

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 724 129**

21 Número de solicitud: 201830206

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/44** (2006.01)

**C12Q 1/689** (2008.01)

**C12R 1/42** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**02.03.2018**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**06.09.2019**

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)  
C/ Serrano, 117  
28006 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**GRILLÓ DOLSET, María Jesús y  
GARRIDO GONZÁLEZ, Victoria Eugenia**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **SONDAS DE ACIDO NUCLEICO Y SU USO COMO SUSTRATO EN UN METODO PARA LA DETECCION DE SALMONELA**

57 Resumen:

Sondas de ácido nucleico y su uso como sustrato en un método para la detección de salmonella.

La presente invención se refiere a sondas de ácido nucleico diseñadas para ser específicamente degradadas por la actividad nucleasa de bacterias de Salmonella. Así, la invención proporciona además un método para la detección e identificación de Salmonella, preferiblemente en muestras, que comprende el uso de estas sondas como sustratos, además de kits que comprenden estas sondas.

ES 2 724 129 A1

**DESCRIPCIÓN****SONDAS DE ÁCIDO NUCLEICO Y SU USO COMO SUSTRATO EN UN MÉTODO  
PARA LA DETECCIÓN DE SALMONELLA**

5

La invención pertenece al ámbito de la seguridad alimentaria y la salud. Específicamente, la invención se refiere tanto a las sondas de ácido nucleicos y métodos utilizados como a los kits en los que se usan dichas sondas para la identificación y detección rápida y específica de bacterias de *Salmonella* en muestras tales como alimentos o muestras biológicas aisladas de animales. Estas sondas, métodos y kits son, por tanto, útiles para identificar el alimento ofensivo que contiene *Salmonella* y que puede provocar infecciones en los consumidores.

10

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

15

La *Salmonella* es una causa frecuente de enfermedad bacteriana transmitida por los alimentos en los seres humanos. Los productos de aves de corral y de cerdo son considerados los principales portadores de la *Salmonella* patógena para los seres humanos, aunque el patógeno puede encontrarse en la mayoría de los alimentos, tales como carnes, huevos, leche, queso, verduras y productos listos para comer, incluyendo frutos secos y semillas. Aunque estos animales frecuentemente presentan infecciones asintomáticas, la salmonelosis en los seres humanos transcurre con gastroenteritis abundante y alto riesgo de infecciones sistémicas que podrían ocasionar la muerte. Según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), cada año en Europa se producen más de 100.000 casos de salmonelosis humana. Este valor aumenta a 1,2 millones de infecciones en EE.UU., causando aproximadamente 19.000 hospitalizaciones y 450 muertes al año, según la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA). Así, la reducción de la salmonelosis es un objetivo declarado en todo mundo.

20

25

30

Para prevenir esta relevante zoonosis, se realizaron cambios clave en las reglamentaciones de seguridad alimentaria para mejorar los controles en la cadena de producción de los alimentos. A pesar de estas medidas, se han detectado grandes brotes de salmonelosis en el mundo en la última década. Por ello, son una prioridad evidente para la seguridad alimentaria y la salud pública las nuevas estrategias para la detección de *Salmonella*.

35

La detección de *Salmonella* se realiza generalmente por técnicas de cultivo microbiológico (Odumeru, J.A., León-Velarde, C. G., 2012, In Mahmoud, B. S. M. (ed.), InTech, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canadá, pp. 373 - 392; Zadernowska, A., Chajęcka, W., 2012, In Mahmoud, B. S. M. (ed.), InTech, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Faculty of Food Sciences Chair of Industrial and Food Microbiology, Polonia, pp. 393 - 412; Almeida, C., *et al.*, 2013, Int J Food Microbiol, 161, 16-22; Ahmed, O.B., *et al.*, 2014, Journal of Bacteriology & Parasitology, 5, 187 - 189) que resultaron ser irrefutables pero de baja sensibilidad, caras, laboriosa, requieren personal cualificado y tiempo, durando de días a semanas la confirmación de la presencia o ausencia de *Salmonella*. Se han desarrollado métodos alternativos basados en PCR e inmunoensayos (Law, J.W., *et al.*, 2014, Front Microbiol, 5, 770; Mainar-Jaime, R.C., *et al.*, 2013, J Clin Microbiol, 51, 89-94), sin embargo, estos métodos podrían detectar ADN de bacterias muertas (por ejemplo, después de la pasteurización) dando resultados falsos positivos y/o requieren una fase de cultivo temprana que retrasa hasta varios días los resultados de confirmación dentro de los criterios de sensibilidad estipulados en las regulaciones (por ejemplo, EN/ISO 6579:2002 Amd. 2007). Estos tiempos son claramente incompatibles con la rápida velocidad a la que el alimento se mueve a través de la cadena de producción y distribución “desde la granja hasta la mesa”, y a la que normalmente aparecen los brotes de salmonelosis humana transmitidos por los alimentos. Por consiguiente, son todavía una clara prioridad para la industria alimentaria y a nivel clínico métodos alternativos fiables. La velocidad del método de diagnóstico es importante no solo para prevenir complicaciones clínicas, sino también para identificar el origen del brote y adicionalmente eliminar rápidamente los productos contaminados del mercado.

La detección de bacterias patógenas en productos alimentarios es un parámetro crítico para determinar el control de calidad y la seguridad alimentaria. Los actuales métodos de detección de *Salmonella* son laboriosos y requieren tiempo, con procedimientos principalmente basados en cultivos bacterianos. Aunque se han descrito varias técnicas tales como inmunoensayos o PCR, el enriquecimiento de muestras con cultivos de 24 horas es todavía un inconveniente. Más específicamente, la detección de *Salmonella* en muestras de alimentos requiere de días a semanas hasta la confirmación. Por el contrario, la demanda mundial para el control de alimentos está en un crecimiento continuo para cumplir los requisitos globales. Así, se necesitan metodologías más específicas, más sensibles y más rápidas para identificar

*Salmonella* en muestras. Estos métodos mejorados deberían tener tiempos de detección que alcancen la velocidad de la cadena de suministro de alimentos, “desde la granja hasta la mesa” y deberían también permitir la detección de bacterias vivas con el fin de evitar resultados falsos positivos.

5

En resumen, en comparación con las actuales herramientas de diagnóstico, las características más deseadas para un sistema de detección de *Salmonella* innovador son la reducción del tiempo de diagnóstico (de días/semanas a horas) y la detección del patógeno vivo.

10

### **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

La presente invención describe sondas de ácido nucleico artificiales (sondas de oligonucleótidos) diseñadas para ser específicamente degradadas por la actividad nucleasa de bacterias *Salmonella*. Así, la invención proporciona un método para la detección e identificación de *Salmonella*, preferiblemente en muestras, que comprende el uso de estas sondas, además de kits que comprenden estas sondas.

Los inventores de la presente invención han diseñado sondas de ácido nucleico para la detección específica y sensible de *Salmonella* viva de una forma rápida, preferiblemente en menos de 8 horas. La presente invención aprovecha la actividad nucleasa derivada de *Salmonella* como biomarcador de infección. Las nucleasas de *Salmonella*, pero no las nucleasas de otros géneros de bacterias, tienen preferencia para degradar las sondas de ácido nucleico diseñadas en la presente invención, de manera que estas sondas son propuestas en el presente documento para ser usadas como sustratos para la actividad nucleasa de *Salmonella* y así para la detección e identificación específicas de bacterias que pertenecen al género *Salmonella*. El método descrito en el presente documento se basa así en la identificación de la actividad nucleasa de *Salmonella* usando las sondas anteriormente mencionadas como sustratos.

Las sondas descritas en la presente invención tienen, por tanto, la capacidad de diferenciar *Salmonella* de otras bacterias que también se encuentran comúnmente como contaminantes alimentarios.

35

Además, las sondas descritas en la presente invención tienen la capacidad de

reconocer al menos 50 serotipos diferentes de *Salmonella* y los serotipos más frecuentes en ganglios linfáticos mesentéricos porcinos. En particular, los resultados mostrados en los ejemplos a continuación demuestran el 100 % de correlación con los métodos estándar de ISO 6579:2002, tales como PCR, pruebas de microbiología y serotipado, subrayando el gran potencial de este enfoque para implementarse como un método fiable y rápido para las pruebas de seguridad alimentaria.

Las sondas de oligonucleótidos diseñadas en la presente invención tienen, por tanto, una gran capacidad de reconocer *Salmonella* de una manera sensible y específica. Además, estas sondas de oligonucleótidos tienen una gran flexibilidad para ser incorporadas en kits portátiles baratos que podrían proporcionar la detección *in situ* de *Salmonella* de una forma rápida (preferiblemente en menos de 8 horas).

Los ejemplos mostrados a continuación demuestran que las sondas de ácido nucleico y el método descrito en el presente documento logran una reducción significativa en el tiempo de detección, mientras que retienen una buena sensibilidad y especificidad, haciéndolas competitivas para un amplio rango de aplicaciones. Las sondas de ácido nucleico de la presente invención podrían ayudar a adaptar / sincronizar las pruebas de seguridad alimentaria con la cadena de suministro de alimentos.

Además, en la presente invención se han identificado las condiciones óptimas para el método descrito (tiempo y presencia de agentes quelantes y de cationes divalentes) que proporcionan velocidad de detección y especificidad para dirigirse a *Salmonella*, pero no a otras bacterias.

Otra ventaja de la presente invención es que puede aplicarse a la detección de bacterias de *Salmonella* vivas, lo que permite la detección *in vitro* en muestras aisladas de alimentos o biológicas y también la identificación de *Salmonella* en el entorno o en animales (infección por *Salmonella*). La detección de *Salmonella* viva también evita obtener resultados falsos positivos en la prueba. Además, el método descrito en el presente documento es sensible, específico y rápido, permitiendo la detección de *Salmonella* en preferiblemente menos de 8 horas, más preferiblemente en 15 min, y discriminando entre *Salmonella* y otras bacterias que no pertenecen a este género.

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a una sonda de ácido nucleico aislada que consiste en cualquiera de las secuencias de nucleótidos

indicadas en la Tabla 1 de la presente descripción, es decir, cualquiera de las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 24.

Otro aspecto de la invención se refiere a una sonda de ácido nucleico aislada que  
5 consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 25, en lo sucesivo “la sonda de la invención”.

La SEQ ID NO: 25 se corresponde con la secuencia de nucleótidos  
UCUN<sub>4</sub>N<sub>5</sub>UACN<sub>9</sub>UN<sub>11</sub>C, donde el nucleótido en la posición N<sub>4</sub> puede ser C, A o G, el  
10 nucleótido en la posición N<sub>5</sub> puede ser G o C, el nucleótido en la posición N<sub>9</sub> puede ser G o U y el nucleótido en la posición N<sub>11</sub> puede ser U o A.

Preferiblemente, la sonda de la invención está químicamente modificada. Más preferiblemente, al menos 9 nucleótidos de la SEQ ID NO: 25 comprenden un anillo de  
15 ribosa cuya posición 2' comprende un grupo O-metilo, también llamado grupo 2'-O-metilo o 2'-OMe.

En una realización más preferida, los nucleótidos en las posiciones 1 a 3, 6, 8, 10 y 12 de la SEQ ID NO: 25 comprenden un anillo de ribosa cuya posición 2' comprende un  
20 grupo O-metilo.

En otra realización preferida, la sonda de la invención consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionada de la lista que consiste en: SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19. Más preferiblemente, la sonda de la invención  
25 consiste en la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19.

La SEQ ID NO: 10 (UCUCGUACGUUC) es la sonda también denominada en la presente invención “Pir 2'-OMe ARN” o “sonda Parental”, y consiste en la secuencia de  
30 nucleótidos de SEQ ID NO: 25 donde el nucleótido en la posición N<sub>4</sub> es C, el nucleótido en la posición N<sub>5</sub> es G, el nucleótido en la posición N<sub>9</sub> es G y el nucleótido en la posición N<sub>11</sub> es U. En una realización más preferida, los nucleótidos en las posiciones 1 a 3, 4, 6, 8, 10, 11 y 12 de la SEQ ID NO: 10 comprenden un anillo de ribosa cuya posición 2' comprende un grupo O-metilo.

35 La SEQ ID NO: 15 (UCUACUACUUUC) es la sonda también denominada en la

presente invención “Sal 3\_Pir 2'-OMe ARN” o “Sal-3”, y consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 25 donde el nucleótido en la posición N<sub>4</sub> es A, el nucleótido en la posición N<sub>5</sub> es C, el nucleótido en la posición N<sub>9</sub> es U y el nucleótido en la posición N<sub>11</sub> es U. En una realización más preferida, los nucleótidos en las posiciones 1 a 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11 y 12 de la SEQ ID NO: 15 comprenden un anillo de ribosa cuya posición 2' comprende un grupo O-metilo.

La SEQ ID NO: 17 (UCUACUACUUAC) es la sonda también denominada en la presente invención “Sal 5\_Pir 2'-OMe ARN” o “Sal-5”, y consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 25 donde el nucleótido en la posición N<sub>4</sub> es A, el nucleótido en la posición N<sub>5</sub> es C, el nucleótido en la posición N<sub>9</sub> es U y el nucleótido en la posición N<sub>11</sub> es A. En una realización más preferida, los nucleótidos en las posiciones 1 a 3, 5, 6, 8, 9, 10 y 12 de la SEQ ID NO: 17 comprenden un anillo de ribosa cuya posición 2' comprende un grupo O-metilo.

