

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
1 de Noviembre de 2007 (01.11.2007)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2007/123386 A1

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/MX2007/000052
- (22) Fecha de presentación internacional:
19 de Abril de 2007 (19.04.2007)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
NL/a/2006/000028
24 de Abril de 2006 (24.04.2006) MX
- (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
SIGMA ALIMENTOS, S.A. DE C.V. [MX/MX]; Ave.
Gómez Morán 1111, Co. Carrizalejo, C.P. 66254, San Pe-
dro Garza García, Nuevo León (MX).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **GARZA
GONZÁLEZ, Elvira** [MX/MX]; Valle de Aguayo 217,
Col. Valle del Contry, C.P. 67174, Guadalupe, Nuevo
León (MX). **BOSQUES PADILLA, Francisco Javier**
[MX/MX]; Alejandro Dumas 210, Col. Colinas de San
- Jerónimo, C.P. 64630, Monterrey, Nuevo León (MX).
MORENO CAMPAÑA, Victor Manuel [MX/MX];
Columbia 416, Col. Residencial Cumbres, C.P. 64619,
Monterrey, Nuevo León (MX).
- (74) Mandatario: **GARCÍA LÓPEZ, César**; Zaachila 156,
Residencial Los Pinos, C.P. 25198, Saltillo Coahuila (MX).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ,
LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV,
SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible): ARIPO
(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,
RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: METHOD FOR DETECTION AND MULTIPLE, SIMULTANEOUS QUANTIFICATION OF PATHOGENS BY
MEANS OF REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION

(54) Título: MÉTODO PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN MÚLTIPLE Y SIMULTÁNEA DE PATÓGENOS ME-
DIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL

(57) Abstract: A method for the detection and multiple, simultaneous quantification of any combination of *Listeria* sp., *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* and/or *Escherichia coli* O157.-H7, in one or more test samples, by multiplex amplification reaction, using real-time polymerase chain reaction (PCR). The steps in the method are: (a) extracting DNA from the test sample or samples; (b) preparing a reaction mixture specific for the pathogens to be detected and quantified, such that the reaction mixture contains the necessary reagents for enzymatic amplification of the extracted DNA and identification of the pathogens to be detected and quantified; (c) amplifying the reaction mixture by means of multiplex amplification reaction using PCR; and (d) simultaneously determining the presence or absence of and quantification of the pathogens in the test sample or samples. The method has the special feature that (i) the reaction mixture for enzymatic amplification of the DNA has sets of pairs of oligonucleotide primers identified as SEQ ID No. 1 and SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 4 and SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7 and SEQ ID No. 8, and SEQ ID No. 10 and SEQ ID No. 11, and probes with oligonucleotide sequences identified as SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 9 and SEQ ID No. 12; (ii) the presence or absence of and quantification of said pathogens in any combination is determined by means of a fluorescent signal or fluorescence emission specific for each pathogen.

(57) Resumen: Un método para la detección y cuantificación múltiple y simultánea de cualquier combinación de *Listeria* sp, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y/o *Escherichia coli* O157.-H7, en una o más muestras de ensayo mediante reacción de amplificación múltiple empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, los pasos del método son (a) extraer ADN presente en la muestra o muestras de ensayo; (b) preparar una mezcla de reacción específica para los patógenos a detectar y cuantificar, tal que la mezcla de reacción contiene los reactivos necesarios para la amplificación enzimática del ADN extraído e identificación de los patógenos a detectar y cuantificar; (c) amplificar, mediante reacción de amplificación múltiple empleado PCR, la mezcla de reacción; y (d) determinar simultáneamente la presencia o ausencia y cuantificación de los patógenos en la muestra o muestras de ensayo; el método tiene la particularidad de que (i) la mezcla de reacción para la amplificación enzimática del ADN cuenta juegos de pares de iniciadores oligonucleótidos identificados como SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, y SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11, y sondas con secuencias oligonucleótidas identificadas como SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 12; (ii) la presencia o ausencia y cuantificación de dichos patógenos en cualquier combinación se determina por una señal fluorescente o emisión de fluorescencia específica de cada patógeno.

WO 2007/123386 A1



EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- *con informe de búsqueda internacional*
- *con la parte de lista de secuencias de la descripción publicada separadamente en forma electrónica y disponible por medio de la Oficina Internacional previa petición*

Declaraciones según la Regla 4.17:

- *sobre el derecho del solicitante para solicitar y que le sea concedida una patente (Regla 4.17(ii))*
- *sobre la calidad de inventor (Regla 4.17(iv))*

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

**MÉTODO PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN MÚLTIPLE Y SIMULTÁNEA
DE PATÓGENOS MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN
TIEMPO REAL**

5 **CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION**

La presente invención se relaciona, en general, con la detección, identificación y cuantificación de bacterias patógenas, y particularmente a un método para la detección y cuantificación múltiple de cualquier combinación de patógenos, tales como
10 *Listeria sp*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y/o *Escherichia coli* O157:H7, mediante reacción de amplificación múltiple empleando la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

En la actualidad, la detección de bacterias patógenas transmisibles por alimentos, tales como *Listeria sp*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli* O157:H7, constituye una tarea muy importante en el campo de la medicina y de la higiene pública y tiene mucho interés en la industria agroalimentaria,
20 tanto la productora como la distribuidora de productos alimenticios (materias primas y/o productos elaborados), por lo que se han descrito diversos métodos para sus detección e identificación.

Una de las metodologías actuales, consideradas entre las más efectivas para la
25 detección, cuantificación e identificación de patógenos, es aquella que se basa en técnicas moleculares, como lo es el método de reacción en cadena de la polimerasa, comúnmente conocido como PCR. El procedimiento PCR generalmente es considerado como la metodología más sensible y rápida empleada para detectar ácidos nucleicos

de patógenos en una determinada muestra de ensayo en particular, y la podemos encontrar descrita dentro del estado de la técnica por Kary B. Mullis *et al.* en la familia de patentes estadounidenses US-4683195, US-4683202, US-4800159, US-4889818, US-4965188, US-5008182, US-5038852, US-5079352, US-5176995, US-5310652, US-5310893, US-5322770, US-5333675, US-5352600, US-5374553, US-5386022, US-5405774, US-5407800, US-5418149, US-5420029 entre otras.

Para llevar a cabo la técnica PCR, básicamente se tiene que contar con al menos un par de iniciadores oligonucleótidos para cada uno de los patógenos a identificar, tal que cada par de iniciadores comprenden una primera secuencia nucleótida complementaria a una secuencia que linda con el extremo 5' de una secuencia de ácido nucleico objetivo y una segunda secuencia nucleótida complementaria a una secuencia que linda con el extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico objetivo. Las secuencias de nucleótidos deben tener cada par de iniciadores de oligonucleótidos que son específicos al patógeno a detectar, de tal manera que no reaccionen o se crucen con otros patógenos.

Al ser la técnica PCR un método sensible y rápido para detectar patógenos en forma individual, esta también se puede emplear para detectar simultáneamente múltiples patógenos presentes en una muestra. Sin embargo, emplear la metodología PCR para la detección simultánea de múltiples patógenos en una muestra tiene su problemática, pues su principal obstáculo radica en la reacción cruzada que se pueda presentar debido al empleo de múltiples secuencias de nucleótidos a fin de tener la amplificación preferencial de ciertas secuencias objetivo presentes en la muestra a expensas de otras secuencias objetivo también presentes.

Ejemplos de aplicaciones de detección múltiple y simultánea de patógenos, empleando la metodología de PCR, son descritas por John W. Czajka en la publicación

de solicitud de patente internacional WO-0314704, y por Linxian Wo y otros en la familia de patentes estadounidenses US-5612473, US-5738995, US-5753444, US-5756701 y US-5846783.

5 En la publicación de solicitud de patente internacional WO-0314704 se describe un método para detectar específica y simultáneamente especies patógenas de *Campylobacter* en una muestra de ensayo compleja. Las especies patógenas de *Campylobacter* a detectar pueden ser *Campylobacter jejuni* o *Campylobacter coli*. La muestra de ensayo compleja puede ser una muestra de alimento, agua o una matriz
10 enriquecida de alimento. El método utiliza la amplificación PCR con o sin un control positivo interno y pares apropiados de iniciadores. Múltiples especies pueden ser detectadas en la misma reacción.

Mientras que en la familia de patentes estadounidenses US-5612473, US-
15 5738995, US-5753444, US-5756701 y US-5846783 se describe un método PCR múltiplex para detectar rápida y simultáneamente agentes infecciosos en una muestra. Los agentes infecciosos detectados son *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Campylobacter spp*, *Yersinia spp* y *Escherichia coli* en particular *Escherichia coli* O157:H7. La limitante del método descrito en estas patentes es que permite una
20 reacción cruzada mínima entre los oligonucleótidos y sondas, así como de estos con otras secuencias de ácido nucleico durante la amplificación.

De otros métodos moleculares que se emplean actualmente, existen algunos comercializados para detectar patógenos en alimentos, unos mediante hibridación de
25 ADN (Gene-Trak systems, Unipath), que es muy sensible pero requiere de aproximadamente 50 h, y otros mediante amplificación de ácidos nucleicos (BAX, FOMS Dupont y Probelia, Sanofi Diagnostic Pasteur) que requieren, al menos, 24 h.

Ninguno de dichos métodos proporciona resultados en el mismo día de la producción del alimento ni realizan una cuantificación de la contaminación patógena presente.

