnóstico diseñado para la detección de *L. plantarum* en productos alimenticios consiste en varios tubos conteniendo cada uno de ellos los iniciadores, sondas marcadas, ADN polimerasa termoestable, solución de MgCl₂ y agua bidestilada estéril, necesarios para llevar a cabo el método de amplificación diseñado para dicho equipo. En este caso concreto, el equipo utilizado incluye todos los componentes básicos para la realización de la amplificación de hasta 100 muestras y controles. El ADN control provisto está compuesto por una mezcla del ADN extraído de cepas de laboratorio de todas las bacterias a detectar.

La pareja de iniciadores correspondientes a la bacteria a detectar se presenta en un tubo individualizado, al igual que la pareja de sondas marcadas para dicha bacteria.

Para la realización del método se ha utilizado una microcentrifuga, un termociclador LightCycler (Roche Biochemicals), unas micropipetas y unas puntas de micropipetas con filtro.

La planificación del método se recoge en la Tabla 2. Aunque el tiempo de manipulación se ha calculado para una sola muestra, se pueden manipular varias muestras simultáneamente sin apenas incrementar los tiempos.

TABLA 2

Planificación del método

Paso	Manipulación (min)	Tiempo (min)
Preparación mezcla de reactivos y tubos de la reacción. Colocación en el termociclador	5	10
Reacción PCR	20-40	30-50
Análisis de datos	0-5	5-10
Tiempo total del ensayo		45-60

ES 2 268 913 B1

El método puede realizarse siguiendo el protocolo estándar que se describe a continuación:

1. Toma de muestra (25 g del producto) y preparación mediante pre-enriquecimiento en agua de peptona tamponada durante 20-24 horas a 37°C.
2. Extracción del ADN mediante su extracción con un método fiable, por ejemplo, usando la resina Chelex 100.
3. Amplificación y detección: Se prepara un capilar conteniendo los componentes necesarios para la reacción, ADN polimerasa termoestable, los cuatro dNTPs, MgCl₂, ADN extraído de la muestra, iniciadores y sondas marcadas específicos para la bacteria que se desea detectar. Adicionalmente, se prepara un tubo con el ADN control y los iniciadores y sondas de la(s) bacteria(s) a detectar.
4. Colocar los capilares preparados en el termociclador a tiempo real y programar la realización del proceso de amplificación y detección: temperatura, tiempo, número de ciclos y momento de lectura según el esquema.
5. Iniciar el programa (véase la Tabla 3).

TABLA 3

Programa

Parámetros	Valores		
Ciclos	45		
Tipo	Cuantificación		
	Segmento 1	Segmento 2	Segmento 3
Temperatura (°C)	95	55	72
Tiempo incubación (s)	0	1-10	10-20
Velocidad cambio Temperatura (°C/s)	20	20	20
Modo lectura	Ninguno	Individual	Ninguno
Valores de lectura	F1 = 1; F2 = 10; F3 = 10		

6. Al finalizar el programa, se analizan los resultados comenzando por el control positivo, continuando el análisis en caso de que éste fuera correcto. En caso contrario, se descarta el ensayo.
7. La presencia o ausencia de una bacteria se determina por la aparición de una curva de fusión específica entre las sondas y el amplicón de la bacteria buscada. En el capilar correspondiente a dicha bacteria, las sondas marcadas específicas se unirán sólo con el amplicón derivado de la bacteria buscada si ésta se encuentra presente y la curva de fusión que se produce al final del protocolo, tendrá una T_m concreta y única para ese mismo microorganismo. En las condiciones ensayadas, utilizando las parejas de iniciadores identificados como SEQ. ID. N°: 1 y SEQ. ID. N°: 2 para la detección de *L. plantarum*, y las parejas de sondas marcadas compuestas por el oligonucleótido con la SEQ. ID. N°: 3 unido a fluoresceína y el oligonucleótido con la SEQ. ID. N°: 4 unido al colorante Red640, para la detección de *L. plantarum*, las T_m correspondientes se recogen en la Tabla 4.