La SEQ ID NO: 19 (UCUGCUACUUAC) es la sonda también denominada en la presente invención “Sal 7\_Pir 2'-OMe ARN” o “Sal-7”, y consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 25 donde el nucleótido en la posición N<sub>4</sub> es G, el nucleótido en la posición N<sub>5</sub> es C, el nucleótido en la posición N<sub>9</sub> es U y el nucleótido en la posición N<sub>11</sub> es A. En una realización más preferida, los nucleótidos en las posiciones 1 a 3, 5, 6, 8, 9, 10 y 12 de la SEQ ID NO: 19 comprenden un anillo de ribosa cuya posición 2' comprende un grupo O-metilo.

Los resultados mostrados en los ejemplos a continuación demuestran el diseño, cribado e identificación de dos sondas de oligonucleótidos preferidas como las sondas más prometedoras para detectar *Salmonella*. Como resultado, se han identificado dos sondas de ácido nucleico óptimas de la invención que consisten en la SEQ ID NO: 15 y la SEQ ID NO: 17, que se probaron primero con cepas de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* y posteriormente con cepas de *Salmonella* de 50 serotipos diferentes más un conjunto de 12 cepas distintas de *Salmonella*. Ambas sondas permitieron la detección específica de todas las cepas de *Salmonella* testadas *in vitro*. Finalmente, se realizó un estudio de doble ciego usando muestras de ganglios linfáticos porcinos para determinar la sensibilidad y especificidad de estas sondas seleccionadas para detectar *Salmonella*.

Así, en una realización más preferida, la sonda de la invención consiste en la

secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 17, incluso más preferiblemente SEQ ID NO: 17.

5 En otra realización preferida, la sonda de la invención comprende además al menos un fluoróforo ligado a al menos uno de sus extremos 5' o 3'. Más preferiblemente, comprende un fluoróforo ligado a su extremo 5'. Incluso más preferiblemente, la sonda de la invención comprende además un fluoróforo ligado a su extremo 5' y/o un supresor ligado a su extremo 3'. En la realización más preferida, la sonda de la invención comprende además un fluoróforo ligado a su extremo 5' y un supresor ligado  
10 a su extremo 3'. Preferiblemente, el fluoróforo es FAM y el supresor es TQ2.

“FAM” es el fluoróforo de amidito de fluoresceína y “TQ2” es *Tide Quencher 2 acid*.

15 Cuando se usan sondas químicamente modificadas de la invención flanqueadas en el extremo 5' con un fluoróforo (FAM) y en el extremo 3' con un supresor (TQ2), la molécula reportera (FAM) se inactiva por la estrecha proximidad con el supresor, y solo tras la degradación de la sonda de oligonucleótidos por una nucleasa específica los restos de FAM y supresor se difunden, aumentando la distancia inicial. Esto permite que el resto de FAM recupere su funcionalidad como molécula reportera, y  
20 puede registrarse el evento de actividad nucleasa por mediciones de fluorescencia.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit que comprende la sonda de ácido nucleico de la invención, en lo sucesivo el “kit de la invención”. En una realización preferida, este kit de la invención comprende las sondas de ácido nucleico de la  
25 invención que consisten en las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 19. Más preferiblemente, este kit de la invención comprende las sondas de ácido nucleico de la invención que consisten en las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 17, incluso más preferiblemente SEQ ID NO: 17.

30

En otra realización preferida del kit de la invención, éste comprende además EGTA y/o NTA, preferiblemente EGTA, como agentes quelantes. Más preferiblemente, estos agentes quelantes están en una concentración de 50 mM en el kit de la invención.

35 En una realización más preferida del kit de la invención, éste comprende además cationes divalentes seleccionados de la lista que consiste en:  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  o

cualquier combinación de los mismos. Incluso más preferiblemente, el kit de la invención comprende los cationes divalentes  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ . Preferiblemente, estos cationes divalentes están en una concentración de 50 mM en el kit de la invención.

- 5 En la realización más preferida del kit de la invención, éste comprende las sondas de la invención que consisten en la SEQ ID NO: 15 y la SEQ ID NO: 17, EGTA y los cationes divalentes  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ .

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la sonda de la invención o el kit de la  
10 invención para la detección de *Salmonella*, preferiblemente para la detección *in vitro* de *Salmonella* en muestras aisladas.

En una realización preferida, *Salmonella* es *Salmonella* Typhimurium o *Salmonella*  
15 Enteritidis.

En otra realización preferida, las “muestras” a las que se refiere la presente invención  
son muestras de alimentos, es decir, muestras derivadas de la industria alimentaria  
que incluyen alimentos y maquinaria usada durante el procesado de alimentos, o  
muestras biológicas aisladas de un animal.

20 La muestra a la que se refiere la presente invención también puede derivar de un cultivo microbiológico o del entorno.

El “animal” al que se refiere la presente invención es cualquier animal que es  
25 susceptible de ser un portador de salmonelosis. Animales de este tipo pueden ser, por ejemplo pero sin limitación, aves o mamíferos, preferiblemente mamíferos incluyendo seres humanos y mamíferos no humanos. Más preferiblemente, el animal es un cerdo o aves de corral. Cualquier muestra o producto derivado u obtenido de estos animales está englobado dentro de la definición de “muestra” en la presente invención.

30 En otra realización preferida, la muestra de alimento a la que se refiere la presente invención se selecciona de la lista que consiste en: carne, huevos, leche, queso, verduras, frutos secos o semillas. También están englobados en la presente invención los productos listos para el consumo.

35 Otro aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para la detección o

identificación de *Salmonella* en muestras o un método *in vitro* para el diagnóstico de una infección producida por *Salmonella* (salmonelosis) en un animal incluyendo seres humanos, que comprende:

- 5 a. Poner en contacto la muestra aislada que va a analizarse con la sonda de ácido nucleico de la invención o el kit de la invención,
- b. Incubar la mezcla de la etapa (a) bajo condiciones que permitan la degradación de la sonda de ácido nucleico por la actividad nucleasa de *Salmonella*,
- 10 c. detectar la degradación de la sonda de ácido nucleico, y
- d. asignar la muestra al grupo de muestras que comprenden *Salmonella* cuando se ha detectado una degradación de la sonda de ácido nucleico en la etapa (c).

15 Este método también se llamará en el presente documento el “método de la invención”.

En una realización preferida del método de la invención, la detección de la degradación de la sonda de ácido nucleico en la etapa (c) se realiza por medio de medición de la intensidad de fluorescencia.

20 En este método, las sondas de ácido nucleico de la invención se usan como sustratos de oligonucleótido para la actividad nucleasa de *Salmonella*.

En otra realización preferida del método de la invención, las condiciones que permiten la degradación de la sonda de ácido nucleico por la actividad nucleasa de *Salmonella* en la etapa (b) son:

- la incubación durante entre 15 min y 2 h, preferiblemente 2 h, más preferiblemente 1 h, incluso más preferiblemente 15 min, y
- la presencia de EGTA y/o NTA, preferiblemente EGTA, y de cationes divalentes seleccionados de la lista que consiste en:  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  o cualquier combinación de los mismos.

Más preferiblemente, la incubación de la etapa (b) tiene lugar a 37 °C.

35 En otra realización preferida del método de la invención, *Salmonella* es *Salmonella* Typhimurium o *Salmonella* Enteritidis.

En otra realización preferida del método de la invención, las muestras son muestras de alimentos o muestras biológicas aisladas de un animal. Preferiblemente, el animal es un cerdo, un ser humano, o aves de corral.

5

En otra realización preferida del método de la invención, las muestras de alimentos son carne, huevos, leche, queso, verduras, frutos secos o semillas.

Este método de la invención también puede ser útil para monitorizar la respuesta a un tratamiento contra salmonelosis en un animal, incluyendo seres humanos.

10

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que es comúnmente entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Pueden usarse en la práctica de la presente invención métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento. En toda la descripción y reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes, o etapas. Para aquellos expertos en la materia serán evidentes otros objetos, ventajas y características adicionales de la invención tras el examen de la descripción o pueden ser aprendidos por la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes de la presente invención.

15

20

## DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25

**FIG. 1. Cribado de la actividad nucleasa derivada de *Salmonella*.** Se describe la actividad nucleasa global derivada de *Salmonella* como un aumento en la intensidad de fluorescencia media como resultado de la degradación por cada sonda. Las barras representan el promedio de mediciones de fluorescencia por triplicado ( $\pm$  d.e.). Los datos son representativos de al menos 3 experimentos individuales.

30

**FIG. 2. Perfil de actividad nucleasa de 11 cultivos de *Salmonella Typhimurium* usando la sonda Parental y 12 sondas derivadas de *Salmonella*.** Las barras representan la media de mediciones de fluorescencia por triplicado ( $\pm$ d.e.). Los datos son representativos de al menos 3 experimentos individuales.

35

**FIG. 3. Perfil de actividad nucleasa de 11 cultivos de *Salmonella* Enteritidis usando la sonda Parental y 12 sondas derivadas de *Salmonella*.** Las barras representan la media de mediciones de fluorescencia por triplicado ( $\pm$ d.e.). Los datos son representativos de al menos 3 experimentos individuales.

5

**FIG. 4. Curvas de crecimiento.** Se cultivaron *Salmonella* Typhimurium (STM1) y *Salmonella* Enteritidis (SE1) y se llevó a cabo la determinación de UFC/ml en diferentes momentos de tiempo mediante recuento en placa.

10 **FIG. 5. Determinación de sensibilidad del ensayo de nucleasa para los cultivos de *Salmonella*.** Se realizaron mediciones de fluorescencia de la actividad nucleasa derivada de *Salmonella* Typhimurium (STM1) y *Salmonella* Enteritidis (SE1) usando las sondas Parental, Sal-3 y Sal-5 en diferentes momentos de tiempo.

15 **FIG. 6. Estudio de especificidad de las sondas de *Salmonella* en condiciones normales.** Se probaron diversos cultivos bacterianos usando las sondas Parental, Sal-3 y Sal-5 en condiciones normales (tiempo de incubación de 1 h y PBS+/-) para el ensayo de actividad nucleasa.

20 **FIG. 7. Estudio de especificidad de las sondas de *Salmonella* en condiciones optimizadas.** Se probaron diversos cultivos bacterianos usando las sondas Parental, Sal-3 y Sal-5 en condiciones optimizadas de 15 min de tiempo de incubación y adición del agente quelante EGTA.

25 **FIG. 8. Experimento de doble ciego para determinar la presencia o ausencia de *Salmonella* en ganglios linfáticos de cerdo.** Las barras representan la actividad nucleasa específica derivada de muestras de ganglios linfáticos usando las sondas de oligonucleótido Parental (barras blancas), Sal-3 (barras grises) y Sal-5 (barras negras). Se observó correlación del 100 % entre los métodos convencionales y las sondas de  
30 *Salmonella*.

**FIG. 9. Optimización del tiempo de incubación para las sondas de oligonucleótidos específicas de *Salmonella*.**

35 **FIG. 10. Efecto quelante sobre las sondas de oligonucleótidos específicas de *Salmonella*.**

**FIG. 11. Efecto de los cationes divalentes sobre las sondas de oligonucleótidos específicas de *Salmonella*.**

5 **FIG. 12. PCR-InvA de las muestras de ganglios linfáticos en BPW de cerdos para confirmar la presencia o ausencia de *Salmonella*.** C+: control positivo; C-: control negativo y como marcador de peso molecular (marcador de Nippon). Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en 1 % de agarosa en tampón TAE, se tiñeron con Midori Green y se visualizaron en un transiluminador UV.

10

**FIG. 13. Evaluación de 50 serovariedades de *Salmonella* usando sondas de ácido nucleico.** Las barras representan la actividad nucleasa específica observada para cada serotipo de *Salmonella*. Se identificaron satisfactoriamente 50 serotipos (96 %) usando una sonda de ácido nucleico.

15

## **EJEMPLOS**

### **1. Materiales**

#### 20 **Soluciones y medios de cultivo**

Se compraron dos tipos de solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4) con MgCl<sub>2</sub> y CaCl<sub>2</sub> (PBS +/+) y sin este suplemento (PBS -/-) de Gibco (Life Technologies, España). Se compró ácido etilendiaminatetraacético (EDTA, número CAS: 60-00-4, pH 25 8,0), Tris-EDTA, 1x solución (TE, número CAS: 38641-82-6, pH 8,0) y ácido nitrotriácético (NTA, número CAS: 139-13-9) de ThermoFisher Scientific (Madrid, España). Se compró etilenglicol-bis(2-aminoetil éter)-N (EGTA, número CAS: 67-42-5), cloruro de magnesio hexahidratado (número CAS: 7791-18-6), cloruro de calcio (número CAS: 1043-52-4), cloruro de cinc (número CAS: 7646-85-7), cloruro de manganeso (II) (número CAS: 7773-01-5) y acetato de cobre (II) (número CAS: 142-30 71-2) de Sigma-Aldrich (Madrid, España).

Se compraron los medios de cultivo agua de peptona tamponada (BPW), agar de Luria Bertani (LA), agar de triptona de soja (TSA), Luria Bertani (LB) y caldo de soja triptica 35 (TSB) en Difco (Pronadisa, España).

**Cepas bacterianas**

Se seleccionaron un total de 94 cepas bacterianas, es decir, 12 *S. Typhimurium*, 12 *S. Enteritidis*, 50 *Salmonella* spp. de diferentes serotipos y 20 cepas distintas de *Salmonella* de 12 géneros diferentes, del conjunto de cultivos bacterianos del Instituto de Agrobiotecnología (IdAB, Navarra, España). Estas cepas se aislaron previamente de muestras de animal o de alimentos, se caracterizaron fenotípicamente y se tipificaron en los Centros Nacionales de Referencia para la Salmonelosis Animal (Algete, Madrid, España) y/o el Instituto de Salud Carlos III ISC (Madrid, España).

Todas las cepas se almacenaron a -80 °C en 10% de leche desnatada hasta su uso. Las cepas se nombraron por las iniciales del serotipo, seguido de un número correlativo, por ejemplo STM1, STM2, SE1, SE2, etc., según el orden de aparición en este trabajo.

