

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 276 597**

21 Número de solicitud: 200501522

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/04** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**C12N 15/11** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **22.06.2005**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2007**

Fecha de la concesión: **20.05.2008**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **16.06.2008**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**16.06.2008**

73 Titular/es:  
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
c/ Serrano, 117  
28006 Madrid, ES  
CORPORACION ALIMENTARIA PEÑASANTA S.A.**

72 Inventor/es: **Álvarez González, Miguel Ángel;  
Hernández Magadán, Alfonso;  
Ariza Cobos, Manuela;  
Binetti, Ana Griselda;  
Martín Martín, María Cruz;  
Río Lagar, Beatriz del y  
Fernández García, María**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Detección e identificación de bacteriófagos de bacterias del ácido láctico mediante reacción en cadena de la polimerasa múltiple (MULTI-PCR) y sus aplicaciones.**

57 Resumen:

Detección e identificación de bacteriófagos de bacterias del ácido láctico mediante reacción en cadena de la polimerasa múltiple (MULTI-PCR) y sus aplicaciones.

La presente invención describe un procedimiento de detección e identificación, especialmente en leche, de trazas de bacteriófagos destructivos de especies de bacterias del ácido láctico (BAL) (*Lactococcus*, *Streptococcus* y *Lactobacillus*) utilizadas en fermentaciones lácticas industriales, mediante MULTI-PCR. La amplificación múltiple por PCR se realiza con oligonucleótidos cebadores específicos de regiones conservadas del genoma de estos bacteriófagos. Estos virus son la principal causa de fallo en las fermentaciones en las industrias lácteas, provocando importantes pérdidas. Este procedimiento permite tomar decisiones tales como destinar la leche contaminada hacia procesos donde no intervengan BAL sensibles a los fagos identificados o hacia tratamientos de inactivación, así como la desinfección de la planta de producción. La principal ventaja del procedimiento es la rapidez, junto con la especificidad, la sencillez y la sensibilidad.

ES 2 276 597 B1

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

## DESCRIPCIÓN

Detección e identificación de bacteriófagos de bacterias del ácido láctico mediante reacción en cadena de la polimerasa múltiple (MULTI-PCR) y sus aplicaciones.

5 **Sector de la técnica**

Industria alimentaria. Diagnóstico mediante la técnica de PCR. El método desarrollado puede ser aplicado en cualquier paso de los procesos de fermentación industrial en los que participen BAL (bacterias del ácido láctico) como cultivos iniciadores o como microbiota secundaria, principalmente en el sector lácteo, pero también en otros sectores como los de fermentación de vegetales, carnes o pescados.

**Estado de la técnica**

15 Algunas especies de BAL son esenciales en la Industria Alimentaria en general y en los procesos fermentativos de la leche en particular. Cualquier agente o factor capaz de retrasar o frenar esta fermentación, va a generar dificultades tecnológicas durante el proceso de fabricación (variaciones de pH, prolongación de los tiempos de fermentación, etc.), que derivarán en la obtención de productos defectuosos, perjudicando su rentabilidad económica. Tal es el caso de la infección por bacteriófagos de las BAL usadas como iniciadores (lactofagos) que, desde el punto de vista práctico, constituye la causa principal de problemas de fermentación (Josephsen y Neve. 1998. "Bacteriophages and lactic acid bacteria" in Lactic Acid Bacteria. Microbiology and functional aspects. Salmine and von Wright ed.). Estos virus se encuentran en las plantas industriales, tanto en la leche inicial, como en la leche pasteurizada (Chopin, M. C. 1980. Resistance of 17 mesophilic lactic Streptococcus bacteriophages to pasteurization and spray-drying. J. Dairy Res. 47:131-139.; J Jarvis, A. W. 1987. Sources of lactic streptococcal phages in cheese plants. N. Z. J. Dairy Sci. 22:93-103.). Por este motivo, se requieren sistemas analíticos sensibles, capaces de identificar fagos en leche, y rápidos, de forma que no sea necesario el almacenamiento de la leche mientras se realiza el análisis.