De los métodos antes descritos, en algunos casos será necesario sólo aumentar la sensibilidad del método para detectar de forma fiable y rápida la presencia o ausencia de patógenos en particular, mientras que, en otros casos será necesario, además, cuantificar los patógenos eventualmente presentes con el fin de establecer los límites de concentración a partir de los cuales la presencia del patógeno puede presentar un problema para la salud del consumidor.

10

En vista de lo anterior, es de sumo interés para la industria de alimentos y de la salud contar con un método rápido, que emplee menos de 5 h, para detectar y cuantificar simultáneamente cuatro de los más importantes agentes infecciosos o patógenos transmisibles por alimentos y/o por superficies ambientales contaminadas, como lo son *Listeria sp*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli* O157:H. Esta detección y cuantificación múltiple, simultánea y rápida de patógenos, mediante reacción de amplificación múltiple empleando la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, permitirá ahorrar costos y tiempo en una industria en donde los tiempos de anaquel de los productos son extremadamente cruciales.

20

SUMARIO DE LA INVENCION

En vista de lo anteriormente descrito y con el propósito de dar solución a las limitantes encontradas, es objeto de la invención ofrecer un método para la detección y cuantificación múltiple y simultánea de cualquier combinación de patógenos, tales como *Listeria sp*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y/o *Escherichia coli* O157:H7, en una o más muestras de ensayo mediante reacción de amplificación

múltiplex empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, los pasos del método son (a) extraer ADN presente en la muestra o muestras de ensayo; (b) preparar una mezcla de reacción específica para los patógenos a detectar y cuantificar, tal que la mezcla de reacción contiene los reactivos necesarios para la

5 amplificación enzimática del ADN extraído e identificación de los patógenos a detectar y cuantificar; (c) amplificar, mediante reacción de amplificación múltiplex empleado PCR, la mezcla de reacción; y (d) determinar simultáneamente la presencia o ausencia y cuantificación de los patógenos en la muestra o muestras de ensayo; el método tiene la particularidad de que (i) la mezcla de reacción para la amplificación enzimática

10 del ADN extraído e identificación de cualquier combinación de *Listeria sp*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y/o *Escherichia coli O157:H7* a detectar y cuantificar contiene (a) un primer par de iniciadores oligonucleótidos identificados como SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 y una sonda identificada como SEQ ID NO: 3 que reaccionan con una primera secuencia objetivo de ácido nucleico de *Listeria sp*; (b) un

15 segundo par de iniciadores oligonucleótidos identificados como SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 y una sonda identificada como SEQ ID NO: 6 que reaccionan con una segunda secuencia objetivo de ácido nucleico de *Staphylococcus aureus*; (c) un tercer par de iniciadores oligonucleótidos identificados como SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 y una sonda identificada como SEQ ID NO: 9 que reaccionan con una tercera secuencia

20 objetivo de ácido nucleico de *Campylobacter jejuni*; y/o (d) un cuarto par de iniciadores oligonucleótidos identificados como SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11 y una sonda identificada como SEQ ID NO: 12 que reaccionan con una cuarta secuencia objetivo de ácido nucleico de *Escherichia coli O157:H7*; (ii) la presencia o ausencia y cuantificación de dichos patógenos en cualquier combinación de *Listeria sp*,

25 *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y/o *Escherichia coli O157:H7* en la muestra o muestras de ensayo se determina por una señal fluorescente o emisión de fluorescencia específica de cada producto amplificado.

Otro objeto de la presente invención es ofrecer un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo formado por las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3.

5 Es también objeto de la invención ofrecer un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo formado por las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.

Otro objeto de la invención es un oligonucleótido que tiene una secuencia de
10 nucleótidos seleccionada del grupo formado por las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9.

Es también objeto de la invención ofrecer un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo formado por las secuencias
15 identificadas como SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12.

Aunado a lo anterior es también objeto de la invención ofrecer una sonda marcada que comprende un oligonucleótido identificado como SEQ ID NO: 3; y al menos un marcador.
20

Otro objeto de la invención es ofrecer una sonda marcada que comprende un oligonucleótido identificado como SEQ ID NO: 6; y al menos un marcador.

Es también objeto de la invención una sonda marcada que comprende un
25 oligonucleótido identificado como SEQ ID NO: 9; y al menos un marcador.

Otro objeto de la invención es ofrecer una sonda marcada que comprende un oligonucleótido identificado como SEQ ID NO: 12; y al menos un marcador.

Finalmente es objeto de la invención ofrecer un juego de diagnóstico para la detección y cuantificación múltiple y simultánea de cualquier combinación de patógenos, tales como *Listeria sp*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y/o

5 *Escherichia coli* O157:H7, en una o más muestras de ensayo mediante reacción de amplificación multiplex empleando la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, el juego de diagnóstico tiene (a) uno o más oligonucleótidos según cualquiera de los grupos de secuencias identificadas como SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y

10 SEQ ID NO: 9; y/o SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12; (b) una o más sondas marcadas que tienen cualquiera de oligonucleótidos con las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 12; y un marcador diferente para cada secuencia; y (c) otros reactivos o composiciones necesarias para llevar a cabo el ensayo.

15

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

Los detalles característicos de la invención se describen en los siguientes párrafos en conjunto con las figuras que lo acompañan, las cuales son con el propósito

20 de definir al invento pero sin limitar el alcance de éste.

Figura 1 ilustra una curva de calibración para *Listeria sp* de acuerdo al invento, donde A1: es una referencia de mayor concentración; A4: es una referencia de menor concentración. La lectura de una muestra se interpola en las lecturas de las

25 referencias para conocer las UFC/ml.

Figura 2 ilustra una curva de calibración para *Staphylococcus aureus* de acuerdo al invento, donde A1: es una referencia de mayor concentración; A4: es una

referencia de menor concentración. La lectura de una muestra se interpola en las lecturas de las referencias para conocer las UFC/ml.

Figura 3 ilustra una curva de calibración para *Campylobacter jejuni* de acuerdo al invento, donde A1: es una referencia de mayor concentración; A2: es una referencia de menor concentración. La lectura de una muestra se interpola en las lecturas de las referencias para conocer las UFC/ml.

Figura 4 ilustra una curva de calibración para *Escherichia coli* O157:H7 de acuerdo al invento, donde A1: es una referencia de mayor concentración; A3: es una referencia de menor concentración. La lectura de una muestra se interpola en las lecturas de las referencias para conocer las UFC/ml.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

15

El termino "amplificación enzimática de ADN", como es empleado en el contexto de la presente descripción, significa el empleo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para incrementar la concentración de una secuencia en particular de ADN dentro de una mezcla de secuencias de ADN. La secuencia particular de ADN que es amplificada es referida como una "secuencia objetivo".

20

El término "par de iniciadores" es empleado bajo el significado de un par de iniciadores oligonucleótidos que son complementarios a las secuencias que lindan con la secuencia objetivo. El par de iniciadores consiste de un iniciador "corriente arriba" que tiene una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia "corriente arriba" de la secuencia objetivo, y un iniciador "corriente abajo" que tiene una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia "corriente abajo" de la secuencia objetivo.

25

El término "reacción de amplificación múltiplex" significa, en el contexto de la presente descripción, amplificación, por procedimiento de PCR, de múltiples secuencias objetivo de DNA en una muestra de ensayo en particular.

5

En la presente invención se detectaron y cuantificaron simultáneamente cuatro bacterias utilizando la técnica de PCR en tiempo real, que en comparación con las otras técnicas, no se requirió de un pre-enriquecimiento, ni de preparar serie de tubos con una mezcla de reacción específica para cada bacteria a detectar; es necesario resaltar que representa un avance el hecho de detectar cuatro bacterias de manera simultánea y reducir el tiempo total de análisis a 2,5 h mínimo representando una ventaja competitiva en la disminución del costo de análisis, utilizando una misma mezcla para la prueba de detección. Además de lograr una mejor sensibilidad, ya que la preparación de la muestra (que ya está incluida en el tiempo de 2,5 h) ha permitido obtener mejores resultados porque se ha adecuado de tal forma que no existen factores que puedan influir desfavorablemente en la amplificación.

El método proporcionado por esta invención permite detectar, identificar y cuantificar simultáneamente múltiple patógenos transmisibles por alimentos, superficies o ambientes contaminados, tales como *Listeria sp*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y/o *Escherichia coli* O157:H7, en una o más muestras de ensayo, mediante reacción de amplificación múltiplex empleando la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. La muestra de ensayo puede ser cualquier muestra que contiene ADN en la que se desea conocer la posible contaminación por dichos patógenos. En una realización particular, dicha muestra de ensayo es una muestra de un producto alimenticio, por ejemplo, productos cárnicos y lácteos, o una muestra de superficies o ambientes contaminados.

OLIGONUCLEÓTIDOS: DISEÑO E INFORMACIÓN DE SECUENCIA

Los oligonucleótidos de la invención han sido diseñados con el propósito de identificar específicamente a *Listeria sp*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli O157:H7* que puedan estar presentes en un muestra de ensayo sin dar falsos positivos debido a la presencia de otros patógenos presentes en la misma.

Se cuenta con un par de iniciadores oligonucleótidos para cada uno de los patógenos a identificar (*Listeria sp*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli O157:H7*), tal que cada par de iniciadores comprenden una primera secuencia nucleótida sintética "corriente arriba" complementaria a una secuencia nucleótida "corriente arriba" que linda con el extremo 5' de una secuencia de ácido nucleico objetivo y una segunda secuencia nucleótida sintética "corriente abajo" complementaria a una secuencia "corriente abajo" que linda con el extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico objetivo. Las secuencias de nucleótidos deben tener cada par de iniciadores de oligonucleótidos que son específicos al patógeno a detectar, de tal manera que no reaccionen o se crucen con otros patógenos. Así mismo, para cada uno de los patógenos a identificar se desarrolló una secuencia sintética de prueba para sonda. Los oligonucleótidos desarrollados se muestran en la Tabla 1.