**Muestras de BPW-MLN**

Se seleccionaron un total de 30 alícuotas de 1 ml de muestras con BPW de ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) de cerdos de engorde previamente cultivadas (37 °C, 24 h) y almacenadas a -20 °C (BPW-MLN) de la colección de IdAB. De ellas, 15 muestras se clasificaron como positivas para *Salmonella* y 15 como negativas para *Salmonella*, según la bacteriología previa realizada siguiendo el procedimiento convencional de ISO 6579:2002 Amd. 2007. Con el fin de minimizar la probabilidad de un resultado falso negativo, se seleccionaron las 15 muestras de BPW negativas de granjas donde se encontró que todos los cerdos de engorde analizados eran negativos.

25

**2. Métodos****Síntesis y purificación de sondas de oligonucleótidos**

Se sintetizaron las sondas de ADN y se purificaron en Biomers.net (Alemania) con el fluoróforo amidado de fluoresceína (FAM) en el extremo 5' y Tide quencher 2 acid (TQ2) en el extremo 3'. Para esto, se usó un método convencional de química de fosoramidito en fase sólida, seguido de purificación por cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC). Las identidades de las sondas se confirmaron con espectrometría de masas de ionización por desorción con láser asistida por matriz (MALDI-MS). La pureza de las sondas, se evaluó con análisis de HPLC, normalmente

35

es superior al 95 %. Las secuencias de oligonucleótidos de las sondas usadas en este estudio se describen en la Tabla 1.

5 Tabla 1. Secuencias de las sondas de oligonucleótidos y nombres. “m” significa la presencia en el nucleótido que sigue de un anillo de ribosa cuya posición 2' comprende un grupo O-metilo, también llamado grupo 2'-O-metilo o 2'-OMe. “f” significa la presencia en el nucleótido que sigue de un anillo de ribosa cuya posición 2' comprende un grupo flúor, también llamado grupo 2'-flúor.

NOMBRE DE LA SEQ	SECUENCIA
ADN (SEQ ID NO: 1)	FAM // TCTCGTACGTTC // TQ2
ARN (SEQ ID NO: 2)	FAM // ucucguacguuc // TQ2
Toda 2'-F (SEQ ID NO: 3)	FAM // fUfCfUfCfGfUfAfCfGfUfUfC // TQ2
Pir 2'-F ADN (SEQ ID NO: 4)	FAM // fTfCfTfCgfTafCgfTfTfC // TQ2
Pir 2'-F ARN (SEQ ID NO: 5)	FAM // fUfCfUfCgfUafCgfUfUfC // TQ2
Pur 2'-F ADN (SEQ ID NO: 6)	FAM // TfAfACfGTfACfGfGTC // TQ2
Pur 2'-F ARN (SEQ ID NO: 7)	FAM // ufAfAcfGufAcfGfGuc // TQ2
Toda 2'-OMe (SEQ ID NO: 8)	FAM // mUmCmUmCmGmUmAmCmGmUmUmC // TQ2
Pir 2'-OMe ADN (SEQ ID NO: 9)	FAM // mTmCmTmCgmTamCgmTmTmC // TQ2
Pir 2'-OMe ARN (SEQ ID NO: 10)	FAM // mUmCmUmCgmUamCgmUmUmC // TQ2
Pur 2'-OMe ADN (SEQ ID NO: 11)	FAM // TmAmACmGTmACmGmGTC // TQ2
Pur 2'-OMe ARN (SEQ ID NO: 12)	FAM // umAmAcmGumAcmGmGuc // TQ2
Sal 1_Pir 2'-OMe ARN (SEQ ID NO: 13)	FAM //mUmCmUmCmCmUamCmUmUmUmC // TQ2
Sal 2_Pir 2'-OMe ARN (SEQ ID NO: 14)	FAM //mUmCmUmCmCmUgmCmUmUmUmC // TQ2

NOMBRE DE LA SEQ	SECUENCIA
Sal 3_Pir 2'-OMe ARN (SEQ ID NO: 15)	FAM // mUmCmUamCmUamCmUmUmUmC // TQ2
Sal 4_Pir 2'-OMe ARN (SEQ ID NO: 16)	FAM // mUmCmUgmCmUgmCmUmUmUmC // TQ2
Sal 5_Pir 2'-OMe ARN (SEQ ID NO: 17)	FAM // mUmCmUamCmUamCmUmUamC // TQ2
Sal 6_Pir 2'-OMe ARN (SEQ ID NO: 18)	FAM // mUmCmUgmCmUgmCmUmUgmC // TQ2
Sal 7_Pir 2'-OMe ARN (SEQ ID NO: 19)	FAM // mUmCmUgmCmUamCmUmUamC // TQ2
Sal 8_Pir 2'-OMe ARN (SEQ ID NO: 20)	FAM // mUmCmUamCmUgmCmUmUamC // TQ2
Sal 9_Pir 2'-OMe ARN (SEQ ID NO: 21)	FAM // mUmCmUamCmUamCmUmUgmC // TQ2
Sal 10_Pir 2'-OMe ARN (SEQ ID NO: 22)	FAM // mUmCmUmCmCaamUmCmUmUmC // TQ2
Sal 11_Pir 2'-OMe ARN (SEQ ID NO: 23)	FAM // mUmCmUmCmCggmUmCmUmUmUmC // TQ2
Sal 12_Pir 2'-OMe ARN (SEQ ID NO: 24)	FAM // mUmCmUmCmCagmUmCmUmUmUmC // TQ2

### **Preparación de sobrenadantes bacterianos para el ensayo nucleasa**

- 5 Para preparar sobrenadantes de cultivo puros, se precultivaron bacterias en placas de LA o TSA (24 h, 37 °C) y luego se transfirió una colonia individual a LB o TSB y se incubó durante la noche, a 37 °C. Los cultivos obtenidos se diluyeron 1:500 en LB o TSB fresco y se cultivaron (24h, 37 °C) en agitación a 200 rpm. Entonces se centrifugó cada cultivo (6.000 g, 20 min) y el sobrenadante se conservó y se mantuvo a 4 °C

hasta su uso. Similarmente, se descongelaron alícuotas de BPW-MLN y se centrifugaron para la recogida del sobrenadante. Para evaluar la ausencia de bacterias, cada sobrenadante se filtró en un Millipore® (Sarsted) de 0,2 µm y se sembraron 100 µl de cada filtrado en TSA y se incubaron (48 h, 37 °C). Todos los sobrenadantes se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

### **Ensayos de actividad nucleasa**

Los ensayos de actividad nucleasa se realizaron como se han descrito anteriormente (Hernandez, L.I., *et al.*, 2016, *Chemical Communications*, 52, 12346-12349) con ligeras modificaciones. Específicamente, para cada reacción, se combinaron 9 µl de muestra (es decir, sobrenadantes de cultivo de *Salmonella*, otras bacterias o ganglios linfáticos mesentéricos, medio de control usado para los cultivos, o tampón de control) con 1 µl (50 pmoles, sustrato de nucleasa) de la sonda de oligonucleótidos a testar y esta mezcla se incubó a 37 °C, durante diferentes tiempos: 7,5 min, 15 min, 30 min, 60 min y 120 min.

Una vez determinado que 1 h era el tiempo de incubación óptimo, el estudio de las condiciones químicas se realizó mezclando 8 µl de muestra más 1 µl de cualquiera de los quelantes EDTA, EGTA o NTA 50 mM o 50 mM de cationes divalentes Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> o Cu<sup>2+</sup>, y más 1 µl (50 pmoles) de la sonda correspondiente. Cada mezcla se incubó a 37 °C, durante 1 h.

En todos los casos, la reacción se detuvo añadiendo 295 µl de PBS +/- suplementado con EDTA 10 mM. A continuación, se cargaron 95 µl de cada muestra por triplicado en placas negras de 96 pocillos (placa de pocillos negra no tratada 96F, Thermo Scientific). La intensidad de fluorescencia se midió con un lector de microplacas de fluorescencia (Synergy HT, BioTek) empleando los parámetros adecuados del filtro para FAM (excitación/emisión 494/521 nm). Se realizaron tres experimentos independientes con cada muestra. Los resultados se expresaron como la media ± DE (n=3) de la intensidad de fluorescencia.

### **Cribado de sondas de ADN en *Salmonella* y otros cultivos bacterianos**

Se realizó un cribado inicial con 12 sondas seleccionadas (Sal 1-Sal 12, Tabla 1) utilizando sobrenadantes de cultivo de dos cepas de *Salmonella* (es decir, STM 14028

o STM1 y SE 408 o SE1) y otros tres patógenos comunes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*). Como resultado, la sonda Pir 2'-OMe ARN se identificó como la "sonda Parental" (Figura 1) que se usó adicionalmente para diseñar otras 12 "sondas derivadas", llamadas Sal1 a Sal12 (Tabla 1).

5

Para evaluar la sensibilidad de estas 12 "sondas derivadas" para detectar nucleasas de *Salmonella*, se seleccionaron sobrenadantes de 20 cepas adicionales (n=10) de *S. Typhimurium* (STM2 - STM11) y *S. Enteritidis* (SE2 - SE11). Se usó la sonda Parental Pir 2'-OMe ARN como control de actividad nucleasa en los sobrenadantes. Como resultado, se seleccionaron las sondas Sal3 y Sal5 como "sondas finales".

10

Las dos sondas finales Sal3 y Sal5 seleccionadas se probaron con un total de 50 cepas de *Salmonella*, seleccionadas de cada serotipo diferente de la colección de cultivos de *Salmonella* de IdAB.

15

#### **Preparación de sobrenadantes de *Salmonella* para las curvas de crecimiento y prueba del límite de detección**

Se determinó el límite de detección *in vitro* de la técnica basada en la actividad nucleasa en sobrenadantes de cultivo puros de STM1 y SE1. Para esto, se cultivó cada cultivo de reserva de *Salmonella* en placas de LA (a 37 °C, 24 h) y se recogió en BPW, para preparar suspensiones bacterianas ajustadas mediante espectrofotometría (densidad óptica a 600 nm = 0,160 de absorbancia) para contener  $\approx 2 \times 10^8$  UFC/ml. Se evaluó retrospectivamente el número exacto de UFC mediante diluciones decimales seriadas en BPW y siembras en LA (a 37 °C, 24 h). Las curvas de crecimiento se determinaron a partir de una suspensión que contenía  $\approx 10^2$  UFC/ml en BPW (preparada mezclando 6 ml de  $\approx 10^3$  UFC/ml y 54 ml de BPW fresca) y posterior cultivo a 37 °C durante 24 h. Las muestras se recogieron en diferentes tiempos 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 24 h tras la incubación, se centrifugaron (6.000 g, 20 min), y los sobrenadantes se diluyeron diez veces en PBS y se usaron para el ensayo de nucleasa, como se ha explicado anteriormente, con las sondas finales Sal3 y Sal5, además de con la sonda Parental Pir 2'-OMe ARN como control. Se midió la intensidad de fluorescencia.

20

25

30

Además, se cuantificó el número de UFC en cada momento de tiempo seleccionado por siembra por triplicado de las diluciones apropiadas en LA e incubación (37 °C, 24 h). Cada muestra se analizó por triplicado. Los recuentos bacterianos se transformaron

35

en logaritmos y se representó su media  $\pm$  DE (n=3).

### **Especificidad de las sondas seleccionadas en diferentes condiciones**

5 Se determinó la especificidad de las 2 “sondas finales” con 20 sobrenadantes adicionales preparados a partir de 12 especies bacterianas distintas diferentes de *Salmonella* que se encuentran frecuentemente en los alimentos, animales y/o entorno. Se usaron los sobrenadantes STM1 y SE1 y la sonda Parental Pir 2'-OMe ARN como controles. Estos sobrenadantes se analizaron, primero, en condiciones convencionales  
10 (tiempo de incubación de 1 h y PBS+/+) para el ensayo de actividad nucleasa. Para evitar la inespecificidad observada, se analizaron las mismas preparaciones y sondas en condiciones optimizadas (15 min de incubación y adición del agente quelante EGTA).

### **Sensibilidad de la actividad nucleasa frente a PCR y bacteriología en muestras de BPW-MLN**

Se realizó un experimento de doble ciego con el fin de determinar la presencia o ausencia de *Salmonella* en MLN de cerdo por actividad nucleasa, en comparación con  
20 los resultados previos de bacteriología obtenidos por ISO 6579:2002 Amd. 2007 y con una PCR-*InvA* previamente descrita (Mainar-Jaime, R.C., *et al.*, 2013, J Clin Microbiol, 51, 89-94). Para esto, se usaron sobrenadantes de las 30 muestras de BPW-MLN descritas anteriormente.

25 Se llevaron a cabo experimentos de actividad nucleasa usando las sondas seleccionadas (Sal3 y Sal5) y las condiciones seleccionadas antes (es decir, 15 min de incubación y adición del quelante EGTA). Las reacciones de PCR se realizaron con el ADN extraído de 0,5 ml de cada alícuota descongelada de BPW-MLN y se analizó la  
30 amplificación de los fragmentos de ADN de 229 pb esperados por electroforesis convencional en 1 % (peso/volumen) de gel de agarosa en tampón TAE, se tiñeron con Midori Green y se visualizaron en un transiluminador UV. Se usaron STM1 (control positivo) y *E. coli* y agua ultra-pura estéril (MilliQ) (controles negativos) como controles.