*Lactococcus lactis* participa como iniciador en la producción de queso, proceso que puede ser alterado debido a la acción de fagos específicos. Estos se clasifican en base a su similitud genética en doce especies o grupos (Jarvis, A. W., G. F. Fitzgerald, M. Mata, A. Mercenier, H. Neve, I. A. Powell, C. Ronda, M. Saxelin, and M. Teuber. 1991. Species and type phages of lactococcal bacteriophages. Intervirology 32:2-9.) de los que solamente tres (936, C2 y P335) se encuentran en plantas industriales (Moineau, S., M. Borkeav, B. J. Holler, S. A. Walker, J. K. Kondo, E. R. Vedamuthu, and P. A. Vandenberg. 1996. Isolation and characterization of lactococcal bacteriophages from cultured buttermilk plants in the United States. J. Dairy Sci. 79:2104-2111.; Moineau, S., J. Fortier, H.-W. Ackermann, and S. Pandian. 1992. Characterization of lactococcal bacteriophages from Quebec cheese plants. Can. J. Microbiol. 38:875-882). *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* son otras dos especies de BAL de gran importancia industrial ya que se utilizan como iniciadores en la producción de yogur. El extenso uso que en los últimos años se ha hecho de *St. thermophilus* como iniciador en la producción de queso, ha promovido el aumento de fallos en las fermentaciones debido a la acción de fagos específicos. *Lb. delbrueckii* tampoco es ajeno a las infecciones virales, aunque en este caso los fagos han sido menos estudiados ya que no se han relacionado tan frecuentemente con problemas en las fermentaciones industriales.

Cuando el proceso de acidificación se retrasa durante la fermentación, el procedimiento más usual es analizar la leche inicial para detectar fagos usando métodos microbiológicos estándares (ensayo en placa, test de actividad) (Everson, T. C. 1991. Control of phage in the dairy plant. Bull. Int. Dairy Fed. 263:24-28). Estos métodos proporcionan información sobre la sensibilidad del cultivo, pero tienen la desventaja de ser muy lentos (se necesitan varios días) y de no distinguir entre especies de fagos. Por otro lado, las técnicas de biología molecular como las sondas de DNA (Moineau, S., J. Fortier, and S. Pandian. 1992. Direct detection of lactococcal bacteriophages in cheese whey using DNA probes. FEMS Microbiol. Lett. 92:169-174) y los ensayos ELISA (Lembke, J., and M. Teuber. 1979. Detection of bacteriophages in whey by an enzyme-linked immunosorbent assay. Milchwissenschaft 34:457-458; Moineau, S., D. Bernier, M. Jobin, J. Hébert, T. R. Klaenhammer, and S. Pandian. 1993. Production of monoclonal antibodies against the major capsid protein of the Lactococcus bacteriophage uI36 and development of an enzyme-linked immunosorbent assay for direct phage detection in whey and milk. Appl. Environ. Microbiol. 59:2034-2040.) permiten detectar especies de fagos, pero no detectan ciclos de actividad lítica. Además, estas técnicas moleculares tienen una baja sensibilidad de detección ( $10^7$  PFU/mL) y se necesitan varias reacciones para identificar las distintas especies (una reacción por especie).

Sin embargo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que amplifica el número de copias de DNA (Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239:487-491), permite detectar e identificar especies de virus presentes en diferentes tipos de muestras (Brüssow, H., M. Fremont, A. Bruttin, J. Sidoti, A. Constable, and V. Fryder. 1994. Detection and classification of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from industrial milk fermentation. Appl. Environ. Microbiol. 60:4537-4543. Labrie y Moineau, 2000 (Labrie S, Moineau S. 2000. Multiplex PCR for detection and identification of lactococcal bacteriophages. Appl Environ Microbiol. 66(3):987-94) han descrito tres juegos de oligonucleótidos específicos para la detección por PCR de las tres especies de fagos de *Lactococcus lactis* que causan problemas en la Industria Láctea. Este sistema requiere una reacción de PCR distinta para cada una de estas tres especies de fagos y no permite detectar fagos que infecten otras especies de LAB usadas como iniciadores. Nuestro objetivo era diseñar tres nuevas parejas de oligonucleótidos para poder detectar

e identificar las tres familias de fagos en una única reacción de PCR, haciendo que los productos de amplificación se distinguan entre si por su tamaño molecular.