TABLA 4

T_m del amplicón y de las sondas

Microorganismo	Iniciadores	T _m amplicón ± SD (°C)	T _m sondas ± SD (°C)
<i>L. plantarum</i>	SEQ. ID. N°: 1/ SEQ. ID. N°: 2	84,88±0,2	71,10±0,3

ES 2 268 913 B1

2. Aplicación del método a la detección de *Lactobacillus plantarum* en salsa de mayonesa

Se realizó este ensayo para ilustrar la eficacia del método de la invención en el análisis de un alimento para poner de manifiesto una posible contaminación. Concretamente, se describe el ensayo de una muestra de salsa de mayonesa en la que se pretende detectar una posible contaminación con *L. plantarum*.

Se recogen 25 g de la muestra de salsa de mayonesa y se disgregan en un estomacher introducidos en bolsa estéril con 225 ml de agua de peptona tamponada (pH 7,2) o medio M.R.S. (pH 7,0) y se incuba a 37°C en agitación durante 20 horas. Transcurridas 20 horas de incubación, para extraer el ADN eventualmente presente en la muestra de ensayo, se extrae una alícuota de 300 µl con una resina Chelex 100, para lo cual, se añaden 300 µl de una suspensión al 10% en agua de Chelex 100, se agita vigorosamente, se incuba durante 45 minutos a 45°C con agitación periódica de los tubos para evitar la precipitación de la resina, se calienta a 95°C durante 5 minutos y se centrifuga durante 5 minutos a 13.000 x g, retirándose el sobrenadante que se utiliza en el siguiente paso (Amplificación y detección).

El ADN extraído tal como se ha indicado previamente se utilizará directamente para la amplificación y detección, lo que se realiza en un tubo capilar cerrado con un volumen total de 20 µl. Para ello, en cada capilar se añaden los componentes apropiados de la mezcla de amplificación en las cantidades indicadas en la Tabla 5.

TABLA 5

Mezcla de amplificación y detección

	Volumen (µl)	Concentración final
Light Cycler-DNA Master	2	1X
Solución de MgCl ₂	2,4	4 mM
Iniciadores (10 µM de cada uno) (a)	1 + 1	0,5 µM
Sondas de hibridación (2 µM) (b)	1 + 1	0,1 µM
H ₂ O (PCR)	9,6	-
ADN extraído	2	-
Volumen total	20	-

(a): SEQ. ID. N°: 1 y SEQ. ID. N°: 2

(b): SEQ. ID. N°: 3 unido a fluoresceína y SEQ. ID. N°: 4 unido a Red640

Una vez que se añadieron todos los componentes, se mezclaron mediante un pulso en una microcentrífuga. A continuación, los capilares se colocaron en el carrusel del termociclador LightCycler (Roche Biochemicals) y fueron sometidos al proceso de amplificación y detección, lo que requiere unos 30 minutos aproximadamente. Las condiciones para la PCR son las siguientes:

Desnaturalización durante 10 segundos a 98°C

Protocolo de Amplificación:

Parámetros	Valores		
	Segmento 1	Segmento 2	Segmento 3
Ciclos	45		
Tipo	Cuantificación		
Temperatura (°C)	95	55	72
Tiempo de incubación (s)	0	5	10
Velocidad cambio T ^a (°C/s)	20	20	20
Modo de lectura	Ninguno	Individual	Ninguno
Valores de lectura	F1=1 F2=10 F3= 10		

ES 2 268 913 B1

Tras la amplificación se aplicó un programa para calcular la T_m, incrementando lentamente la temperatura (0,1°C/s) y midiendo la fluorescencia de forma continua. Las condiciones fueron las siguientes:

5	Parámetros	Valores		
	Ciclos	1		
	Tipo	Fusión (melting)		
10		Segmento 1	Segmento 2	Segmento 3
	Temperatura (°C)	95	50	95
	Tiempo de incubación (s)	10	10	0
	Velocidad cambio T ^a (°C/s)	20	20	0,1
15	Modo de lectura	Ninguno	Ninguno	Continuo
	Valores de lectura	F1=1 F2=10 F3= 10		
	Finalmente se enfrió a 40°C			

20 Para interpretar los resultados, el software del sistema analiza automáticamente los datos obtenidos, ofreciendo los resultados en forma de curva de integración, permitiendo de este modo obtener la Temperatura de Fusión (T_m) característica de cada producto amplificado. En este caso, para la detección de *L. plantarum* en las condiciones ensayadas, la T_m sondas es de 71,1°C.