### **3. Resultados**

35

### **Cribado de actividad nucleasa en cultivos de *Salmonella***

Se pretendió identificar la actividad nucleasa específica derivada de *Salmonella* diseñando sustratos de oligonucleótido que contenían diferentes secuencias y modificaciones químicas. El cribado comenzó con 12 bibliotecas diferentes que se incubaron con la bacteria diana (*Salmonella*), junto con tres cultivos no específicos de *E. coli*, *S. aureus* y *S. pyogenes*, como controles. Las sondas de oligonucleótidos usadas en este cribado se dividieron en tres categorías: i) sondas naturales; ADN y ARN, ii) sondas de 2'-flúor y sus derivados, y iii) sondas de 2'-O-metilo y sus derivados (Tabla 1). La Figura 1 muestra la preferencia de la actividad nucleasa detectada en *Salmonella* y los cultivos control por cada sonda testada. Las sondas naturales (ADN y ARN) han demostrado actividad nucleasa para ambas, bacterias *Salmonella* y control, sugiriendo la presencia de múltiples nucleasas en cada uno de los cultivos bacterianos. Las sondas de ADN son fácilmente degradadas por los cultivos de *S. aureus*. Por otra parte, la sonda de ARN fue ligeramente mejor degradada por los cultivos de *Salmonella* en comparación con las bacterias control. Estos resultados sugieren que los cultivos de *Salmonella* tienen preferencia por el ARN con respecto a las sondas de oligonucleótidos de ADN analizadas en este estudio, y esto podría indicar la presencia de RNasas activas en los cultivos.

Posteriormente, tanto las secuencias de sondas de ARN como de ADN se modificaron químicamente (completamente o parcialmente), incorporando dos modificaciones químicas bien establecidas (2'-flúor y 2'-O-metilo) de los nucleósidos durante la síntesis de oligonucleótidos (Tabla 1). Así, se espera que las quimeras resultantes confieran características adicionales de resistencia y/o especificidad por una actividad nucleasa diana asociada a los cultivos de *Salmonella*. De hecho, se observó que las sondas modificadas con 2'-flúor fueron mejor digeridas por las bacterias no específicas control que por los cultivos de *Salmonella*, sugiriendo que la química del 2'-flúor no es la modificación más adecuada para la identificación de nucleasas de *Salmonella*. Más específicamente, los cultivos de *Salmonella* han mostrado una señal inferior para la sonda completamente modificada con 2'-flúor (Toda 2'-F), y para las quimeras de 2'-flúor-ADN (Pir-2'-F-ADN y Pur-2'-F-ADN). De forma interesante, las quimeras de 2'-flúor-ARN (Pir-2'-F-ARN y Pur-2'-F-ARN) han mostrado valores fluorescentes solo ligeramente inferiores en comparación con los controles, lo que indica que las sondas que contienen ARN son más susceptibles a la degradación por nucleasas de *Salmonella*.

A continuación, se probaron las sondas modificadas con 2'-O-metilo. Se detectó que la secuencia completamente de 2'-O-metilo (Toda 2'-OMe) es la sonda más resistente para todos los cultivos bacterianos analizados, incluyendo cultivos de *Salmonella*. Por otra parte, las quimeras de 2'-O-metilo-ADN (Pir-2'-OMe-ADN y Pur-2'-OMe-ADN) generaron los mayores valores de intensidad de fluorescencia, y así la actividad nucleasa más elevada para los cultivos de *S. aureus*, y actividad nucleasa limitada para cultivos de *Salmonella*. Por el contrario, se observaron resultados muy prometedores para las quimeras de 2'-O-metilo-ARN, donde la sonda Pir-2'-OMe-ARN ha mostrado la mejor capacidad de discriminar *Salmonella* de los cultivos bacterianos control (Figura 1, rectángulo de línea discontinua). También se observó una diferencia sorprendente entre las sondas Pir-2'-OMe-ADN y Pir-2'-OMe-ARN, atribuida probablemente a la presencia de las purinas de ADN y ARN, respectivamente. Esta observación sugiere que las tres purinas de ARN en la secuencia de Pir-2'-OMe-ARN (véase la Tabla 1) son esenciales para dirigir las nucleasas de *Salmonella*. Así, los presentes inventores optimizaron adicionalmente la sonda modificando el número y secuencia de estas tres purinas de ARN, con el objetivo de obtener una sonda específica para *Salmonella*.

### **Diseño y caracterización de una sonda óptima para *Salmonella***

Basándose en la satisfactoria identificación de Pir-2'-OMe-ARN ("sonda Parental") como una sonda prometedora para identificar *Salmonella*, los presentes inventores se vieron motivados a diseñar sondas de oligonucleótidos adicionales cambiando los tres nucleótidos de ARN de purina presentes en la sonda parental. Para ello, la secuencia 12-mer de la sonda Parental se modificó para evaluar el efecto donde la incorporación de una única (adenosina o guanosina) o varias purinas podría mejorar la sensibilidad de la sonda comparando con la Parental. Con esto en mente, se diseñaron 12 sondas nuevas (llamadas Sal-1 a Sal-12) que se testaron bajo las mismas condiciones usadas en el cribado inicial. Las Figuras 2 y 3 muestran la eficiencia de degradación de todas las sondas (Parental a Sal-12) utilizando 11 cultivos de *Salmonella* Typhimurium (Figura 2) y 11 cultivos de *Salmonella* Enteritidis (Figura 3). De forma interesante, se observó una variedad de perfiles de degradación de sondas. La sonda Parental se usó como valor basal para evaluar la eficiencia de degradación de las nuevas sondas derivadas. Las primeras dos sondas, Sal-1 y Sal-2, se diseñaron reduciendo el número de purinas de ARN en la secuencia, de tres purinas en la secuencia parental a una única adenosina para Sal-1, y una única guanosina, para Sal-2. Para ambas

secuencias derivadas, se observó una clara reducción en la degradación de la sonda. Además, la señal de fluorescencia más drásticamente reducida fue en Sal-2, lo que indica que la presencia de guanósina aumenta la resistencia de la sonda hacia nucleasas de *Salmonella*. A continuación, se probaron las sondas derivadas Sal-3 y Sal-4, que contenían dos adenosinas y dos guanósinas, respectivamente. Mientras que la sonda Sal-4 mostró una ligera mejora en comparación con Sal-2, sugiriendo un efecto aditivo, fue todavía menos eficientemente degradada cuando se comparó con la parental. Por el contrario, Sal-3 demostró ser una mejor sonda, lo que indica que los nucleótidos de adenosina son un mejor sustrato para las nucleasas de *Salmonella*. Se probó entonces la incorporación de tres adenosinas para Sal-5 y tres guanósinas para Sal-6, confirmando así una vez más la preferencia de ambos cultivos; *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* por la adenosina como sustrato, con una señal más consistente. Finalmente, se analizó la combinación de tres purinas poniendo adenosinas y guanósinas en diferentes posiciones (Sal-7 a Sal-12), sin embargo, no se observó una mejora adicional. Estos resultados sugieren que las nucleasas de *Salmonella* tienen una capacidad sorprendente para degradar adenosinas, y esta capacidad se reduce en presencia de guanósinas. Así, estos datos muestran que las sondas Sal-3 y Sal-5 (Figs. 2 y 3 asteriscos) que se modificaron con dos y tres adenosinas, respectivamente, son los candidatos más prometedores para seleccionar como diana *Salmonella*. Se realizaron estudios de sensibilidad y especificidad posteriores usando estas sondas.

### **Sensibilidad de las sondas de *Salmonella* candidatas**

Para evaluar la sensibilidad de las sondas candidatas, se realizó primero una curva de crecimiento para *Salmonella* Typhimurium (STM 14028) y *Salmonella* Enteritidis (SE 408). Para ello, se recogieron varias muestras de ambos cultivos de *Salmonella* en diferentes momentos de tiempo y se realizaron ensayos de microbiología y de actividad nucleasa. La Figura 4 muestra el número de  $\log_{10}$  Unidades formadoras de colonias ( $\log_{10}$  UFC) por ml que se determinó por análisis de microbiología y se representó frente al tiempo de recogida (Figura 4). Como resultado, se representaron las fases logarítmica, exponencial y estacionaria de ambos cultivos de *Salmonella*. Se observó el crecimiento bacteriano en ambos cultivos a las 2 horas. A continuación, se investigó determinar la sensibilidad que podía alcanzarse por el ensayo de actividad nucleasa. Por tanto, el ensayo se realizó en diferentes tiempos de crecimiento usando las sondas Parental, Sal-3 y Sal-5, como se indica en la Figura 5. En particular, ya

cultivos de 8 horas de *Salmonella* fueron capaces de promover la degradación de sondas, lo que indica que la actividad nucleasa ofrece una rápida respuesta que podría usarse para la detección de estas bacterias. Además, las sondas Sal-3 y Sal-5 fueron más eficientemente degradadas que la sonda Parental, mostrando la sonda

5 Sal-5 la sensibilidad más alta para *Salmonella* a las 8 horas, de acuerdo con la actividad nucleasa derivada de una carga bacteriana de  $5 \times 10^6$  UFC/ml. En particular, el tiempo necesario para realizar el ensayo de actividad nucleasa en estos experimentos fue 1 hora, lo que representa una gran mejora con respecto al método

10 de recuento de placas microbiológicas convencional que requiere 24 horas. En conjunto, estos resultados demuestran que este sistema va acompañado de una reducción significativa en el tiempo de detección, mientras que retiene una buena sensibilidad, lo que lo hace competitivo para un amplio rango de aplicaciones.

15

#### **Especificidad de las sondas de *Salmonella* candidatas**

Se analizó la especificidad de las sondas de *Salmonella* aumentando el número de bacterias control usadas en el cribado inicial. Se ensayó un conjunto de patógenos

20 (que se caracterizó previamente por IdAB, España) que normalmente se encuentran como contaminantes en productos alimentarios. La Figura 6 muestra el perfil de degradación de las sondas Parental, Sal-3 y Sal-5 que se incubaron con cultivos de *Salmonella* STM1 y SE1 y 20 sobrenadantes adicionales preparados a partir de 14 especies bacterianas diferentes como controles negativos. Se observó reactividad

25 cruzada con varios de los cultivos control testados. Cultivos bacterianos de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. aureus* han mostrado una señal de fondo significativa que podría limitar la aplicabilidad de esta tecnología en muestras reales. Para solucionar los problemas de reactividad cruzada, se realizó la optimización de las sondas de *Salmonella* aplicando varias condiciones que pueden modular la actividad nucleasa,

30 tales como: tiempo, agentes quelantes y cationes divalentes. Este proceso de optimización de sondas tiene como objetivo eliminar o reducir la actividad nucleasa no deseada y potenciar o mantener la actividad para nucleasas diana de *Salmonella*. La Figura 9 muestra la optimización de las sondas de *Salmonella* Sal-3 y Sal-5, usando diferentes tiempos de incubación (de 7,5 a 120 min, Figura 9), donde no se observaron

35 diferencias significativas en la señal de fluorescencia entre 15 y 120 min. A continuación, se probó la función de varios quelantes (EDTA, EGTA y NTA, Figura 10),

donde la actividad de las nucleasas de *Salmonella* estuvo claramente afectada por EDTA, pero no por los otros quelantes, sugiriendo la utilidad de EGTA y NTA para bloquear la actividad nucleasa de bacterias no específicas. Entonces, se evaluó el efecto de una variedad de cofactores divalentes ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , Figura 11). Se observó que  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  fueron cofactores esenciales para la actividad nucleasa. Como resultado de los datos de optimización, se llegó a la conclusión de que 15 min y la adición de EGTA son las condiciones que favorecen la actividad de nucleasas asociadas a *Salmonella*, pero no a otras bacterias. A continuación, se repitieron los estudios de especificidad utilizando las condiciones recién optimizadas para *Salmonella* (Figura 7). En particular, se observó una reducción significativa en la actividad nucleasa para todas las bacterias con reactividad cruzada. En conclusión, se identificó un conjunto de condiciones que pueden proporcionar velocidad de detección y especificidad para dirigirse a *Salmonella*.

#### 15 **Estudio de doble ciego usando muestras relevantes**

Para demostrar la utilidad de las dos sondas finales y las condiciones óptimas de la prueba de actividad nucleasa para detectar *Salmonella*, se diseñó un estudio de doble ciego para llevar a cabo en muestras previamente identificadas como positivas o negativas, por el procedimiento microbiológico estándar ISO6579:2002 Amd. 2007. Para evitar muestras falsas negativas, se seleccionaron muestras de BPW-MLN de una granja donde todos los cerdos analizados dieron negativo. Para este estudio, se usó sobrenadante de 30 muestras de ganglios linfáticos mesentéricos porcinos, la muestra estándar usada para determinar la presencia de *Salmonella* en muestras porcinas. Los ganglios linfáticos se extrajeron y se cultivaron como se indica en la sección de materiales y métodos. Para confirmar la presencia o ausencia de *Salmonella* en estas muestras, se llevaron a cabo tres análisis independientes del siguiente modo: i) se realizó análisis por PCR e identificación bioquímica por IdAB (Figura 12, Tabla 2, respectivamente), ii) se realizó análisis microbiológico con identificación de serotipo por el Laboratorio Nacional Español de Referencia (Tabla 2), y iii) se ensayó internamente la actividad nucleasa.