## Descripción de la invención

### - Descripción breve

La presente invención consiste en la detección e identificación en leche, de forma rápida y sensible, de fagos que infectan BAL utilizadas como fermentos en la Industria Láctea. La detección se realiza mediante PCR usando oligonucleótidos cebadores específicos para las distintas especies de fagos relacionadas con problemas tecnológicos en este sector. El procedimiento permitirá destinar la leche contaminada hacia procesos en los que no intervengan iniciadores sensibles a los virus detectados o hacia procesos en los que el tratamiento aplicado sea capaz de inactivarlos. La detección de fagos en otros puntos críticos de las plantas de producción aconsejaría una desinfección en profundidad de las instalaciones.

Este sistema permite, además de su detección, su identificación, mediante el uso de las parejas de oligonucleótidos específicos de los lactofagos más representativos, orf18 del fago DT1, mur del fago LL-H, orf21 del fago Tuc2009, msp del fago Bil170 y mcp del fago C2 y bajo unas condiciones adecuadas para la amplificación específica de los fragmentos de doble cadena flanqueados por cada una de estas parejas de cebadores.

La novedad de la presente invención radica en el uso conjunto de las cinco parejas de oligonucleótidos cebadores y del procedimiento de Multi-PCR en una sola reacción de amplificación para la detección e identificación rápida, en muestras de leche y sus derivados, de fagos de *St. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* y *Lc. lactis* perjudiciales para la Industria Láctea.

Finalmente, otro objeto de la presente invención lo constituye un kit de diagnóstico de bacteriófagos por PCR mediante los genes equivalentes a: orf18 del fago DT1, mur del fago LL-H, orf21 del fago Tuc2009, msp del fago Bil170 y mcp del fago C2, que utilice para ello cualquier combinación posible de oligonucleótidos cebadores que contenga las parejas de oligonucleótidos cebadores de la presente invención.

Las ventajas más importantes del procedimiento que se propone, son, además de la especificidad y la sencillez, la altísima sensibilidad y sobre todo la rapidez. En cuanto a la especificidad, por métodos clásicos es necesario realizar un ensayo para cada tipo de fago que se quiera detectar y el resultado siempre dependerá del tipo de cepa que se use como hospedadora, ya que estos fagos tienen un estrechísimo rango de hospedador, de forma que, en general, sólo son capaces de infectar determinadas cepas de una especie. Con este método de multiPCR que proponemos, en un solo test se pueden detectar todos los fagos peligrosos para la Industria Láctea. Además de su probada y total especificidad, es mucho más sencillo y por tanto más fácil de automatizar y muy sensible.

El segundo tema clave, es que, como se ha dicho, la detección de fagos en la leche de partida de la Industria Láctea es difícil de llevar a cabo en un tiempo razonable con los métodos tradicionales, basados en el desarrollo de estos virus sobre céspedes de bacterias presuntamente sensibles o en la falta de acidificación de una muestra. Así, la principal ventaja sería la rapidez, ya que para la aplicación de métodos tradicionales se necesitan días, siendo absolutamente inviable la inmovilización de la leche durante estos periodos de tiempo, y por nuestro método unas pocas horas, un margen de tiempo que si es razonable. Así, partiendo de una muestra de 1  $\mu$ L de leche, se puede conocer, en menos de 4 horas, si esta muestra está contaminada con fagos que puedan interferir en los procesos fermentativos de la leche y cuál es la bacteria hospedadora de los fagos detectados. Igualmente, se pueden analizar alimentos ya elaborados, por ejemplo productos lácteos como el yogur, cuajadas y queso entre otros. La detección de fagos en los productos finales podría recomendar una desinfección a fondo de la planta, incluso aunque no se hubiesen apreciado problemas en la fermentación, con el fin de evitar dificultades en fermentaciones posteriores.