25 3. Sensibilidad y especificidad

Los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos en el termociclador LightCycler utilizando las parejas de iniciadores seleccionadas para dicha bacteria (*L. plantarum*) se recogen en la Tabla 6.

30 TABLA 6
Sensibilidad y especificidad de las parejas de iniciadores

Microorganismo	Iniciadores	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
<i>L. plantarum</i>	SEQ. ID. N°: 1/ SEQ. ID. N°: 2	100	99,1

40 Asimismo, los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos en el termociclador LightCycler utilizando las parejas de sondas marcadas seleccionadas para cada bacteria se recogen en la Tabla 7.

45 TABLA 7
Sensibilidad y especificidad de las parejas de sondas marcadas

Microorganismo	Sondas	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
<i>L. plantarum</i>	SEQ. ID. N°: 3/ SEQ. ID. N°: 4	100	99,1

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección e identificación rápida de *Lactobacillus plantarum*, en una o más muestras de ensayo, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, que comprende:
- a) extraer el ADN presente en dicha muestra o muestras de ensayo;
 - b) preparar un conjunto de tubos conteniendo cada tubo una mezcla de reacción específica para dicha bacteria a detectar e identificar, comprendiendo cada mezcla de reacción los reactivos necesarios para la amplificación enzimática de ADN e identificación de la bacteria a detectar e identificar;
 - c) programar un aparato para el control simultáneo de múltiples amplificaciones de ácido nucleico que comprende (i) un termociclador que incluye un elemento que contiene una pluralidad de orificios en los que se introducen dichos tubos que contienen la mezcla de reacción para la amplificación enzimática de ADN e identificación de la bacteria a detectar e identificar, (ii) una fuente de luz ópticamente acoplada a dicho termociclador y adaptada para distribuir luz sobre dicha pluralidad de orificios, y (iii) un sensor adaptado para detectar simultáneamente la luz emitida desde dicha pluralidad de orificios, con el fin de obtener un conjunto de señales;
 - d) interpretar dichas señales; y
 - e) determinar simultáneamente la presencia o ausencia de dicha bacteria en dicha muestra o muestras ensayadas;
- caracterizado porque
- i) la mezcla de reacción para la amplificación enzimática de ADN e identificación específica de *Lactobacillus plantarum* comprende un par de iniciadores identificados como SEQ. ID. N°: 1 y SEQ. ID. N°: 2, una sonda identificada como SEQ. ID. N°: 3 unida a un fluoróforo y una sonda identificada como SEQ. ID. N°: 4 unida a un colorante que captura la energía emitida por la activación del fluoróforo y la emite a una longitud de onda diferente; y
 - ii) la presencia o ausencia de dicha bacteria en dicha muestra o muestras ensayadas se determina por la aparición de una curva de fusión específica de cada producto amplificado, obteniéndose dicha curva de fusión por hibridación de las sondas específicas para la identificación de dicha bacteria con el producto de amplificación obtenido en cada tubo, y, si se desea, determinar la temperatura de fusión característica de cada producto amplificado.
2. Método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra o muestras de ensayo es una muestra de una materia prima utilizada en la producción de alimentos o un producto alimenticio procesado.
3. Método según la reivindicación 1, en el que dicho fluoróforo es fluoresceína y dicho colorante que captura la energía emitida por la activación del fluoróforo y la emite a una longitud de onda diferente es el colorante Red640.
4. Método según la reivindicación 1, en el que dicha fuente de luz ópticamente acoplada a dicho termociclador y adaptada para distribuir luz sobre dicha pluralidad de orificios es una fuente de radiación láser.
5. Método según la reivindicación 1, en el que dicho sensor adaptado para detectar simultáneamente la luz emitida desde dicha pluralidad de orificios es un detector de fluorescencia.
6. Un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo formado por las secuencias identificadas como SEQ. ID. N°: 1, SEQ. ID. N°: 2, SEQ. ID. N°: 3 y SEQ. ID. N°: 4.
7. Una sonda marcada que comprende (i) un oligonucleótido, seleccionado del grupo formado por los oligonucleótidos identificados como SEQ. ID. N°: 3 y SEQ. ID. N°: 4, y (ii) un marcador.
8. Sonda según la reivindicación 7, en el que dicho marcador es un fluoróforo o un colorante capaz de capturar la energía emitida por la activación de un fluoróforo.
9. Sonda según la reivindicación 7, seleccionada del grupo formado por: el oligonucleótido identificado como SEQ. ID. N°: 3 unido a fluoresceína, el oligonucleótido identificado como SEQ. ID. N°: 4 unido al colorante Red640, y sus mezclas.
10. Un kit para la detección e identificación rápida de *Lactobacillus plantarum*, en una o más muestras de ensayo, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, que comprende, al menos, un oligonucleótido según la reivindicación 6, o, al menos, una sonda marcada según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9.