20

Identificador	Tipo	Patógeno	Secuencia Nucleótida
SEQ ID NO: 1	Iniciador "corriente arriba" F	<i>Listeria sp</i>	CTTGACATCCTTTGACCACTCTG
SEQ ID NO: 2	Iniciador "corriente abajo" R	<i>Listeria sp</i>	GACTTAACCCAACATCTCACGAC
SEQ ID NO: 3	Prueba P	<i>Listeria sp</i>	AGCTGACGACAACCATGCACCACC
SEQ ID NO: 4	Iniciador "corriente arriba" F	<i>Staphylococcus aureus</i>	AACAAAACAGACCATCTTTAAGCG
SEQ ID NO: 5	Iniciador "corriente abajo" R	<i>Staphylococcus aureus</i>	AGATGAGCTACCTTCAAGACCTTC
SEQ ID NO: 6	Prueba P	<i>Staphylococcus aureus</i>	ACTCAACCGACGACACCGAACCCCT
SEQ ID NO: 7	Iniciador "corriente arriba" F	<i>Campylobacter jejuni</i>	GCAGCAGTAGGGAATATTGCG
SEQ ID NO: 8	Iniciador "corriente	<i>Campylobacter</i>	TACGCTCCGAAAAGTGTCATCC

	abajo" R	<i>jejuni</i>	
SEQ ID NO: 9	Prueba P	<i>Campylobacter jejuni</i>	AACCCTGACGCAGCAACGCCGC
SEQ ID NO: 10	Iniciador "corriente arriba" F	<i>Escherichia coli O157:H7</i>	GCAGATAAACTCATCGAAACAAGG
SEQ ID NO: 11	Iniciador "corriente abajo" R	<i>Escherichia coli O157:H7</i>	TAAATTAATTCCACGCCAACCAAG
SEQ ID NO: 12	Prueba P	<i>Escherichia coli O157:H7</i>	ACCCTGTCCACACGATGCCAATGT

Tabla 1

En una realización preferente de la invención las secuencias SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO:12 empleadas como sondas de prueba son marcadas en su extremo 5' con un fluoróforo o un colorante capaz de emitir energía, y en su extremo 3' con un apagador o un colorante capaz de capturar la energía emitida de la excitación del fluoróforo. Los fluoróforos y apagadores, empleados como marcadores para poder detectar e identificar *Listeria sp*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli O157:H7* sin producir reacciones cruzadas entre ellos y los demás componentes, son mostrados en la Tabla 2.

Identificador	Patógeno	Secuencia Nucleótida	Fluoróforo para marcaje en extremo 5'	Apagador para marcaje en extremo 3'
SEQ ID NO: 3	<i>Listeria sp</i>	AGCTGACGACAACCATGCACCACC	TET	BHQ-1
SEQ ID NO: 6	<i>Staphylococcus aureus</i>	ACTCAACCGACGACACCGAACCCCT	TxR	BHQ-2
SEQ ID NO: 9	<i>Campylobacter jejuni</i>	AACCCTGACGCAGCAACGCCGC	Cy5	BHQ-3
SEQ ID NO: 12	<i>Escherichia coli O157:H7</i>	ACCCTGTCCACACGATGCCAATGT	FAM	BHQ-1

Tabla 2

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA O MUESTRAS DE ENSAYO DE ADN

Para el desarrollo de la metodología del invento se consideraron los siguientes pasos para la preparación de una muestra de ensayo:

5

Se procede a una etapa de lavado, donde una muestra de alimento, superficie o ambiental se somete a una solución salina formando una suspensión que posteriormente es centrifugada para obtener un primer sedimento obtenido por la eliminación de sustancias hidrosolubles presentes en la suspensión.

10

Una vez obtenido el sedimento de la muestra, éste se incuba con lisozima para romper la pared celular de las bacterias ahí presentes, para posteriormente proceder a una incubación con proteinasa K para provocar la hidrólisis de las proteínas y de la lisozima previamente adicionada.

15

La extracción de las proteínas y demás compuestos liposolubles ahí presentes se hace por medio de aplicación de fenol-cloroformo-álcohol, a fin de que una vez extraídas, por medio de una precipitación con etanol, se proceda a una precipitación selectiva del ADN presente, formando una concentración de ADN que es secada.

20

Finalmente con la concentración de ADN obtenida, se forma una suspensión que es calentada a aproximadamente 65 °C que origina una rápida disolución de la muestra de ADN.

25

En cada uno de los elementos probados se hicieron pruebas de cantidad de reactivo adicionado, tiempos de centrifugación-incubación, repetición de los lavados, hasta encontrar las condiciones óptimas. La preparación de la muestra se realizó

tomando en cuenta que todos los reactivos y muestras deben mantenerse en temperatura de refrigeración durante su proceso.

Ejemplos del proceso de preparación de la muestra o muestras de ensayo de

5 ADN son descritos a continuación:

Ejemplo 1: Preparación de muestra de ADN a partir de una muestra de alimento de productos cárnicos o quesos.

- 10 1. Colocar 25 g de la muestra de alimento en un tubo cónico de 50 ml estéril, y aforar a 40 ml con solución salina estéril a temperatura ambiente.
2. Dejar reposar el tubo con la muestra de alimento por 10 min en posición vertical.
3. Eliminar el alimento, centrifugar a 3500 min^{-1} por 15 min y extraer cuidadosamente el sobrenadante para no perder el sedimento.
4. Agitar en vórtex el sedimento por 10 s.
- 15 5. Transferir la totalidad del sedimento a un tubo Eppendorf de 2 ml, enjuagar el tubo cónico con 1 ml de salina estéril y reunir el lavado con el obtenido previamente.
6. Centrifugar a $14\ 000 \text{ min}^{-1}$ por 8 min.
7. Eliminar todo el sobrenadante con pipeta automática.
8. Añadir 100 μl de Tris-HCl de 100 mmol y pH=8, y 30 μg de liozima, y mezclar en
20 vórtex por 10 s.
9. Incubar a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min en baño de agua.
10. Añadir 100 μl de TE 1X con SDS al 1% y 3 μl de Proteinasa K (20 mg/ml).
11. Mezclar e incubar a $55 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min.
12. Agregar 500 μl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24:24:1) y 100 μl de TE 1X
25 y agitar 5 min por inversión.
13. Centrifugar por 8 min a $13\ 500 \text{ min}^{-1}$ y transferir 250 μl de la fase superior a otro tubo.
14. Añadir 582,5 μl de etanol absoluto y mantener en el congelador por 10 min.

15. Centrifugar por 8 min a $13\,500\text{ min}^{-1}$.
16. Decantar y secar.
17. Redissolver en 25 μl de TE 1X y asegurar que el botón de DNA se disuelva.
18. Calentar a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min.
- 5 19. Dejar a temperatura ambiente por 30 min y procesar.

Ejemplo 2: Preparación de muestra de ADN a partir de una muestra de ambiente o de superficie.

- 10 1. Pasar una esponja estéril por una superficie de 20 cm x 20 cm a analizar para obtener una muestra.
2. Exprimir la esponja en una bolsa para proceder a decantar el líquido en un tubo cónico de 50 ml, y aforar a 40 ml con solución salina estéril.
3. Centrifugar a 3500 min^{-1} por 15 min y extraer cuidadosamente el sobrenadante para no perder el sedimento.
- 15 4. Agitar en vórtex el sedimento por 10 s.
5. Transferir la totalidad del sedimento a un tubo Eppendorf de 2 ml. Enjuagar el tubo cónico con 1 ml de salina estéril y reunir el lavado con el obtenido previamente.
6. Centrifugar a $14\,000\text{ min}^{-1}$ por 8 min.
7. Lavar 2 veces más con 1.5 ml de solución salina estéril.
- 20 8. Eliminar todo el sobrenadante con pipeta automática.
9. Añadir 100 μl de Tris-HCl de 100 mmol y pH=8, y 30 μg de lisozima, y mezclar en vórtex por 10 s.
10. Incubar a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min en baño de agua.
11. Añadir 100 μl de TE 1X con SDS al 1% y 3 μl de Proteinasa K (20 mg/ml).
- 25 12. Mezclar e incubar a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min.
13. Agregar 500 μl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24:24:1) y 100 μl de TE 1X y agitar 5 min por inversión.

14. Centrifugar por 8 min a $13\ 500\ \text{min}^{-1}$ y transferir 250 μl de la fase superior a otro tubo.
15. Añadir 582,5 μl de etanol absoluto y mantener en el congelador por 10 min.
16. Centrifugar por 8 min a $13\ 500\ \text{min}^{-1}$.
- 5 17. Decantar y secar.
18. Redissolver en 25 μl de TE 1X. Asegurarse de que el botón de DNA se disuelva.
19. Calentar a 65 °C por 15 min.
20. Dejar a temperatura ambiente por 30 min y procesar.

10 PREPARACIÓN DE LA MEZCLA DE REACCIÓN

Una vez obtenida la muestra o muestras de ensayo de ADN se prepara una mezcla de reacción utilizando los componentes descritos en la Tabla 3.