Tabla 2. Muestras de ganglios linfáticos mesentéricos y pruebas bioquímicas respectivas para la presencia de *Salmonella* y la consecuente determinación de los serotipos de *Salmonella*

Prueba bioquímica de <i>Salmonella</i>			
Nombre de la muestra	(IdAB)	Serovariedad de <i>Salmonella</i> (NRL)	
BPW 1	+	S. Typhimurium <u>1</u> ,4, [5], 12:i:1,2	
BPW 2	+	S. Typhimurium <u>1</u> ,4, [5], 12:i:1,2	
BPW 3	+	S. Typhimurium <u>1</u> ,4, [5], 12:i:1,2	
BPW 4	+	S. Typhimurium <u>1</u> ,4, [5], 12:i:1,2	
BPW 5	+	S. Typhimurium <u>1</u> ,4, [5], 12:i:1,2	
BPW 6	+	S. Typhimurium <u>1</u> ,4, [5], 12:i:-	
BPW 7	+	S. Typhimurium <u>1</u> ,4, [5], 12:i:1,2	
BPW 8	+	S. Typhimurium <u>1</u> ,4, [5], 12:i:1,2	
BPW 9	+	S. Typhimurium <u>1</u> ,4, [5], 12:i:1,2	
BPW 10	+	S. arizonae 48:z4,z23,z32:-	
BPW 11	+	S. Derby 4,12:f,g:-	
BPW 12	+	Enteritidis 9,12:g,m:-	
BPW 13	+	S. Bardo 8:e,h:1,2	
BPW 14	+	S. Typhimurium <u>1</u> ,4, [5], 12:i:1,2	
BPW 15	+	S. Typhimurium <u>1</u> ,4, [5], 12:i:1,2	
BPW 16-BPW30	-	NA	

- 5 Los resultados se compararon sin conocimiento previo de cada parte. La Figura 8 muestra los resultados obtenidos por tres técnicas diferentes. Y, lo que es más importante, el método descrito en el presente documento basado en la identificación de actividad nucleasa de cultivos de *Salmonella* usando las sondas anteriormente mencionadas, mostró el 100 % de correlación con las metodologías estándar de referencia (*gold standard methodologies*), tales como PCR, pruebas de microbiología y serotipificación. Estos sorprendentes resultados subrayan el enorme potencial de las sondas de *Salmonella* descritas en el presente documento y su aplicabilidad al análisis de muestras reales. En resumen, se han desarrollado sondas de oligonucleótidos con la gran capacidad de reconocer cultivos de *Salmonella* de un modo sensible y
- 10 específico. De forma interesante, se llevó a cabo el ensayo de actividad nucleasa en 15 min, en cultivos de 8 horas. Además, las sondas de oligonucleótidos descritas en el

presente documento tienen gran flexibilidad para ser incorporadas en dispositivos portátiles baratos que podrían proporcionar la detección *in situ* en menos de 8 horas.

#### 4. Lista de cepas y muestras de BPW-MLN utilizadas en este trabajo

5

La Tabla 3 a continuación muestra la lista de cepas y muestras de BPW-MLN utilizadas en este trabajo.

<b>Código</b>	<b>Características</b>
<b>Cepas de <i>Salmonella</i>:</b>	<b>Aislados de campo de cerdos de engorde:</b>
STM1	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 15981
STM2 a STM11	<i>S. Typhimurium</i> de diferentes animales
SE1 a SE11	<i>S. Enteritidis</i> de diferentes animales
S1	<i>S. Thyphimurium</i> monofásica
S2	<i>S. Abaetetuba</i>
S3	<i>S. Agona</i>
S4	<i>S. Amsterdam</i>
S5	<i>S. Anatum</i>
S6	<i>S. enterica</i> subesp. <i>arizonae</i>
S7	<i>S. Bardo</i>
S8	<i>S. Bovismobificans</i>
S9	<i>S. Braenderup</i>
S10	<i>S. Branderburg</i>
S11	<i>S. Bredeney</i>
S12	<i>S. Coeln</i>
S13	<i>S. Derby</i>
S14	<i>S. enterica</i> subesp. <i>diarizonae</i>
S15	<i>S. Gaminara</i>
S16	<i>S. Give</i>
S17	<i>S. Goldcoast</i>
S18	<i>S. Hadar</i>
S19	<i>S. Havana</i>
S20	<i>S. Infantis</i>
S21	<i>S. Indiana</i>
S22	<i>S. Kapemba</i>

S23	S. Kedogou
S24	S. Kottbus
S25	S. Lexington
S26	S. Livingstone
S27	S. London
S28	S. Meleagridis
S29	S. Mikawasirna
S30	S. Mishmarhaek
S31	S. Montevideo
S32	S. Muenchen
S33	S. Newport
S34	S. Nottingham
S35	S. Ohio aislada
S36	S. Oranienburg
S37	S. Poona
S38	S. Reading
S39	S. Rissen
S40	<i>S. enterica</i> subesp. <i>salamae</i>
S41	S. Szentes
S42	S. Tennessee
S43	S. Thompson
S44	S. Toulon
S45	S. Umbilo
S46	S. Urbana
S47	S. Wien
S48	6,7:-:1,5
S49	9.12:-:-
<b>Otras cepas que no son <i>Salmonella</i> (NS):</b>	<b>Aislados de campo de cerdos de engorde:</b>
NS1 a NS5	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25981 y otras 4 cepas aisladas de muestras de alimentos y cerdos de engorde
NS6	<i>Enterococcus faecalis</i> aislada de cerdos de engorde
NS7 y NS8	<i>Hafnia alvei</i> aislada del entorno del cerdo

NS9	<i>Moellerella wisconsensis</i> aislada de muestras de alimentos
NS10	<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i> aislada de muestras de alimentos
NS11 y NS12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> aislada de cerdos de engorde
NS13	<i>Proteus mirabilis</i> aislada de cerdos de engorde
NS14	<i>Providencia rustigianii</i> aislada de muestras de alimentos
NS15	<i>Proteus vulgaris</i> aislada de cerdos de engorde
NS16 y NS17	<i>Staphylococcus aureus</i> aislada de muestras de alimentos
NS18	<i>Serratia liquefaciens</i> aislada del entorno del cerdo
NS19	<i>Streptococcus pyogenes</i> aislada de muestras de alimentos
NS20	<i>Klebsiella pneumoniae</i> aislada de muestras de alimentos
<b>Muestras de BPW-MLN:</b>	Alícuotas de 1 ml de BPW con muestras de ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) de cerdos de engorde previamente cultivadas (37 °C, 24 h) según ISO 6579:2002 Amd. 2007 y mantenidas congeladas a -20 °C.
BPW-MLN1 a BPW-MLN10	Muestras positivas para <i>S. Typhimurium</i> por ISO 6579:2002 y PCR-InvA
BPW-MLN11	<i>S. Typhimurium</i> monofásica
BPW-MLN12	<i>S. enterica</i> subesp. <i>arizonae</i>
BPW-MLN13	<i>S. Derby</i>
BPW-MLN14	<i>S. Enteritidis</i>
BPW-MLN15	<i>S. Bardo</i>
BPW-MLN16 a BPW-MLN30	Muestras negativas para <i>Salmonella</i> por ISO 6579:2002 y PCR-InvA

## REIVINDICACIONES

1. Una sonda de ácido nucleico que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 25.  
5
2. La sonda de ácido nucleico según la reivindicación 1, que consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionada de la lista que consiste en: SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19.
- 10 3. La sonda de ácido nucleico según la reivindicación 2, que consiste en la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19.
4. La sonda de ácido nucleico según la reivindicación 3, que consiste en la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 17, preferiblemente  
15 SEQ ID NO: 17.
5. La sonda de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además un fluoróforo ligado a su extremo 5' y/o un supresor ligado a su extremo 3'.  
20
6. La sonda de ácido nucleico según la reivindicación 5, que comprende además un fluoróforo ligado a su extremo 5' y un supresor ligado a su extremo 3'.
7. La sonda de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6,  
25 donde el fluoróforo es FAM y el supresor es TQ2.
8. Un kit que comprende la sonda de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 30 9. El kit según la reivindicación 8, que comprende las sondas de ácido nucleico que consisten en las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 19.
- 35 10. El kit según la reivindicación 9, que comprende las sondas de ácido nucleico que consisten en las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 17, preferiblemente SEQ ID NO: 17.

11. El kit según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que comprende además EGTA y/o NTA, preferiblemente EGTA.
- 5 12. El kit según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, que comprende además cationes divalentes seleccionados de la lista que consiste en:  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  o cualquier combinación de los mismos.
- 10 13. El kit según la reivindicación 12, que comprende los cationes divalentes  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ .
14. Uso de la sonda de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o del kit según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13 para la detección *in vitro* de *Salmonella* en muestras.
- 15 15. Uso según la reivindicación 14, donde *Salmonella* es *Salmonella* Typhimurium o *Salmonella* Enteritidis.
- 20 16. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 15, donde las muestras son muestras de alimentos o muestras biológicas aisladas de un animal.
17. Uso según la reivindicación 16, donde el animal es un cerdo o aves de corral.
18. Uso según la reivindicación 16, donde las muestras de alimentos son carne, 25 huevos, leche, queso, verduras, frutos secos o semillas.
19. Un método *in vitro* para la detección de *Salmonella* en muestras que comprende:
- 30 a. Poner en contacto la muestra que va a analizarse con la sonda de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o el kit según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13,
- b. incubar la mezcla de la etapa (a) bajo condiciones que permitan la degradación de la sonda de ácido nucleico por la actividad nucleasa de *Salmonella*,
- c. detectar la degradación de la sonda de ácido nucleico, y
- 35 d. asignar la muestra al grupo de muestras que comprenden *Salmonella* cuando se ha detectado una degradación de la sonda de ácido nucleico en la etapa (c).

20. El método *in vitro* según la reivindicación 19, donde la detección de la degradación de la sonda de ácido nucleico en la etapa (c) se realiza por medio de medición de la intensidad de fluorescencia.

5

21. El método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 19 o 20, donde las condiciones que permiten la degradación de la sonda de ácido nucleico por la actividad nucleasa de *Salmonella* en la etapa (b) son la incubación durante 15 min en presencia de EGTA y/o NTA, preferiblemente EGTA, y cationes divalentes seleccionados de la lista que consiste en: Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> o Mn<sup>2+</sup> o cualquier combinación de los mismos.

10

22. El método *in vitro* según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, donde *Salmonella* es *Salmonella* Typhimurium o *Salmonella* Enteritidis.

15

23. El método *in vitro* según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, donde las muestras son muestras de alimentos o muestras biológicas aisladas de un animal.

24. El método *in vitro* según la reivindicación 23, donde el animal es un cerdo o aves de corral.

20

25. El método *in vitro* según la reivindicación 23, donde las muestras de alimentos son carne, huevos, leche, queso, verduras, frutos secos o semillas.