ES 2 268 913 B1

11. Kit según la reivindicación 10, que comprende los oligonucleótidos identificados como SEQ. ID. N°: 1 y SEQ. ID. N°: 2, y las sondas marcadas compuestas por el oligonucleótido con la SEQ. ID. N°: 3 unido a fluoresceína y el oligonucleótido con la SEQ. ID. N°: 4 unido al colorante Red640.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 268 913 B1

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Universidad de Sevilla	
5	<120> Método para la detección e identificación rápida de <i>Lactobacillus plantarum</i> mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	
	<160> 4	
10	<170> PatentIn versión 2.0	
	<210> 1	
	<211> 21	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<223> Oligonucleótido iniciador Lfpr	
20	<400> 1	
	gccgcctaag gtgggacaga t	21
25	<210> 2	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<223> Oligonucleótido iniciador PlanII	
	<400> 2	
	ttacctaacg gtaaagcga	20
35	<210> 3	
	<211> 23	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<223> Oligonucleótido LplanIFL	
	<400> 3	
45	ggtgatccag cgcaggttc tct	23
	<210> 4	
50	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<223> Oligonucleótido LplanILC	
55	<400> 4	
	eggctacett gttacgactt caccet	26
60		
65		



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 268 913

② Nº de solicitud: 200301407

③ Fecha de presentación de la solicitud: **11.03.2002**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C12Q 1/10** (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	TORRIANI S. et al. "Differentiation of Lactobacillus plantarum, L. pentosus, and L. paraplantarum by recA gene sequence analysis and multiplex PCR assay with recA gene-derived primers". Appl. Environ. Microbiol. 2001 Agosto. Vol. 67, Nº 8, páginas 3450-3454.	1-11
Y	US 6312930 B1 (DU PONT) 06.11.2001, reivindicaciones.	1-11
Y	SPANO G. et al. Characterization of Lactobacillus plantarum from wine must by PCR species-specific and RAPD-PCR". Lett. Appl. Microbiol. 2002. Vol. 35, Nº 5, páginas 370-374.	1-11
Y	WO 0196612 A2 (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY) 20.12.2001, páginas 3,4,40,41.	1-11
A	WAGNER M. et al. "Fluorescence in situ hybridisation and characterisation of prokaryotes". CURRENT OPINION IN MICROBIOLOGY. JUN 2003 (on line disponible Mayo 2003). Vol. 6, Nº 3, páginas 302-309.	1-11
A	US 5861256 A (GULL LAB) 19.01.1999, reivindicaciones.	1-11
A	US 2003022214 A1 (ELLINGSON JAY LE.) 30.01.2003, todo el documento.	1-11
A	WO 03000935 A1 (MARSHFIELD CLINIC) 03.01.2003	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
07.02.2007

Examinador
J. Manso Tomico

Página
1/1