Componente de la Mezcla de Reacción		Concentración inicial	Cantidad a añadir (μl)	Concentración final
MgCl ₂		50 mmol	1,75	3,5
DNTPs		10 mmol	0,5	200 μmol
Buffer		10X	3,75	1,5X
<i>Listeria sp</i>	SEQ ID NO: 1	5 nmol	1	200 pmol
	SEQ ID NO: 2	5 nmol	1	200 pmol
	SEQ ID NO: 3	5 nmol	0,25	50 pmol
<i>Staphylococcus aureus</i>	SEQ ID NO: 4	5 nmol	1	200 pmol
	SEQ ID NO: 5	5 nmol	1	200 pmol
	SEQ ID NO: 6	5 nmol	0,25	50 pmol
<i>Campylobacter jejuni</i>	SEQ ID NO: 7	5 nmol	1,5	300 pmol
	SEQ ID NO: 8	5 nmol	1,5	200 pmol
	SEQ ID NO: 9	5 nmol	1,75	350 pmol
<i>Escherichia coli O157:H7</i>	SEQ ID NO: 10	5 nmol	1	200 pmol
	SEQ ID NO: 11	5 nmol	1	200 pmol
	SEQ ID NO: 12	5 nmol	0,25	50 pmol
ADN polimerasa Taq		5 U/ μl	0,25	
Agua			2,25	
Muestra de ensayo de ADN			5	
Volumen Total			25	

15

Tabla 3

Posteriormente, se procede a preparar un cóctel de reacción para 100 reacciones mezclando los componentes descritos en la Tabla 4.

Componente de la Mezcla de Reacción	Cantidad a añadir (µl) para una reacción	Cantidad a añadir (µl) para 100 reacción
MgCl ₂	1,75	175
DNTPs	0,5	50
Buffer	3,75	375
<i>Listeria sp</i>	SEQ ID NO: 1	1
	SEQ ID NO: 2	1
	SEQ ID NO: 3	0,25
<i>Staphylococcus aureus</i>	SEQ ID NO: 4	1
	SEQ ID NO: 5	1
	SEQ ID NO: 6	0,25
<i>Campylobacter jejuni</i>	SEQ ID NO: 7	1,5
	SEQ ID NO: 8	1,5
	SEQ ID NO: 9	1,75
<i>Escherichia coli O157:H7</i>	SEQ ID NO: 10	1
	SEQ ID NO: 11	1
	SEQ ID NO: 12	0,25
Agua	2,25	225
Muestra de ensayo de ADN	5	

Tabla 4

- 5 El cóctel preparado se mezcla perfectamente por inversión y se dispensan 19,75 µl en viales Eppendorf de 0,5 ml para ser almacenados en congelación protegidos de la luz.

REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN MÚLTIPLEX EMPLEANDO PCR EN TIEMPO REAL Y

10 DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PATÓGENOS

- En una realización preferente del invento, la reacción de amplificación múltiplex empleando PCR en tiempo real proporciona muchas ventajas sobre el método de PCR convencional de un solo objetivo a detectar. La reacción de amplificación múltiplex empleando PCR requiere del desarrollo de los iniciadores oligonucleótidos y sondas específicas para la secuencia objetivo del patógeno a detectar, de tal manera que dichos iniciadores oligonucleótidos y sondas sean compatibles entre sí dentro de una misma temperatura óptima de entre 40 °C a 65 °C y sometidas a las mismas

condiciones de reacción química a fin de permitir el cruzamiento o atadura, por hibridación, de dos segmentos de ácido nucleico complementarios. Aunado a esto, los juegos de iniciadores oligonucleótidos y sondas no deben reaccionar cruzadamente ni cruzarse o atarse, durante la amplificación, a otras secuencias de ácido nucleico para las cuales no fueron diseñados.

Teniendo en cuenta lo anterior, los siguientes pares de iniciadores oligonucleótidos son usados para amplificar cada una de las secuencias objetivo de ácido nucleico de cada patógeno a detectar. Un par de iniciadores oligonucleótidos de *Listeria sp* identificados como SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 que se cruzan o atan a una secuencia objetivo del genoma de *Listeria sp*. Un par de iniciadores oligonucleótidos de *Staphylococcus aureus* identificados como SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 que se cruzan o se atan a una secuencia objetivo del genoma de *Staphylococcus aureus*. Un par de iniciadores oligonucleótidos de *Campylobacter jejuni* identificados como SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 que se cruzan o se atan a una secuencia objetivo del genoma de *Campylobacter jejuni*. Y un par de iniciadores oligonucleótidos de *Escherichia coli O157:H7* identificados como SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11 que se cruzan o se atan a una secuencia objetivo del genoma de *Escherichia coli O157:H7*.

Cada sonda identificadas como SEQ ID NO:3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 12, que es empleada en la reacción de amplificación múltiple empleando PCR en tiempo real, es un secuencia oligonucleótida doblemente marcada que es complementaria a cada una de las secuencias intermedias en los productos amplificados obtenidos. Cada una de las sondas están marcadas en su extremo 5' con un fluoróforo o un colorante capaz de emitir energía, y en su extremo 3' con un apagador o un colorante capaz de capturar la energía emitida de la excitación de dicho fluoróforo, tal como lo describe Nazarenko *et al.* en la patente estadounidense US-

5866336 donde se hace mención a fluoróforos que transfieren energía y cómo estos son aplicados en los iniciadores oligonucleótidos en los métodos de amplificación nucleica.

5 En una realización preferente de la invención, los fluoróforos empleados son TET, TxR, Cy5, FAM; mientras que los apagadores empleados son BHQ-1, BHQ-2 y BHQ-3. Tal que la secuencias oligonucleótidas empleadas como sondas (SEQ ID NO:3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 12) son marcadas en sus extremos 5' y 3' conforme a la combinación indicada en la Tabla 2 antes mencionada.

10

En un ejemplo particular de realización, la muestra de ADN es preparada para su amplificación en las siguientes condiciones:

Muestra de lácteos o de ambiente: Se descongela un vial con 19,75 μ l de cóctel
15 preparado y se añaden 0,25 μ l de ADN polimerasa Taq, 4 μ l de agua y 1 μ l de la muestra de ADN a analizar.

Muestra de productos cárnicos o quesos: Se descongela un vial con 19,75 μ l de
cóctel preparado y se añaden 0,25 μ l de ADN polimerasa Taq y 5 μ l de la muestra de
20 ADN a analizar.

La reacción de amplificación múltiple empleando PCR se realiza en un aparato para el control simultáneo de múltiples amplificaciones de ácido nucleico, como el aparato descrito por Russell G. Higuchi y Robert M. Watson en la publicación de
25 patente europea EP-640828, el cual generalmente consiste de un termociclador con una pluralidad de orificios en los que se introducen tubos que contienen la mezcla de reacción para la amplificación enzimática de ADN de los patógenos a detectar e identificar; una fuente de luz acoplada al termociclador y adaptada para distribuir la

luz sobre la pluralidad de orificios; y un sensor o detector de fluorescencia adaptado para detectar simultáneamente la luz emitida.

Con el objeto de cuantificar los microorganismo presentes en la muestra, se elaboran curvas de calibración preparando suspensiones de cada una de los patógenos a detectar (*Listeria sp*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli* O157:H7), ajustando la turbidez al tubo 0,5 de Mc Farland para preparar diluciones al 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 y 10^8 para posteriormente contaminar 25 g de alimento con cada una de estas suspensiones (un alimento por cada dilución), después se procede a la extracción de DNA como si fuera una muestra y se prepara una cuenta en placa de cada una de las diluciones preparadas para ser sometidas al termociclador, asignando la concentración de patógenos correspondiente. Finalmente se construye la curva de cT contra log ug/g, obteniéndose así una curva de calibración para *Listeria sp* (ver Figura 1), *Staphylococcus aureus* (ver Figura 2), *Campylobacter jejuni* (ver Figura 3) y *Escherichia coli* O157:H7 (ver Figura 4).

En una realización particular, el aparato utilizado comprende un termociclador rápido en tiempo real unido a un sistema de detección por fluorescencia, lo que permite la supervisión en tiempo real del proceso de amplificación tras cada ciclo. Un ejemplo de termociclador empleado en el método del invento es el SMART CYCLER® II de CEPHEID®.

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PATÓGENOS PRESENTES EN LA MUESTRA DE ADN

La presencia o ausencia y cuantificación de patógenos en cualquier combinación de *Listeria sp*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y/o *Escherichia coli* O157:H7 en la muestra o muestras de ensayo se determina por una señal fluorescente o emisión de fluorescencia específica de cada producto o muestra de ADN amplificada.

Para esto se hace incidir una longitud de onda específica para la excitación de cada fluoróforo y se detecta su emisión a longitudes de onda específicas.

RESULTADOS

5

En un ejemplo de realización, la Tabla 5 indica las condiciones en que se llevó a cabo la reacción de amplificación múltiplex, la Tabla 6 los límites de detección alcanzados y la Tabla 7 muestra las lecturas de las concentraciones que se obtuvieron como resultado de la detección y cuantificación de los cuatro patógenos (*Listeria sp*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y/o *Escherichia coli* O157:H7) en forma simultánea en muestras de carnes frías, lácteos y ambiente, mediante la utilización de un sólo dispositivo con una sola mezcla de reactivos y cuatro oligonucleótidos específicos para diferentes patógenos a una sola condición de temperaturas y mezcla para su amplificación. Así como también las Figuras 1, 2, 3 y 4 muestran gráficamente su detección y cuantificación.