FIG. 1

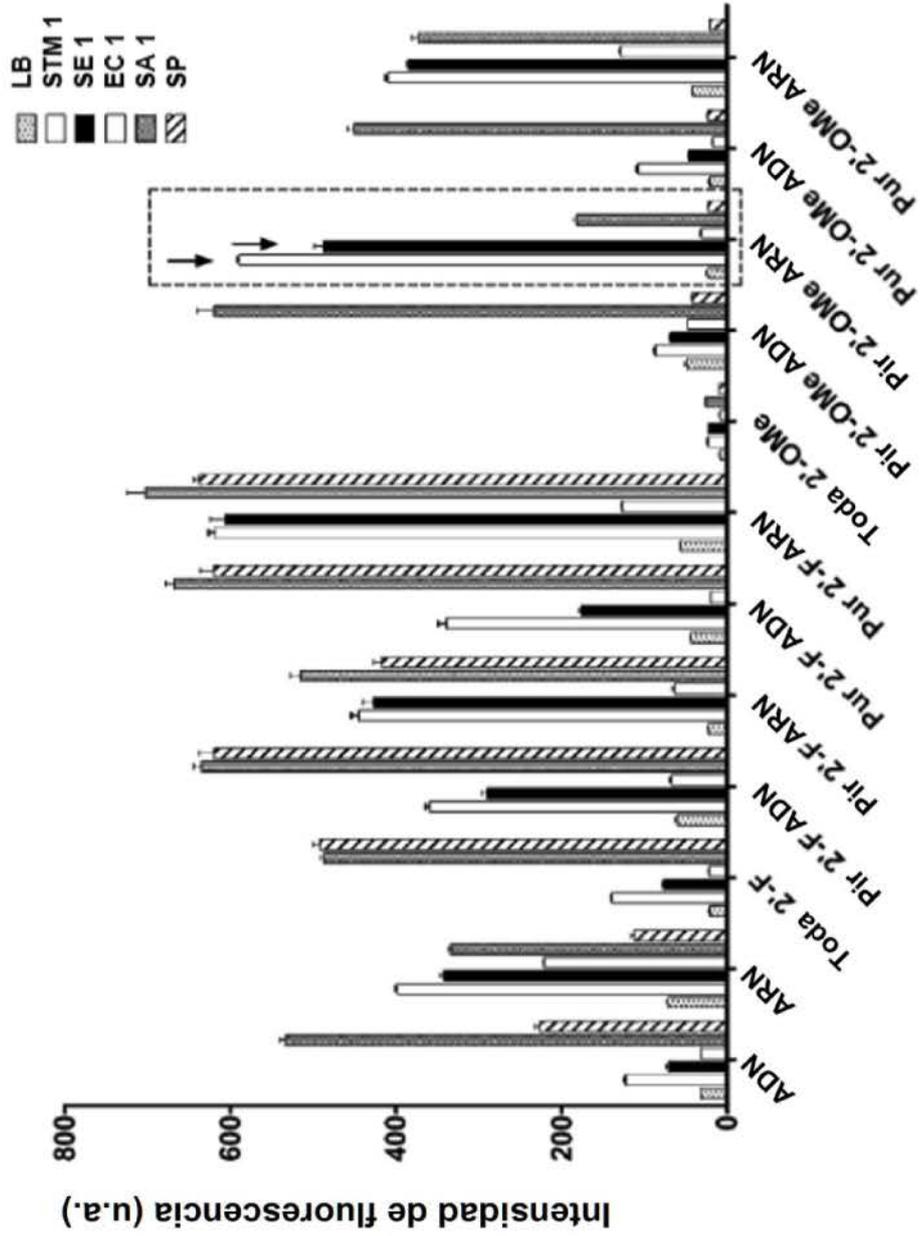


FIG. 2

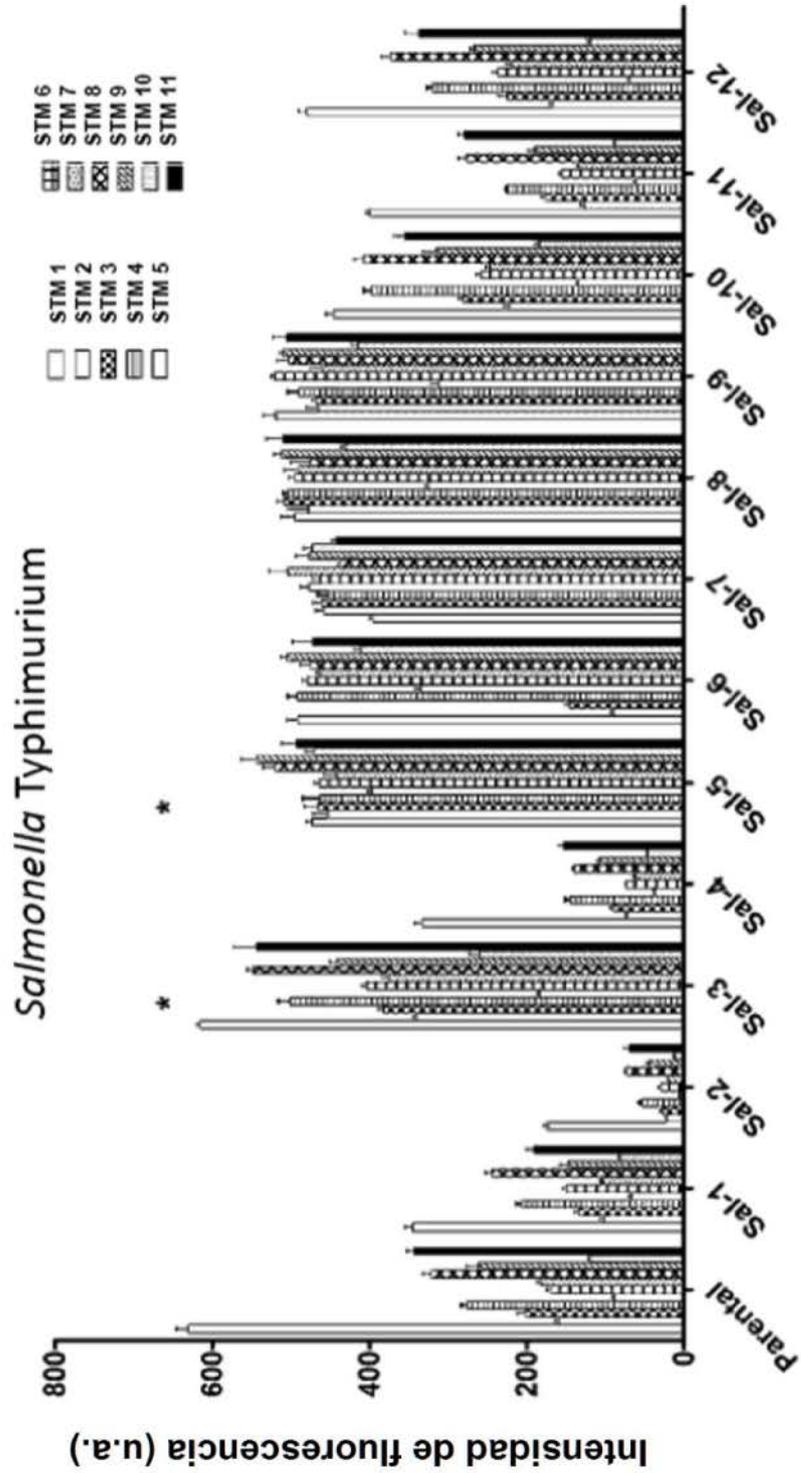


FIG. 3

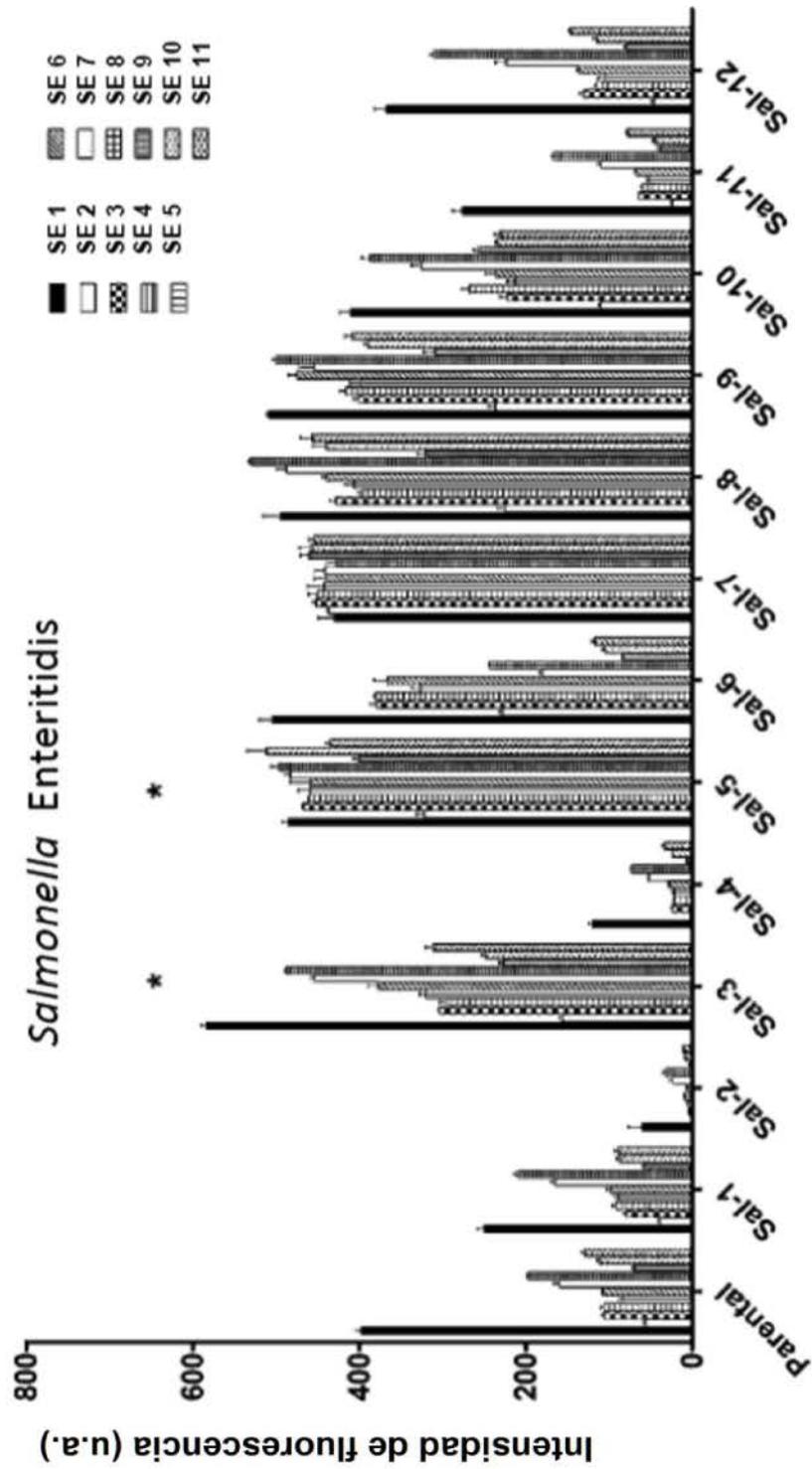
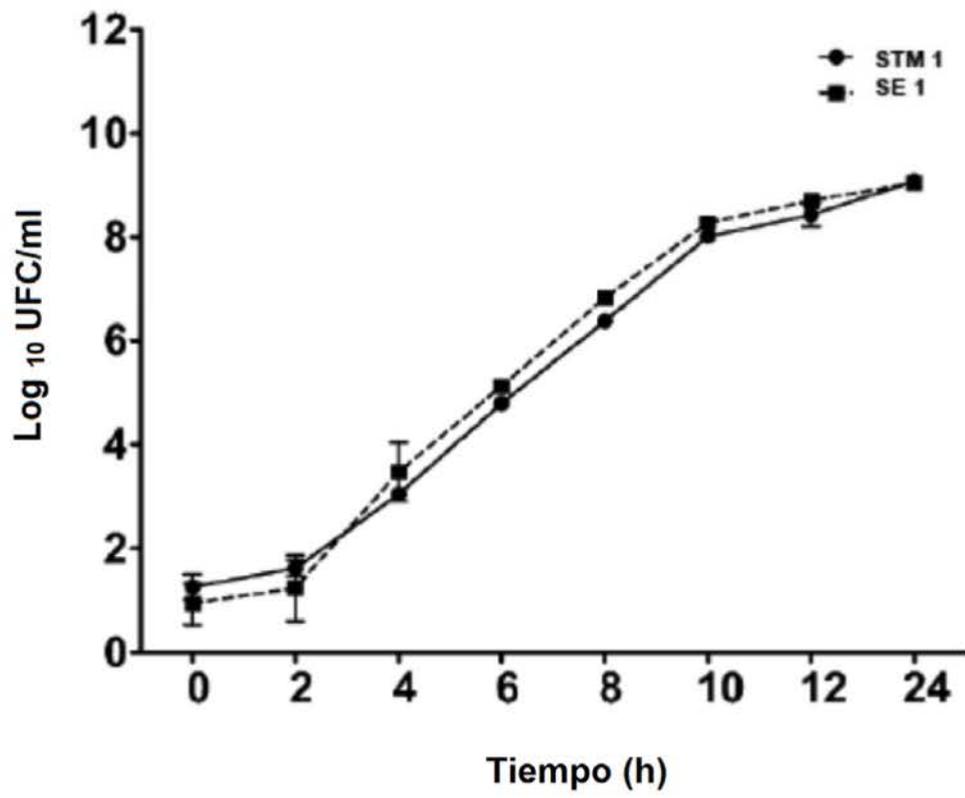