### - Descripción detallada

La presente invención consiste en un procedimiento de detección por amplificación simultánea mediante Multi-PCR, a partir de muestras de leche o de derivados de su fermentación, y en una única reacción, de trazas de bacteriófagos destructivos de especies de bacterias del ácido láctico (BAL) a través de la detección de genes equivalentes a los que se describen más adelante. Se pueden detectar e identificar rápida y eficazmente, mediante el uso de las parejas de oligonucleótidos específicos y bajo unas condiciones adecuadas para la amplificación específica de los fragmentos de doble cadena flanqueados por estas parejas de oligonucleótidos, las tres especies de fagos de *Lc. lactis*, así como fagos de *St. thermophilus* y de *Lb. delbrueckii*, especies que componen los iniciadores usados en la industria láctea.

#### *Diseño de los cebadores y de la reacción de PCR*

El diseño de los cebadores adecuados que permitan la amplificación específica del fragmento de DNA deseado, comienza con la comparación de las secuencias nucleotídicas del gen que se desee amplificar, procedentes de distintos fagos que infectan la misma especie bacteriana. Esta comparación nos permite identificar las zonas conservadas que serán comunes para estos fagos.

En la invención que se presenta, se diseñaron oligonucleótidos específicos para las tres especies de fagos de *Lc. Lactis* y para los fagos de *St. thermophilus* y *Lb. delbrueckii*. Estos oligonucleótidos cebadores se diseñaron a partir de las secuencias nucleotídicas de genes específicos de los lactofagos más representativos, orf18 del fago DT1, mur del fago LL-H, orf21 del fago Tuc2009, msp del fago Bil170 y mcp del fago C2. La comparación de las secuencias de nucleótidos de estos genes con las de los genes equivalentes presentes en los genomas de los fagos secuenciados hasta la fecha, ha permitido la identificación de regiones altamente conservadas dentro de cada grupo de fagos y que no están presentes en las otras especies. Estas secuencias son por tanto buenas candidatas para el diseño y la definición de oligonucleótidos cebadores para su uso en reacciones de PCR que permita amplificar fragmentos internos identificadores de los genes orf18, mur, orf21, msp y mcp y por tanto la determinación de la existencia de fagos que infectan BAL en las muestras, de forma que amplifiquen fragmentos específicos de DNA que se distingan entre si por su peso molecular de forma rápida y sensible y de forma que se puedan utilizar todos juntos en la misma reacción mediante la técnica denominada Multi-PCR.

Recientemente, Duplessis, M. and Moineau, S., (2001. Identification of a genetic determinant responsible for host specificity in *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *Molecular Microbiology* 41(2), 325-336) caracterizaron el gen implicado en el reconocimiento del hospedador (orf18) de los fagos DT1 y MD4 de *St. thermophilus*, identificando una región variable (VR2) que se halla directamente relacionada con la especificidad de ambos fagos por sus correspondientes cepas hospedadoras. Esta región está flanqueada por zonas muy conservadas presentes en el genoma de todos los fagos de *St. thermophilus* secuenciados hasta este momento, pero no en los que infectan otras bacterias. En base a la secuencia de las pautas abiertas de lectura equivalentes a orf18 de los fagos DT1, MD2, Sfi19, Sfi21 y Q5 (Figura 1) se diseñaron, como parte de la presente invención, los oligonucleótidos cuyas secuencias son SEQ ID NO1 y SEQ ID NO2.