10

15

	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
Proceso inicial	94	120	1
Amplificación	94	15	40
	63	25	

Tabla 5

Tipo de muestra	<i>Listeria sp</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Escherichia coli</i> O157:H7
ALIMENTOS				
Cárnicos y Quesos (unidades genómicas/g).	1	3	160	16
AMBIENTE				
Drenaje (unidades genómicas/muestra)	1	3	160	16
Pisos (unidades genómicas/muestra)	1	3	160	16

Superficie en contacto (unidades genómicas/muestra)	1	3	160	16
Paredes (unidades genómicas/muestra)	1	3	160	16
Operadores (unidades genómicas/muestra)	1	3	160	16

Tabla 6

Prueba de referencia	<i>Listeria sp</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Campylobacter jejuni</i>		<i>Escherichia coli</i> O157:H7	
	(UFC/ml)	Lectura	(UFC/ml)	Lectura	(UFC/ml)	Lectura	(UFC/ml)	Lectura
A1	10000000	12,72	10000000	14,98	1000000	15,50	1000000	13,8
A2	1000000	15,5	1000000	18,48	100000	17,50	100000	17,2
A3	100000	18,86	100000	22,34	0	0	10000	20,4
A4	10000	22,69	10000	28,51	0	0	0	0

5

Tabla 7

La método del presente invento no requiere un pre-enriquecimiento, por lo cual el tiempo de proceso es mucho más corto, aproximadamente 2,5 h, y se tiene la capacidad de detectar y cuantificar patógenos viables cultivables además de patógenos viables no cultivables de forma simultánea.

JUEGO DE DIAGNÓSTICO

En general, los juegos de diagnóstico de la invención contienen cada una de las parejas de iniciadores oligonucleótidos correspondientes a cada uno de las patógenos a detectar (*Listeria sp*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y/o *Escherichia coli* O157:H7), al igual que cada una de las sondas marcadas para cada uno de dichos patógenos, con el fin de poder elegir entre realizar la detección de un solo patógeno

(usando solo el par de iniciadores oligonucleótidos y su sonda marcada), o bien para la detección combinada o simultánea de los cuatro patógenos mencionados, dependiendo de las necesidades.

5 Los juegos de diagnóstico proporcionados por esta invención pueden presentarse en forma de estuche conteniendo, además de unos recipientes con los pares de iniciadores oligonucleótidos y/o sondas marcadas mencionados previamente, unos recipientes con la totalidad o parte del resto de los reactivos necesarios para la realización del método en cuestión, por ejemplo, agua ultrapura, dNTPs (dATP, dCTP,
10 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, $MgCl_2$), entre otros. Adicional y opcionalmente, los juegos de diagnóstico proporcionados por esta invención pueden incluir unos recipientes con
15 ADN de *Listeria sp*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y/o *Escherichia coli* O157:H7 para su empleo como controles positivos.

Basado en las realizaciones descritas anteriormente, se contempla que las modificaciones de los ambientes de realización descritos, así como los ambientes de realización alternativos serán considerados evidentes para una persona experta en el
20 arte de la técnica bajo la presente descripción. Es por lo tanto, contemplado que las reivindicaciones abarcan dichas modificaciones y alternativas que estén dentro del alcance del presente invento o sus equivalentes.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección y cuantificación múltiple y simultánea de cualquier combinación de patógenos, seleccionados de un grupo consistente de *Listeria sp*,
5 *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli* O157:H7, en una o más muestras de ensayo mediante reacción de amplificación múltiple empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, el método comprende los pasos de:

a) extraer ADN presente en dicha muestra o muestras de ensayo;

10 b) preparar una mezcla de reacción específica para dichos patógenos a detectar y cuantificar, comprendiendo dicha mezcla de reacción los reactivos necesarios para la amplificación enzimática del ADN extraído e identificación de dichos patógenos a detectar y cuantificar;

15 c) amplificar, mediante reacción de amplificación múltiple empleado PCR, dicha mezcla de reacción; y

d) determinar simultáneamente la presencia o ausencia y cuantificación de dichos patógenos en dicha muestra o muestras de ensayo;

en donde dicho método se caracteriza porque

20 i) dicha mezcla de reacción para la amplificación enzimática del ADN extraído e identificación de cualquier combinación de *Listeria sp*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y/o *Escherichia coli* O157:H7 a detectar y cuantificar comprende:

25 un primer par de iniciadores oligonucleótidos identificados como SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 y una sonda identificada como SEQ ID NO: 3, los cuales se cruzan o se atan a un primera secuencia objetivo de ácido nucleico de *Listeria sp*;

un segundo par de iniciadores oligonucleótidos identificados como SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 y una sonda identificada como SEQ ID

NO: 6, los cuales se cruzan o se atan a una segunda secuencia objetivo de ácido nucleico de *Staphylococcus aureus*;

un tercer par de iniciadores oligonucleótidos identificados como SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 y una sonda identificada como SEQ ID NO: 9, los cuales se cruzan o se atan a una tercera secuencia objetivo de ácido nucleico de *Campylobacter jejuni*; y/o

un cuarto par de iniciadores oligonucleótidos identificados como SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11 y una sonda identificada como SEQ ID NO: 12, los cuales se cruzan o se atan a una cuarta secuencia objetivo de ácido nucleico de *Escherichia coli O157:H7*;

ii) la presencia o ausencia y cuantificación de dichos patógenos en cualquier combinación de *Listeria sp*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y/o *Escherichia coli O157:H7* en dicha muestra o muestras de ensayo se determina por una señal fluorescente o emisión de fluorescencia específica de cada patógeno.

2. El método de la reivindicación 1, caracterizado porque dicha muestra o muestras de ensayo es una muestra de alimentos procesados o de ambiente.

3. El método de la reivindicación 1, caracterizado porque dicho paso de extraer ADN presente en dicha muestra o muestras de ensayo, incluye los pasos de:
colocar dicha muestra de ensayo en una solución salina estéril;
remover los elementos solubles en agua; y
obtener un concentrado.

4. El método de la reivindicación 1, caracterizado porque dicha mezcla de reacción comprende:

al menos 200 pmol del iniciador oligonucleótido identificado como SEQ ID NO:
1;

al menos 200 pmol del iniciador oligonucleótido identificado como SEQ ID NO:
2;

5 al menos 50 pmol del oligonucleótido de la sonda identificada como SEQ ID
NO: 3;

al menos 200 pmol del iniciador oligonucleótido identificado como SEQ ID NO:
4;

10 al menos 200 pmol del iniciador oligonucleótido identificado como SEQ ID
NO: 5;

al menos 50 pmol del oligonucleótido de la sonda identificada como SEQ ID
NO: 6;

al menos 300 pmol del iniciador oligonucleótido identificado como SEQ ID NO:
7;

15 al menos 200 pmol del iniciador oligonucleótido identificado como SEQ ID NO:
8;

al menos 350 pmol del oligonucleótido de la sonda identificada como SEQ ID
NO: 9;

20 al menos 200 pmol del iniciador oligonucleótido identificado como SEQ ID NO:
10;

al menos 200 pmol del iniciador oligonucleótido identificado como SEQ ID NO:
11; y/o

al menos 50 pmol del oligonucleótido de la sonda identificada como SEQ ID
NO: 12.

25

5. El método de la reivindicación 1, caracterizado porque incluye una o más sondas para detectar producto o productos amplificados de PCR, en donde cada sonda es complementaria a una secuencia dentro de la secuencia a detectar de cualquier

combinación de *Listeria sp*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y/o *Escherichia coli O157:H7*.

5 6. El método de la reivindicación 5, caracterizado porque una primera sonda comprende:

un oligonucleótido identificado como SEQ ID NO: 3; y
al menos un marcador.

10 7. El método de la reivindicación 6, caracterizado porque dicha primera sonda está marcada en su extremo 5' con fluoróforo o un colorante capaz de emitir energía y en su extremo 3' con un apagador o un colorante capaz de capturar la energía emitida de la excitación de dicho fluoróforo.

15 8. El método de la reivindicación 7, caracterizado porque dicho fluoróforo es TET.

9. El método de la reivindicación 7, caracterizado porque dicho apagador es BHQ-1.

20 10. El método de la reivindicación 5, caracterizado porque una segunda sonda comprende:

un oligonucleótido identificado como SEQ ID NO: 6; y
al menos una marcador.

25 11. El método de la reivindicación 10, caracterizado porque dicha segunda sonda está marcada en su extremo 5' con fluoróforo o un colorante capaz de emitir energía y en su extremo 3' con un apagador o un colorante capaz de capturar la energía emitida de la excitación de dicho fluoróforo.

12. El método de la reivindicación 11, caracterizado porque dicho fluoróforo es TxR.

13. El método de la reivindicación 11, caracterizado porque dicho apagador es BHQ-2.
14. El método de la reivindicación 5, caracterizado porque una tercera sonda
5 comprende:
un oligonucleótido identificado como SEQ ID NO: 9; y
al menos un marcador.
15. El método de la reivindicación 14, caracterizado porque dicha tercera sonda está
10 marcada en su extremo 5' con fluoróforo o un colorante capaz de emitir energía y
en su extremo 3' con un apagador o un colorante capaz de capturar la energía
emitida de la excitación de dicho fluoróforo.
16. El método de la reivindicación 15, caracterizado porque dicho fluoróforo es Cy5.
15
17. El método de la reivindicación 15, caracterizado porque dicho apagador es BHQ-3.
18. El método de la reivindicación 5, caracterizado porque una cuarta sonda
comprende:
20 un oligonucleótido identificado como SEQ ID NO: 12; y
al menos un marcador.
19. El método de la reivindicación 18, caracterizado porque dicha cuarta sonda está
25 marcada en su extremo 5' con fluoróforo o un colorante capaz de emitir energía y
en su extremo 3' con un apagador o un colorante capaz de capturar la energía
emitida de la excitación de dicho fluoróforo.
20. El método de la reivindicación 19, caracterizado porque dicho fluoróforo es FAM.