FIG. 4



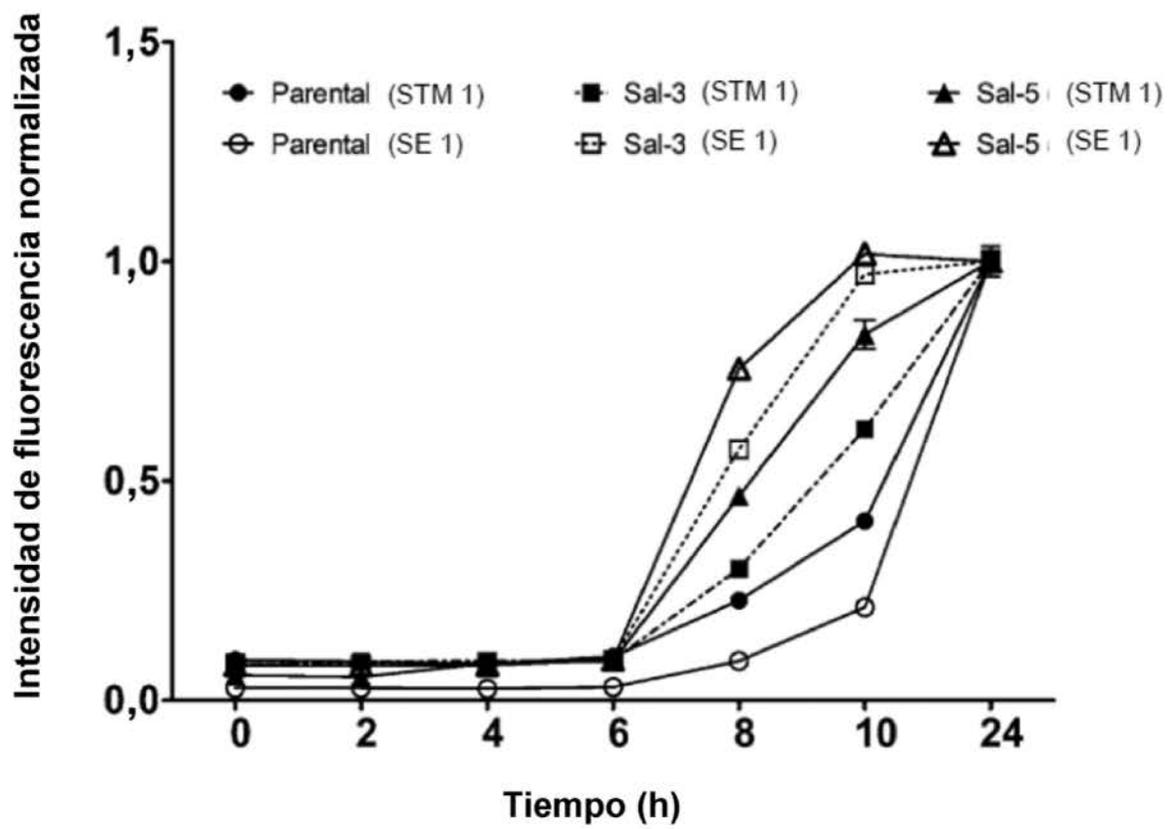


FIG. 5

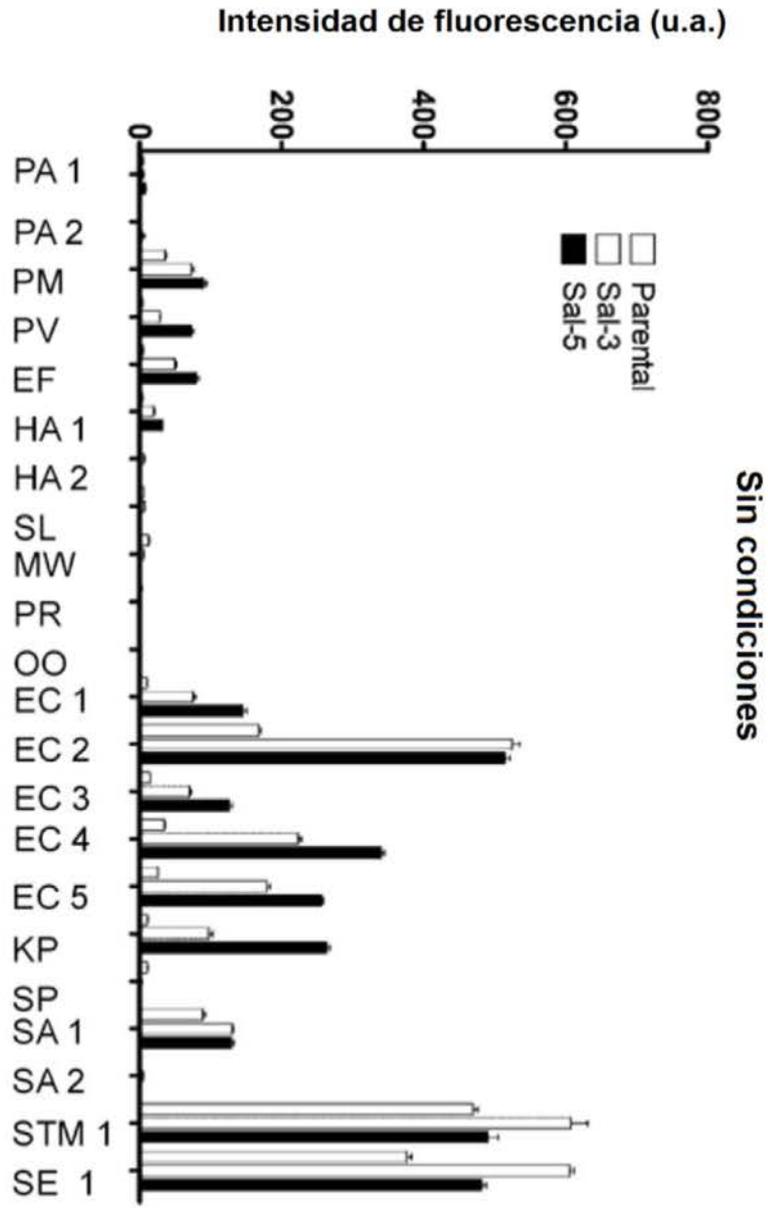


FIG. 6

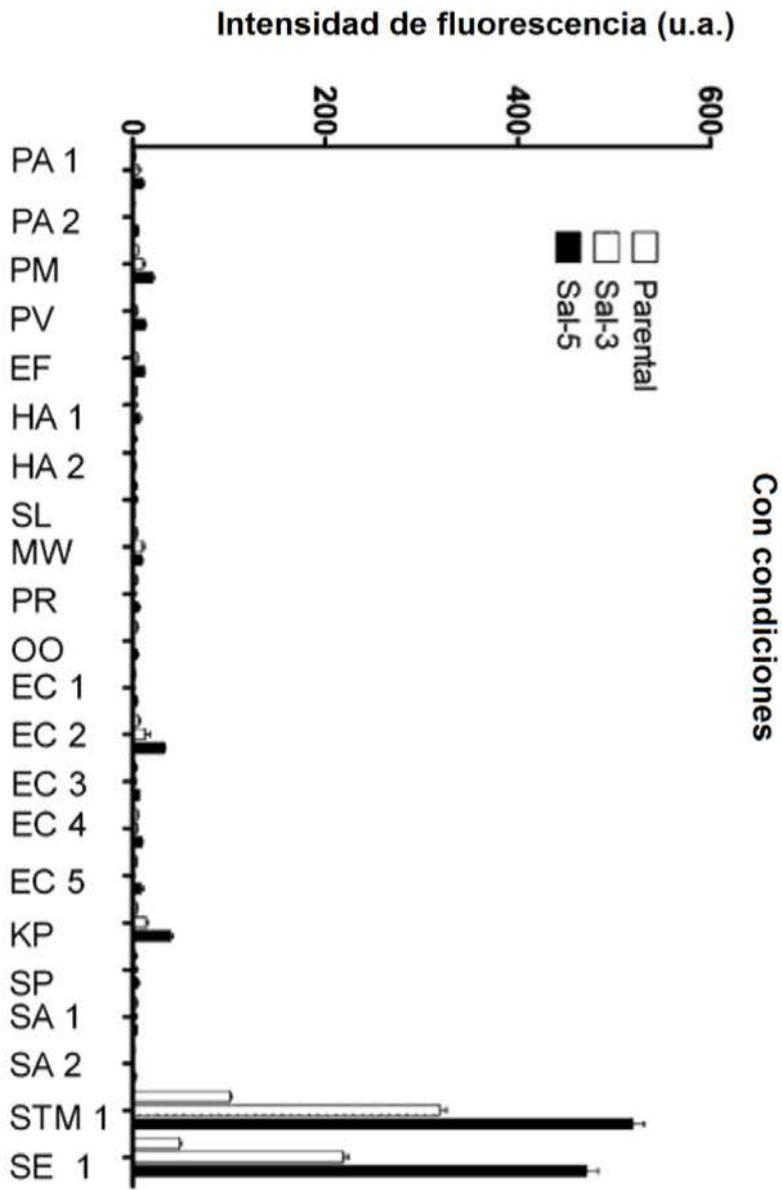


FIG. 7

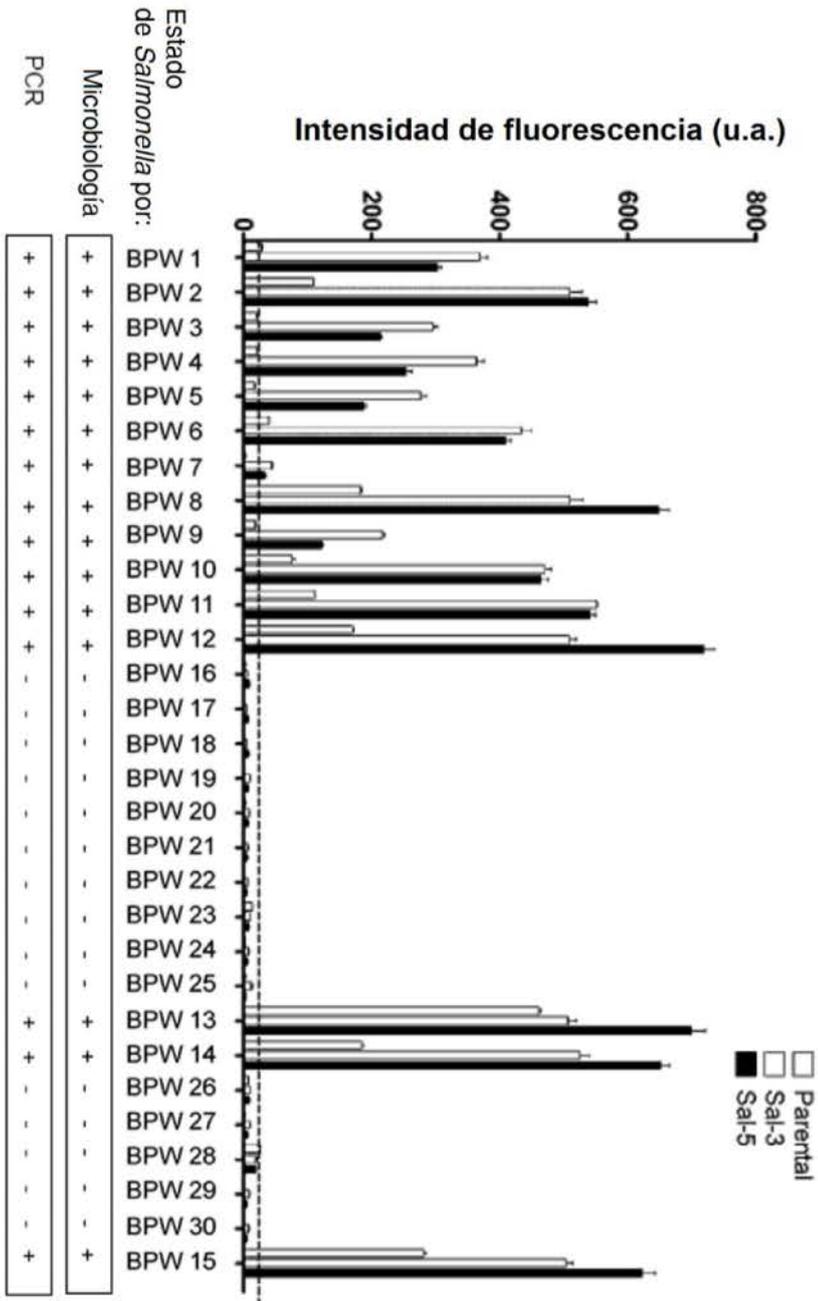


FIG. 8

FIG. 9

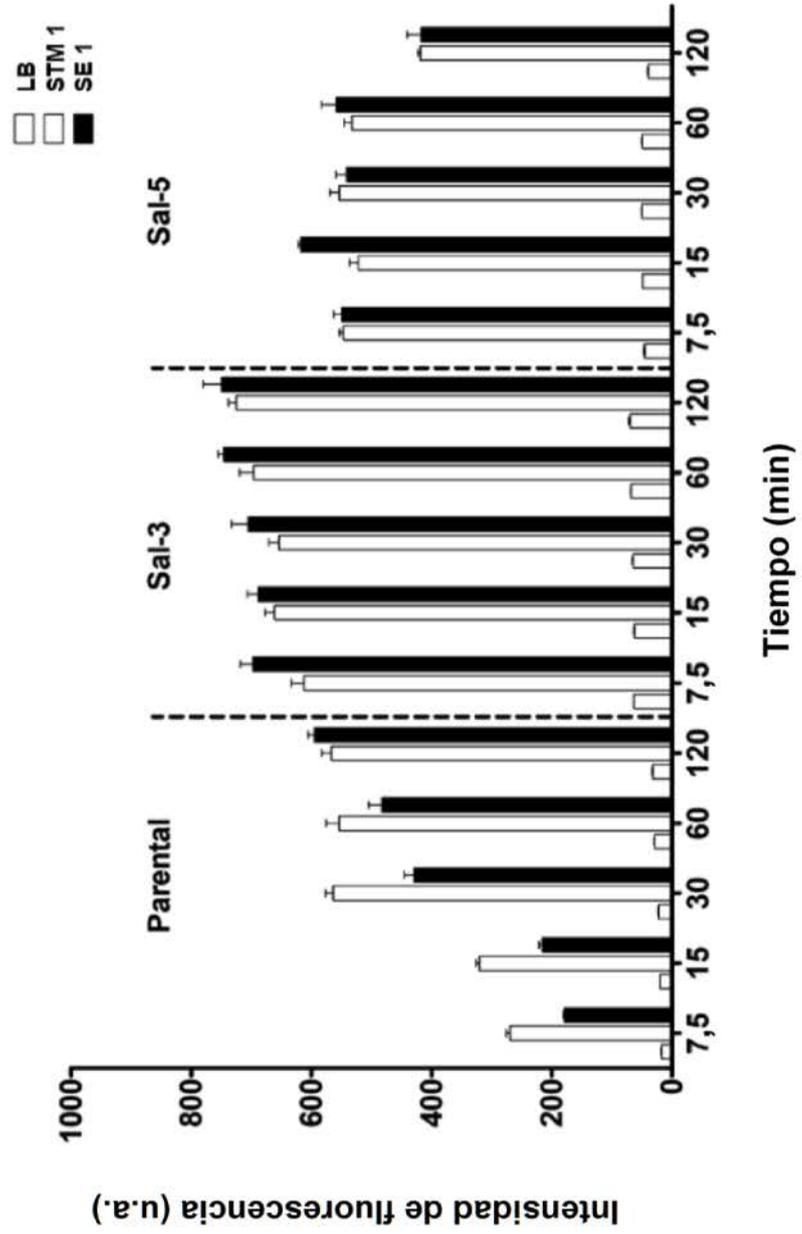
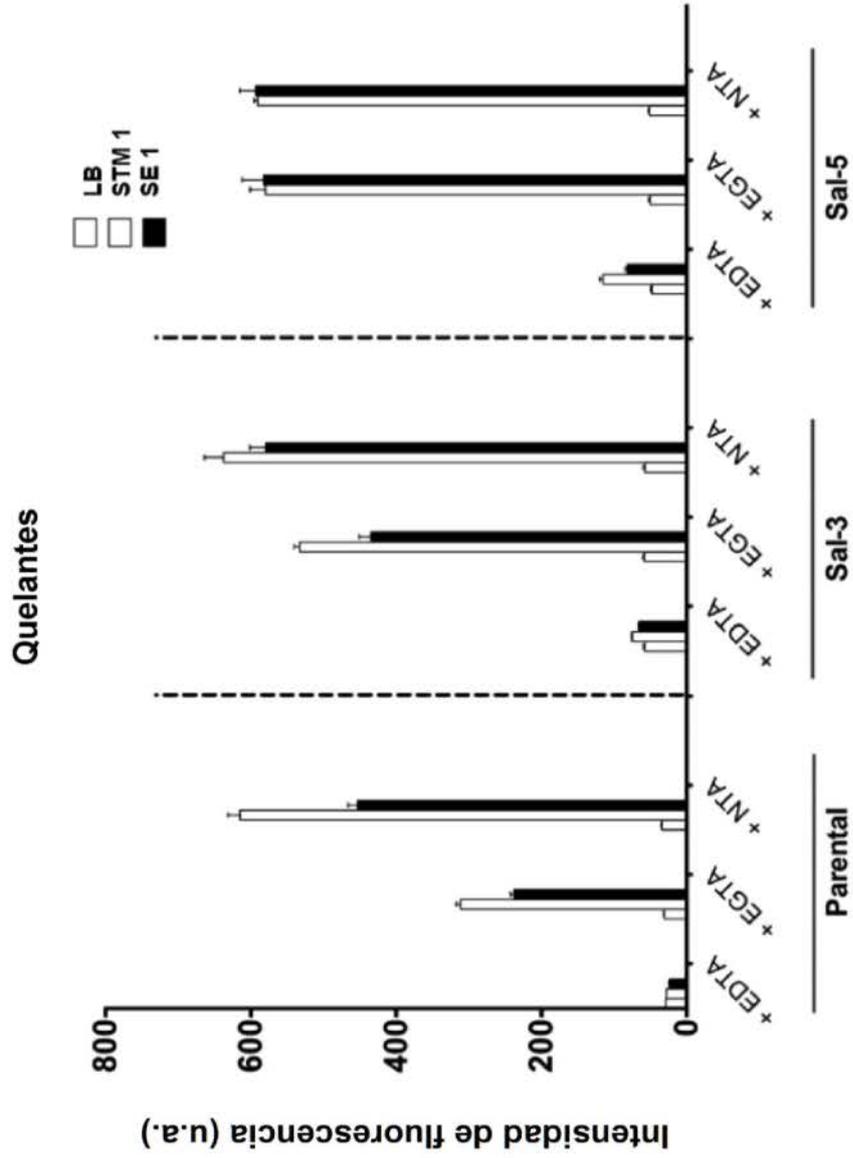
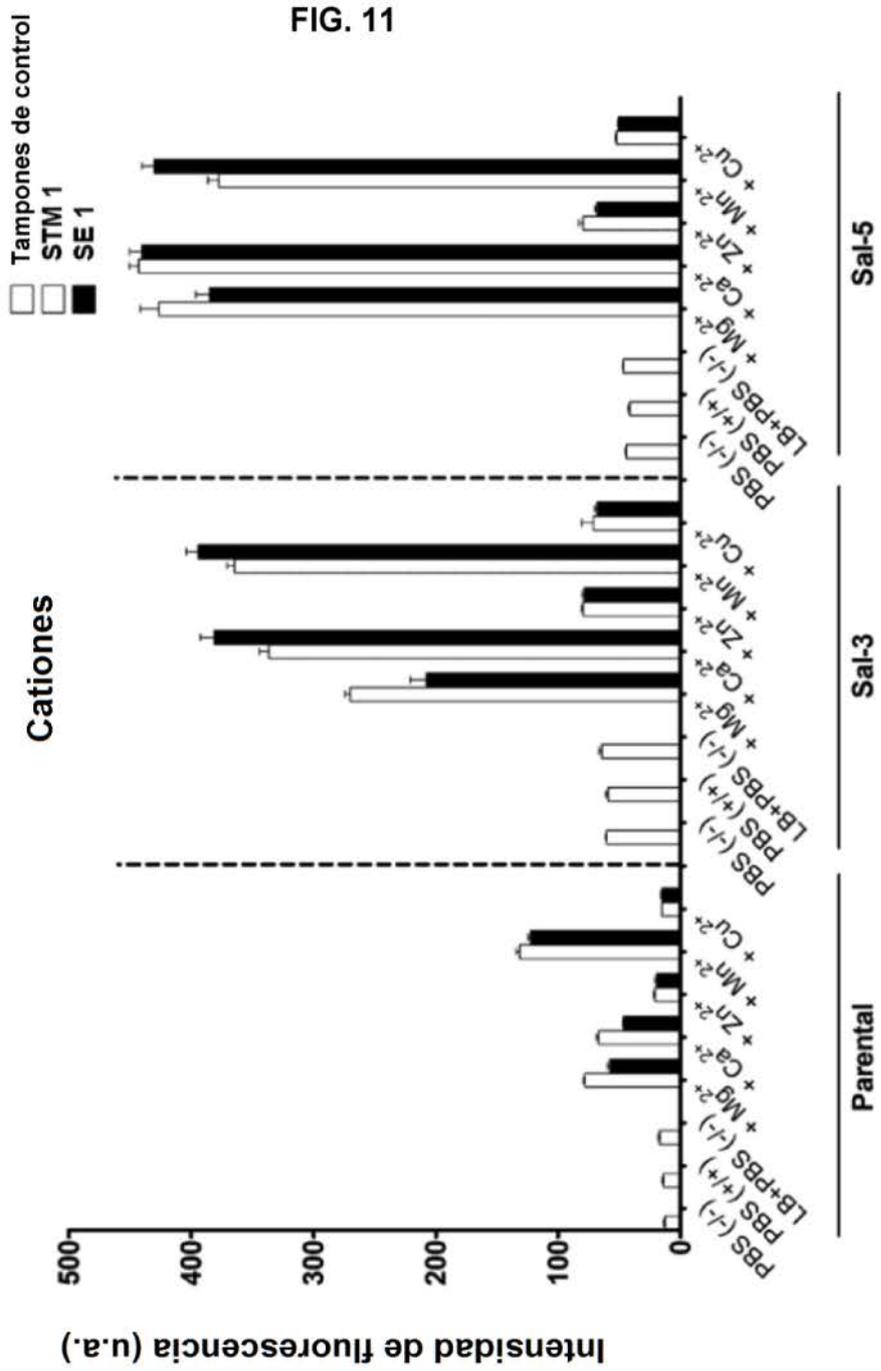


FIG. 10





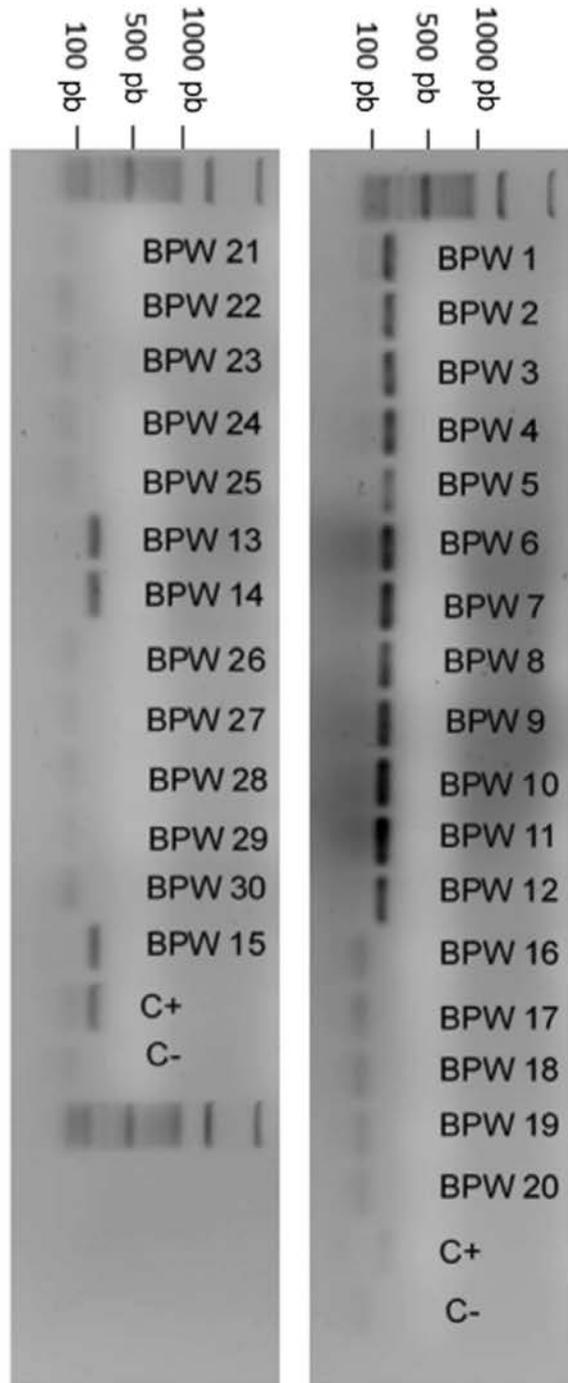
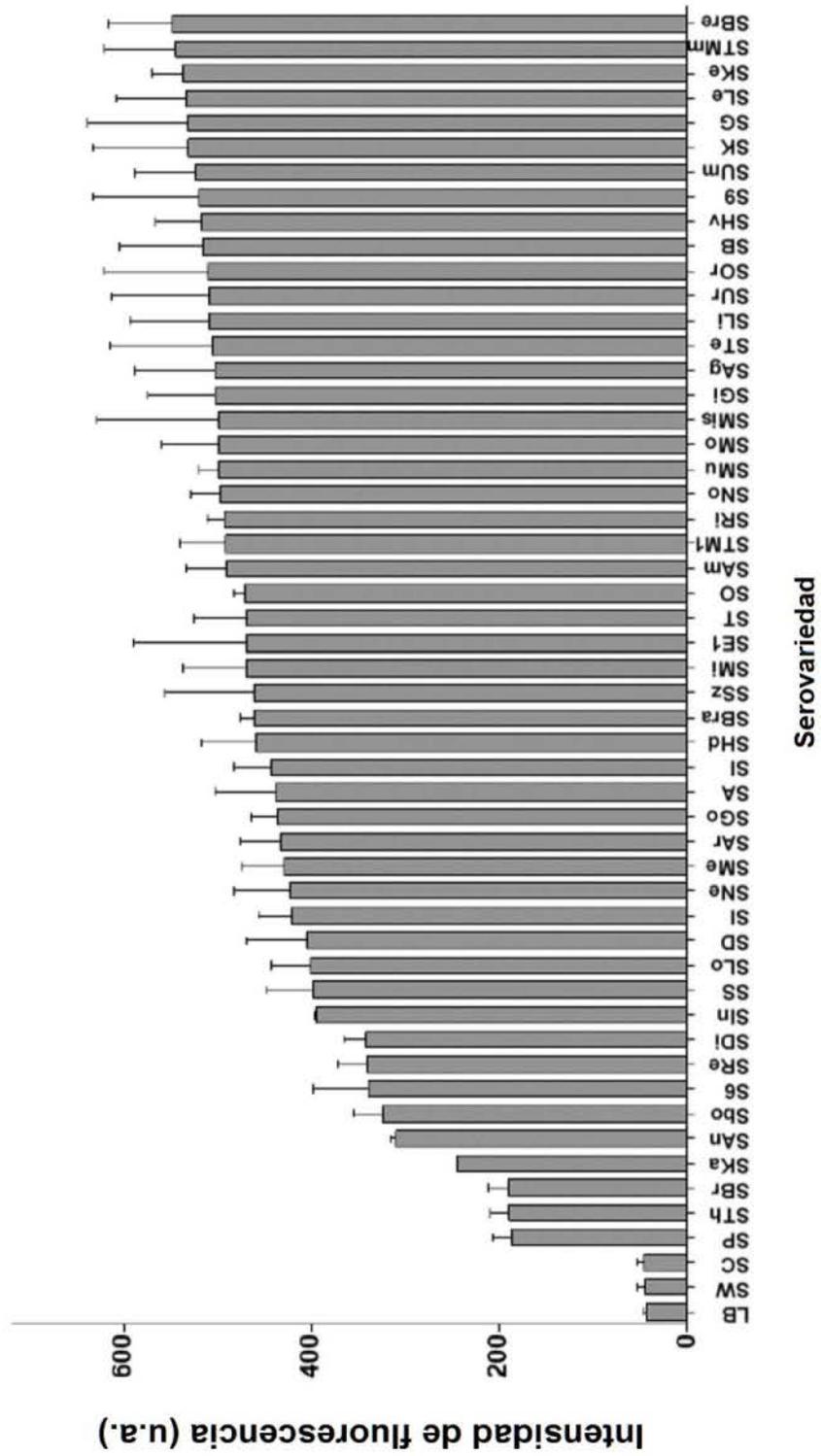


FIG. 12

FIG. 13





- ②① N.º solicitud: 201830206  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 02.03.2018  
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X A	US 2014/0199245 A1 (McNAMARA, J. O. II et al.) 17/07/2014, ejemplo 4, SEQ ID NO: 11.	1, 2, 5 - 7 3, 4, 8 - 10, 12 - 14, 16 - 21, 23 - 25
A	WO 2016/163781 A1 (BIONANO HEALTH GUARD RES CENTER) 13/10/2016, ejemplos 1, 3, 4, 5.2.	1-10, 14, 16-20, 23-25
A	SATO, S. et al. Highly sensitive nuclease assays based on chemically modified DNA or RNA. Sensors. Julio 2014, Vol. 14, Nº 7, páginas 12437 - 12450, <DOI: 10.3390/s140712437>. Especialmente páginas 12439, 12441, 12444, 12445.	1 - 10, 16 - 20, 23 - 25
A	BELL, R. L. et al. Recent and emerging innovations in <i>Salmonella</i> detection: a food and environmental perspective. Microbial Biotechnology. Mayo 2016, Vol. 9, Nº 3, páginas 279 - 292, ISSN 1751-7915 (impreso), ISSN 1751-7915 (electrónico), <DOI:10.1111/1751-7915.12359>. Todo el documento.	14 - 25

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  
19.12.2018

Examinador  
E. Relaño Reyes

Página  
1/2

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12Q1/44** (2006.01)

**C12Q1/689** (2018.01)

**C12R1/42** (2006.01)

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

C12Q, C12R

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

INVENES, EPODOC, PATENW, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, XPESP, INSPEC, COMPDX, NPL, XPOAC, REGISTRY, HCAPLUS, DGENE, EM\_REL, NRNL1, EM\_REL\_SYN