Vasala y coas. (Vasala A, Valkkila M, Caldentey J, Alattosava T. 1995. Genetic and biochemical characterization of the *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* bacteriophage LL-H lysin. *Appl Environ Microbiol.* 61(11):4004-11) localizaron el gen mur que codifica la enzima muramidasa en el fago LL-H que infecta *Lb. delbrueckii*. Comparamos la secuencia nucleotídica del gen mur del fago LL-H con las secuencias nucleotídicas correspondientes a este gen de otros fagos que infectan *Lb. delbrueckii* descritas en la literatura. Encontramos homología de este gen con los genes lysA de los fagos mv4 (número de acceso Genebank Z26590) y lysA del fago mv1 (Boizet B, Lahbib-Mansais Y, Dupont L, Ritzenthaler P, Mata M. 1990. Cloning, expression and sequence analysis of an endolysin-encoding gene of *Lactobacillus bulgaricus* bacteriophage mv1. *Gene.* 28;94(1):61-7., número de acceso Genebank M60167) (Figura 2). En estos genes se localizan regiones conservadas en base a las cuales se diseñó, como parte de la presente invención, una pareja de oligonucleótidos cuyas secuencias son SEQ ID NO3 y SEQ ID NO4.

En los genomas de fagos que infectan *Lc. lactis*, existen regiones conservadas y específicas para cada una de las tres familias de fagos (P335, C2 y 936). Labrie y Moineau, (Labrie S, Moineau S. 2000. Multiplex PCR for detection and identification of lactococcal bacteriophages. *Appl Environ Microbiol.* 66(3):987-94) encontraron que la región correspondiente al gen orf21 del fago Tuc2009, que codifica una proteína de función desconocida, se encuentra conservada en la mayoría de los fagos pertenecientes a la especie P335 (similitud de secuencia nucleotídica del 94%). Se comparó la secuencia nucleotídica del gen orf21 del fago Tuc2009 (número de acceso Genebank AF109874) con las secuencias correspondientes de los fagos Bil285 (número de acceso Genebank AF323668), u136A (número de acceso Genebank AF152415), Q30 (número de acceso Genebank AF152414) y r1t (número de acceso Genebank U38906) (Figura 3). En la región mas conservada de este gen se diseñaron, como un ejemplo de realización de la presente invención, una pareja de oligonucleótidos cuyas secuencias son SEQ ID NO5 y SEQ ID NO6.

La comparación de las secuencias nucleotídicas del gen msp de seis fagos pertenecientes a la familia 936 (SK1, p2, F4-1, Q42, Bil170 y Q7 ), revela una homología del 82,2% (Labrie S, Moineau S. 2000. Multiplex PCR for detection and identification of lactococcal bacteriophages. *Appl Environ Microbiol.* 66(3):987-94). Este gen codifica la proteína mayoritaria de la cápsida. Se comparó la secuencia nucleotídica correspondiente a este gen de los fagos Bil170 (número de acceso Genebank AF009630), Q7 (número de acceso Genebank AF152409), Q42 (número de acceso Genebank AF152408), p2 (número de acceso Genebank AF152407) y sk1 (número de acceso Genebank AF011378) (Figura 4). En la región mas conservada de este gen se diseñaron, como un ejemplo de realización de la presente invención, una pareja de oligonucleótidos cuyas secuencias son SEQ ID NO7 y SEQ ID NO8.

La comparación de las secuencias nucleotídicas del gen mcp de cinco fagos pertenecientes a la familia C2 (C2, Bil167, eb1, Q38 y Q44 ), revela una homología del 82% (Labrie S, Moineau S. 2000. Multiplex PCR for detection and identification of lactococcal bacteriophages. *Appl Environ Microbiol.* 66(3):987-94). Este gen codifica la proteína mayoritaria de la cápsida. Se comparó la secuencia nucleotídica correspondiente a este gen de los fagos C2 (número de acceso Genebank L48605), eb1 (número de acceso Genebank AF152410), Q38 (número de acceso Genebank AF152411) y Q44 (número de acceso Genebank AF152412) (Figura 5). En la región mas conservada de este gen se diseñaron, como un ejemplo de realización de la presente invención, una pareja de oligonucleótidos cuyas secuencias son SEQ ID NO9 y SEQ ID NO10.