21. El método de la reivindicación 19, caracterizado porque dicho apagador es BHQ-1.
22. El método de la reivindicación 5, caracterizado porque dichas sondas están
5 marcadas en su extremo 5' con fluoróforo o un colorante capaz de emitir energía, y
en su extremo 3' con un apagador o un colorante capaz de capturar la energía
emitida de la excitación de dicho fluoróforo.
23. El método de la reivindicación 22, caracterizado porque dicho fluoróforo es
10 seleccionado de un grupo que consiste de TET, TxR, Cy5 y FAM.
24. El método de la reivindicación 22, caracterizado porque dicho apagador es
seleccionado de un grupo que consiste de BHQ-1, BHQ-2 y BHQ-3.
- 15 25. Un oligonucleótido que se caracteriza por tener una secuencia de nucleótidos
seleccionada de un grupo formado por las secuencias identificadas como SEQ ID
NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3.
26. Un oligonucleótido que se caracteriza por tener una secuencia de nucleótidos
20 seleccionada de un grupo formado por las secuencias identificadas como SEQ ID
NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.
27. Un oligonucleótido que se caracteriza por tener una secuencia de nucleótidos
seleccionada de un grupo formado por las secuencias identificadas como SEQ ID
25 NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9.

28. Un oligonucleótido que se caracteriza por tener una secuencia de nucleótidos seleccionada de un grupo formado por las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12.
- 5 29. Una sonda marcada que se caracteriza por comprender:
un oligonucleótido identificado como SEQ ID NO: 3; y
al menos un marcador.
- 10 30. La sonda marcada de la reivindicación 29, caracterizada porque dicha sonda está
marcada en su extremo 5' con fluoróforo o un colorante capaz de emitir energía y
en su extremo 3' con un apagador o un colorante capaz de capturar la energía
emitida de la excitación de dicho fluoróforo.
- 15 31. La sonda marcada de la reivindicación 30, caracterizada porque dicho fluoróforo es
TET.
32. La sonda marcada de la reivindicación 30, caracterizada porque dicho apagador es
BHQ-1.
- 20 33. Una sonda marcada que se caracteriza por comprender:
un oligonucleótido identificado como SEQ ID NO: 6; y
al menos un marcador.
- 25 34. La sonda marcada de la reivindicación 33, caracterizada porque dicha sonda está
marcada en su extremo 5' con fluoróforo o un colorante capaz de emitir energía y
en su extremo 3' con un apagador o un colorante capaz de capturar la energía
emitida de la excitación de dicho fluoróforo.

35. La sonda marcada de la reivindicación 34, caracterizada porque dicho fluoróforo es TxR.

36. La sonda marcada de la reivindicación 34, caracterizada porque dicho apagador es
5 BHQ-2.

37. Una sonda marcada que se caracteriza por comprender:
un oligonucleótido identificado como SEQ ID NO: 9; y
al menos un marcador.

10

38. La sonda marcada de la reivindicación 37, caracterizada porque dicha sonda está marcada en su extremo 5' con fluoróforo o un colorante capaz de emitir energía y en su extremo 3' con un apagador o un colorante capaz de capturar la energía emitida de la excitación de dicho fluoróforo.

15

39. La sonda marcada de la reivindicación 38, caracterizada porque dicho fluoróforo es Cy5.

40. La sonda marcada de la reivindicación 38, caracterizada porque dicho apagador es
20 BHQ-3.

41. Una sonda marcada que se caracteriza por comprender:
un oligonucleótido identificado como SEQ ID NO: 12; y
al menos un marcador.

25

42. La sonda marcada de la reivindicación 41, caracterizada porque dicha sonda está marcada en su extremo 5' con fluoróforo o un colorante capaz de emitir energía y

en su extremo 3' con un apagador o un colorante capaz de capturar la energía emitida de la excitación de dicho fluoróforo.

43. La sonda marcada de la reivindicación 42, caracterizada porque dicho fluoróforo es
5 FAM.

44. La sonda marcada de la reivindicación 42, caracterizada porque dicho apagador es
BHQ-1.

10 45. Un juego de diagnóstico para la detección y cuantificación múltiple y simultánea de cualquier combinación de patógenos, seleccionados de un grupo consistente de *Listeria sp*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli* O157:H7, en una o más muestras de ensayo mediante reacción de amplificación multiplex empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real,
15 en donde dicho juego se caracteriza por comprender:

uno o más oligonucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 25 a la 28;

una o más sondas marcadas según cualquiera de las reivindicaciones 29 a la

44; y

otros reactivos o composiciones necesarias para llevar a cabo el ensayo.

20

1/4

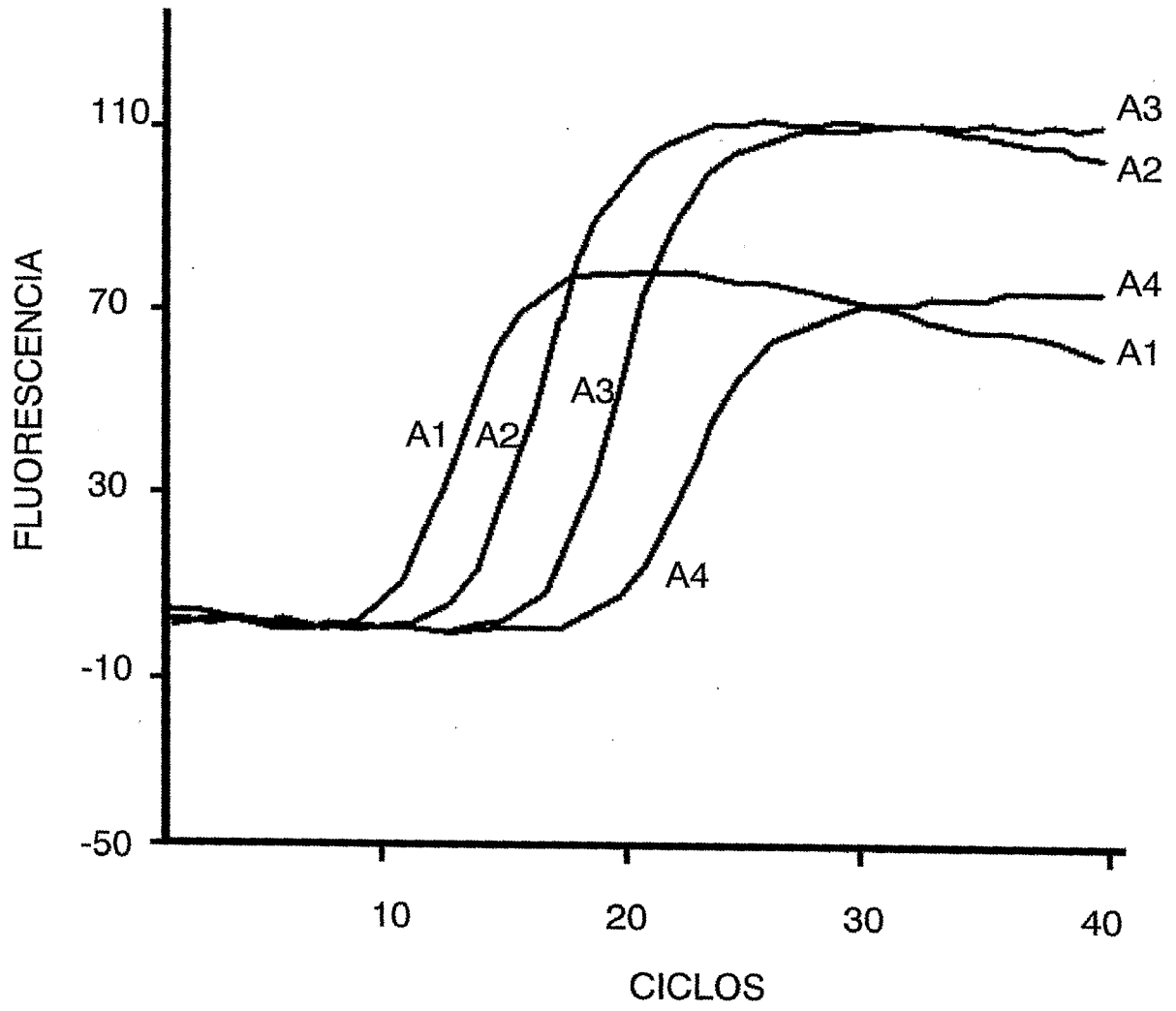


FIG. 1

2/4

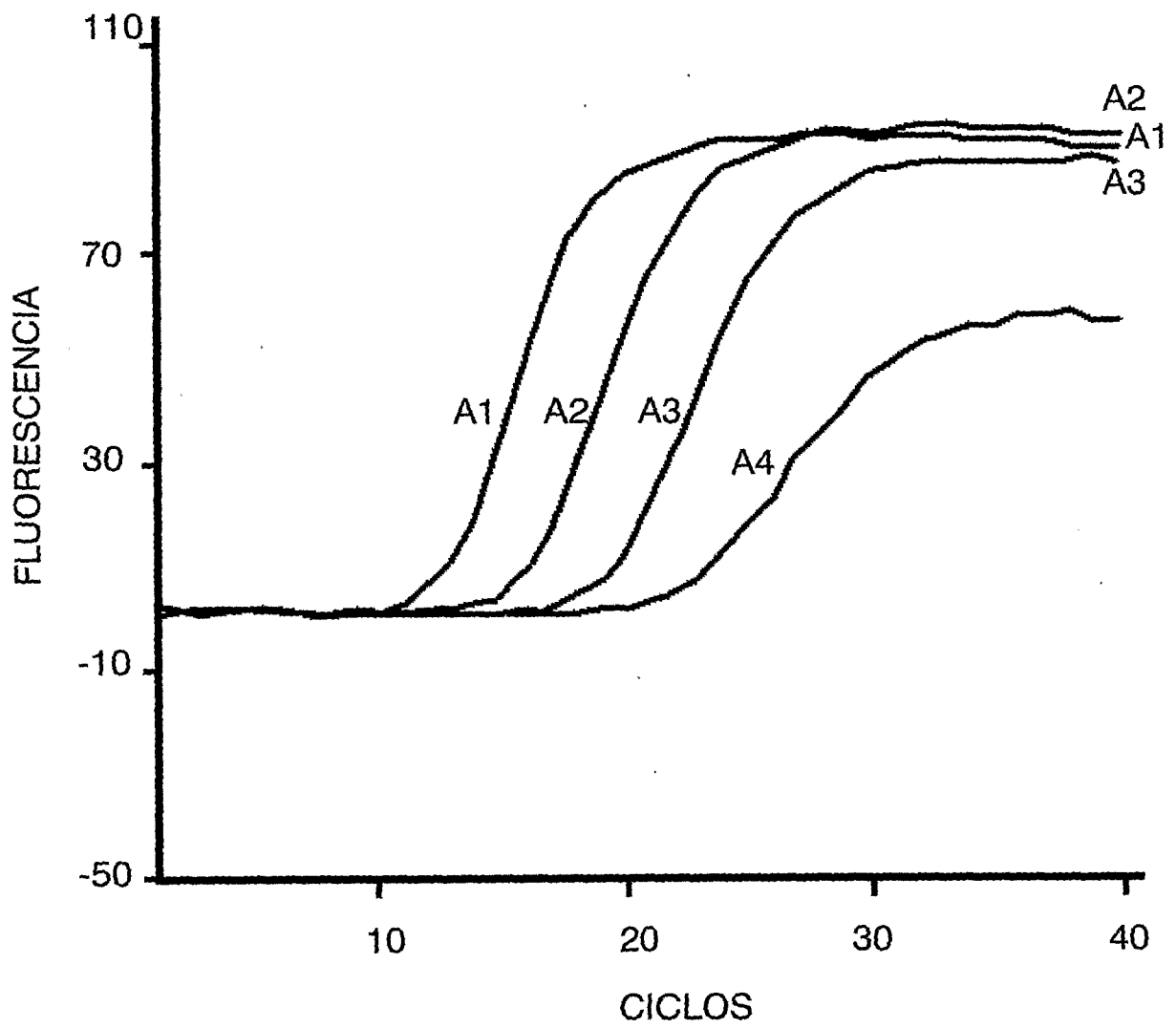


FIG. 2

3/4

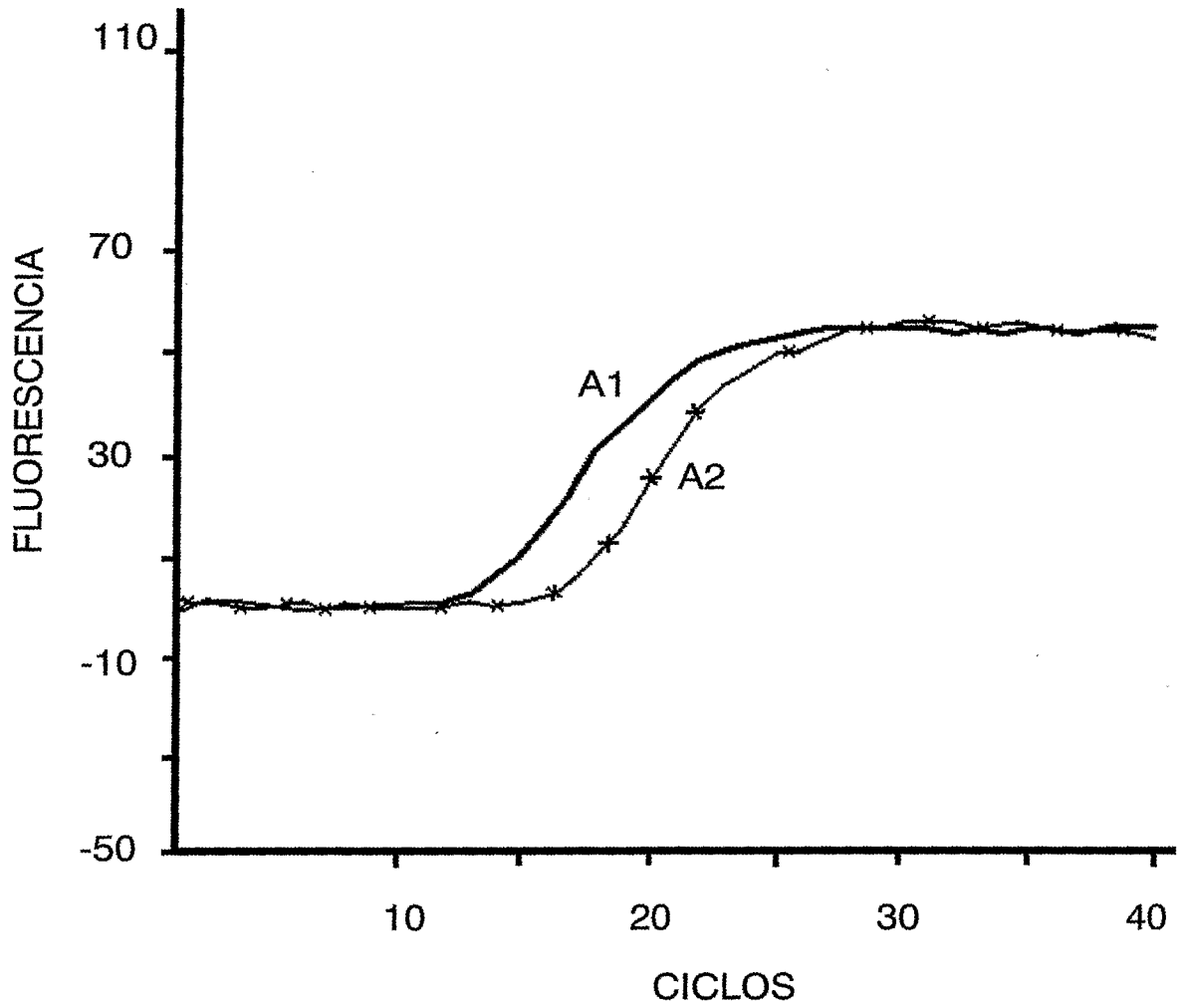


FIG. 3

4/4

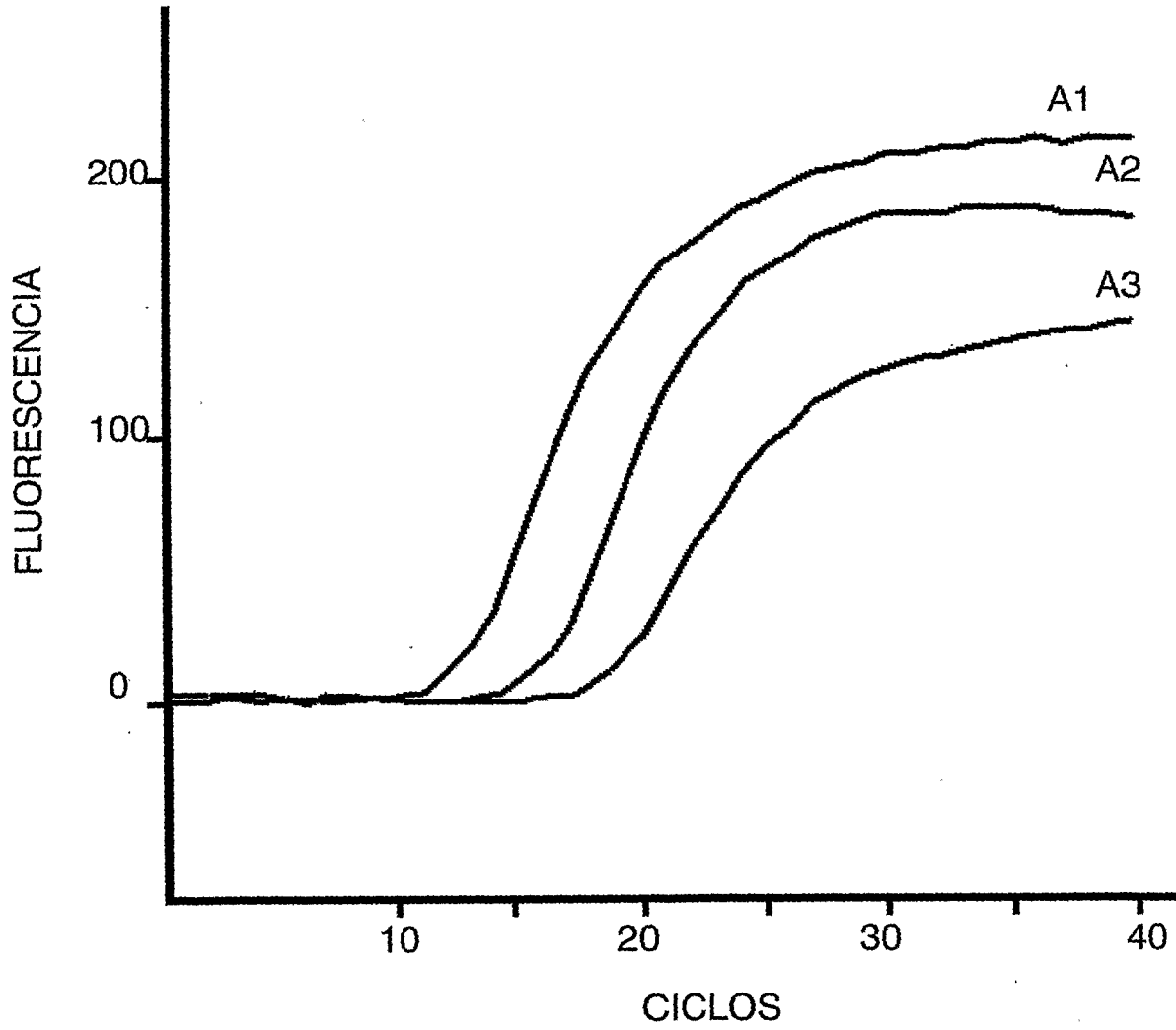


FIG. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ MX 2007/000052

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, XPESP, NPL, EMALL, TXTE, TXTF