Los fragmentos de DNA comprendidos entre los cebadores que forman las parejas diseñadas son de distinto peso molecular, por lo que el tamaño de los productos de PCR nos permite identificar el tipo de bacteriófago.

Así, en resumen las cinco parejas de oligonucleótidos específicos diseñados constituyen parte integrante de esta invención y serían

## ES 2 276 597 B1

- La pareja de oligonucleótidos *host1* (SEQ ID NO1) y *host5* (SEQ ID NO2) específicos del gen *orf18* del fago DT1 que infecta *St. thermophilus* y que permiten la amplificación específica por PCR del gen *orf18* del fago DT1 y del gen equivalente (*hsp*) de todos los fagos conocidos que infectan *St. Thermophilus*:

5 - La pareja de oligonucleótidos *Lb1* (SEQ ID NO3) y *Lb2*. (SEQ ID NO4) específicos del gen *mur* del fago LL-H que infecta *Lb. delbrueckii* que permiten la amplificación específica por PCR del gen *mur* de del fago LL-H y de los genes equivalentes de todos los fagos conocidos que infectan *Lb. delbrueckii*:

10 - La pareja de oligonucleótidos específicos 335A (SEQ ID NO5) y 335B (SEQ ID NO6) del gen *orf21* del fago Tuc2009 que forma parte de la especie de fagos P335 que infectan *Lc. lactis*, que permiten la amplificación específica por PCR del gen *orf21* de todos los genes equivalentes de los fagos de la especie P335 conocidos:

15 - La pareja de oligonucleótidos específicos 936A (SEQ ID NO7) y 936B (SEQ ID NO8) del gen *msp* del fago Bil170 que forma parte de la especie de fagos 936 que infectan *Lc. lactis*, que permiten la amplificación específica por PCR del gen *msp* y de los genes equivalentes de todos los fagos de la especie 936 conocidos:

20 - La pareja de oligonucleótidos específicos C2A (SEQ ID NO9) y C2B (SEQ ID NO10) del gen *mcp* del fago C2 que forma parte de la especie de fagos C2 que infectan *Lc. lactis*, que permiten la amplificación específica por PCR del gen *mcp* y de los genes equivalentes de todos los fagos de la especie C2 conocidos.

25 Así, un objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de detección de bacteriófagos de cultivos iniciadores lácticos por amplificación de los genes *orf18* del fago DT1, *mur* del fago LL-H, *orf21* del fago Tuc2009, *msp* del fago Bil170 y *mcp* del fago C2, así como de los genes correspondientes de otros fagos, por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en adelante procedimiento de la presente invención, basado en el uso de cualquier combinación posible de oligonucleótidos que contenga los cebadores específicos de la presente invención para cada uno de los genes mencionados, los oligonucleótidos SEQ ID NO1, SEQ ID NO2, SEQ ID NO3, SEQ ID NO4, SEQ ID NO5, SEQ ID NO6, SEQ ID NO7, SEQ ID NO8, SEQ ID NO9 y SEQ ID NO10, y bajo unas condiciones adecuadas de amplificación del fragmento de doble cadena flanqueado por dichos oligonucleótidos. Hay que señalar que las condiciones de la reacción PCR pueden adaptarse fácilmente por un experto medio de la técnica de la presente invención dependiendo del termociclador, pudiéndose modificar las condiciones de desnaturalización, la temperatura de anillamiento, la temperatura de extensión, la polimerasa, así como la secuencia de los cebadores, etc, de tal forma que estos procedimientos de amplificación de los genes *orf18*, *mur*, *orf21*, *msp* y *mcp* por PCR forman parte de la presente invención.

35 Otro objeto de la presente invención lo constituye un kit de diagnóstico por PCR para la detección de fagos que infectan *St. thermophilus*, *Lc. lactis* y *Lb. delbrueckii*, que contenga las parejas de oligonucleótidos cebadores de la presente invención o cualquier combinación posible que los incluya.