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FUKUSHIMA, H., TSUNOMORI, Y., SEKI, R. Duplex real-time SYBR green PCR assays for detection of 17 species of food or waterborne pathogens in stools. Journal of Clinical Microbiology. November 2003, Vol. 41, N° 11, pages 5134-5146. ISSN 0095-1137.	1-45
X	WANG, R. F., CAO, W. W. CERNIGLIA, C. E. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne in foods. Journal of Applied Microbiology. December 1997, Vol. 83, N° 6, pages 727- 736. ISSN 1364-5072.	1-45
X	WO 2004/024944 A2 (GENESYSTEMS) 25.03.2004, the whole document.	1-45
X	US 5401631 A (LANE, D. J., SHAH, J., BUHARIN, A., WEISBURG, W. G.) 28.03.1995, the whole document.	25, 29-32
A		1-9, 45

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“T”	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.		
“E” earlier document but published on or after the international filing date		
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“X”	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“O” document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means	“Y”	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	“&”	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 July 2007 (13.07.2007)

Date of mailing of the international search report

(08/08/2007)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

E. Relaño Reyes

Telephone No. +34 91 349 85 04

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/MX 2007/000052

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PAILLARD, D., DUBOIS, V., DURAN, R. et al. Rapid identification of <i>Listeria</i> species by using restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 23S rRNA gene fragments. Applied and Environmental Microbiology. November 2003, Vol. 69, N° 11, pages 6386-6392. ISSN 0099-2240.	25, 29-32
A		1-9, 45
X	WATANABE, S., ITO, T., TAKEUCHI, F. et al. Structural comparison of ten serotypes of staphylocoagulases in <i>Staphylococcus aureus</i> . Journal of Bacteriology. June 2005, Vol. 187, N° 11, pages 3698-3707. ISSN 0021-9193.	26, 33-36
A		1-5, 10-13, 45
X	GORKIEWICZ, G., FEIERL, G., SCHOBER, C. et al. Species-specific identification of Campylobacters by partial 16S rRNA gene sequencing. Journal of Clinical Microbiology. June 2003, Vol. 41, N° 6, pages 2537-2546. ISSN 0095-1137.	27, 37-40
A		1-5, 14-17, 45
X	US 5654417 A (TARR, P. I., BILGE, S. S. & VARY, J. C.) 05.08.1997, the whole document.	28, 41-44
A		1-5, 18-21, 45
A	IBEKWE, A. M., WATT, P. M., GRIEVE, C. M. et al. Multiplex fluorogenic real-time PCR for detection and quantification of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 in dairy wastewater wetlands. Applied and Environmental Microbioloy. October 2002, Vol. 68, N° 10, pages 4853-4862. ISSN 0099-2240.	7-9, 11-13, 15-17, 19-24, 30-32, 34-36, 38-40, 42-44

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ MX 2007/000052

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004/024944 A2	25.03.2004	FR 2844523 A1 AU2003282157A1,A8	19.03.2004 30.04.2004
US 5401631 A	28.03.1995	CA 2031499 A WO 1990/015157 A AU 5950690 A EP 0431149 A, B1 JP 4500315 T AT 127530 T DE 69022180 D, T JP 3258658 B JP 2002051799 A JP 3368268 B2	01.12.1990 13.12.1990 07.01.1991 12.06.1991 23.01.1992 15.09.1995 12.10.1995 18.02.2002 19.02.2002 20.01.2003
US 5654417 A	05.08.1997	WO 1996/032405 A1 AU 5391396 A EP 0832090 A1, B1 AU 700752 B AT 254667 T DE 69630786 D DK 832090 T PT 832090 T ES 2211952 T3 DE 69630786 T	17.10.1996 30.10.1996 01.04.1998 14.01.1999 15.12.2003 24.12.2003 29.03.2004 30.04.2004 16.07.2004 30.09.2004
-	-	-	-

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q 1/68 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C12Q

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

CIBEPAT, EPODOC, WPI, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, XPESP, NPL, EMALL, TXTE, TXTF

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	FUKUSHIMA, H., TSUNOMORI, Y., SEKI, R. Duplex real-time SYBR green PCR assays for detection of 17 species of food or waterborne pathogens in stools. Journal of Clinical Microbiology. Noviembre 2003, Vol. 41, N° 11, páginas 5134-5146. ISSN 0095-1137.	1-45
X	WANG, R. F., CAO, W. W. CERNIGLIA, C. E. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne in foods. Journal of Applied Microbiology. Diciembre 1997, Vol. 83, N° 6, páginas 727- 736. ISSN 1364-5072.	1-45
X	WO 2004/024944 A2 (GENESYSTEMS) 25.03.2004, todo el documento.	1-45
X	US 5401631 A (LANE, D. J., SHAH, J., BUHARIN, A., WEISBURG, W. G.) 28.03.1995, todo el documento.	25, 29-32
A		1-9, 45

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.		
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.		
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

13 Julio 2007 (13.07.2007)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

08 de agosto de 2007 (08/08/2007)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

Nº de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

E. Relaño Reyes

Nº de teléfono +34 91 349 85 04

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/MX 2007/000052

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	PAILLARD, D., DUBOIS, V., DURAN, R. et al. Rapid identification of <i>Listeria</i> species by using restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 23S rRNA gene fragments. Applied and Environmental Microbiology. Noviembre 2003, Vol. 69, N° 11, páginas 6386-6392. ISSN 0099-2240.	25, 29-32
A		1-9, 45
X	WATANABE, S., ITO, T., TAKEUCHI, F. et al. Structural comparison of ten serotypes of staphylocoagulases in <i>Staphylococcus aureus</i> . Journal of Bacteriology. Junio 2005, Vol. 187, N° 11, páginas 3698-3707. ISSN 0021-9193.	26, 33-36
A		1-5, 10-13, 45
X	GORKIEWICZ, G., FEIERL, G., SCHOBER, C. et al. Species-specific identification of Campylobacters by partial 16S rRNA gene sequencing. Journal of Clinical Microbiology. Junio 2003, Vol. 41, N° 6, páginas 2537-2546. ISSN 0095-1137.	27, 37-40
A		1-5, 14-17, 45
X	US 5654417 A (TARR, P. I., BILGE, S. S. & VARY, J. C.) 05.08.1997, todo el documento.	28, 41-44
A		1-5, 18-21, 45
A	IBEKWE, A. M., WATT, P. M., GRIEVE, C. M. et al. Multiplex fluorogenic real-time PCR for detection and quantification of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 in dairy wastewater wetlands. Applied and Environmental Microbiology. Octubre 2002, Vol. 68, N° 10, páginas 4853-4862. ISSN 0099-2240.	7-9, 11-13, 15-17, 19-24, 30-32, 34-36, 38-40, 42-44

Recuadro I Secuencia(s) de nucleótidos y/o de aminoácidos (continuación del punto 1.c de la primera hoja)

1. En lo que se refiere a las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, la búsqueda se ha llevado a cabo sobre la base de:
 - a. Tipo de material
 - una lista de secuencias
 - tabla(s) relativas a la lista de secuencias
 - b. Formato del material
 - en papel
 - en formato electrónico
 - c. Fecha de presentación/entrega
 - contenido en la solicitud internacional tal y como se presentó
 - presentado junto con la solicitud internacional en formato electrónico
 - presentado posteriormente a esta Administración a los fines de la búsqueda
2. Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias y/o tabla relacionada con ella, se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente.
3. Comentarios adicionales:

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/MX 2007/000052

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO 2004/024944 A2	25.03.2004	FR 2844523 A1 AU2003282157A1,A8	19.03.2004 30.04.2004
US 5401631 A	28.03.1995	CA 2031499 A WO 1990/015157 A AU 5950690 A EP 0431149 A, B1 JP 4500315 T AT 127530 T DE 69022180 D, T JP 3258658 B JP 2002051799 A JP 3368268 B2	01.12.1990 13.12.1990 07.01.1991 12.06.1991 23.01.1992 15.09.1995 12.10.1995 18.02.2002 19.02.2002 20.01.2003
US 5654417 A	05.08.1997	WO 1996/032405 A1 AU 5391396 A EP 0832090 A1, B1 AU 700752 B AT 254667 T DE 69630786 D DK 832090 T PT 832090 T ES 2211952 T3 DE 69630786 T	17.10.1996 30.10.1996 01.04.1998 14.01.1999 15.12.2003 24.12.2003 29.03.2004 30.04.2004 16.07.2004 30.09.2004