40 Finalmente, otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de las parejas de oligonucleótidos cebadores y del procedimiento de la presente invención para la amplificación por PCR de los genes *orf18* del fago DT1, *mur* del fago LL-H, *orf21* del fago Tuc2009, *msp* del fago Bil170 y *mcp* del fago C2, con objeto de detectar fagos que infectan *St. thermophilus*, *Lc. lactis* y *Lb. delbrueckii* en muestras de leche o derivados. La detección de estos fagos en la leche de partida permitirá tomar decisiones sobre su destino hacia el consumo directo o distintos procesos fermentativos, permitiendo el análisis de dichos procesos y de los productos resultantes. La detección de fagos en puntos críticos del procesamiento de la leche podría aconsejar la desinfección de la planta de producción o de alguno de sus componentes.

### Descripción de las figuras

50 Figura 1.- Comparación de las secuencias nucleotídicas del gen *orf18* del fago DT1 con las secuencias de los genes equivalentes de los fagos DT2 (número de acceso Genebank AF348739), MD2 (número de acceso Genebank AF348736), Sfi21 (número de acceso Genebank AF115103), Sfi19 (número de acceso Genebank AF115102) y Q5 (número de acceso Genebank AF348734). Los residuos nucleotídicos idénticos en las secuencias están gris, cursiva y subrayado. Las secuencias de nucleótidos correspondientes a los oligonucleótidos están sobre fondo gris.

55 Figura 2.- Comparación de las secuencias nucleotídicas del gen *mur* del fago LL-H (número de acceso Genebank M96254) con las secuencias de los genes equivalentes de los fagos mv4 (número de acceso Genebank Z26590), mv1 (número de acceso Genebank M60167). Los residuos nucleotídicos idénticos en las secuencias están gris, cursiva y subrayado. Las secuencias de nucleótidos correspondientes a los oligonucleótidos están sobre fondo gris.

60 Figura 3.- Comparación de las secuencias nucleotídicas del gen *orf21* del fago Tuc2009 (número de acceso Genebank AF109874) con las secuencias de los genes equivalentes de los fagos Bil285 (número de acceso Genebank AF323668), ul36A (número de acceso Genebank AF152415), Q30 (número de acceso Genebank AF152414) y r1t (número de acceso Genebank U38906). Los residuos nucleotídicos idénticos en las secuencias están gris, cursiva y subrayado. Las secuencias de nucleótidos correspondientes a los oligonucleótidos están sobre fondo gris.

65 Figura 4.- Comparación de las secuencias nucleotídicas del gen *msp* del fago Bil170 (número de acceso Genebank AF009630) con las secuencias de los genes equivalentes de los fagos Q7 (número de acceso Genebank AF152409), Q42 (número de acceso Genebank AF152408), p2 (número de acceso Genebank AF152407) y sk1 (número de acceso

## ES 2 276 597 B1

Genebank AFO11378). Los residuos nucleotídicos idénticos en las secuencias están gris, cursiva y subrayado. Las secuencias de nucleótidos correspondientes a los oligonucleótidos están sobre fondo gris.

5 Figura 5.- Comparación de las secuencias nucleotídicas del gen *mcp* del fago C2 (número de acceso Genebank L48605) con las secuencias de los genes equivalentes de los fagos *eb1* (número de acceso Genebank AF152410), *Q38* (número de acceso Genebank AF152411) y *Q44* (número de acceso Genebank AF152412). Los residuos nucleotídicos idénticos en las secuencias están gris, cursiva y subrayado. Las secuencias de nucleótidos correspondientes a los oligonucleótidos están sobre fondo gris.

10 Figura 6.- Análisis en gel de agarosa de los productos de PCR de una muestra de leche infectada artificialmente con los fagos *Tuc2009*, *bIL170*, *C2*, *LL-H* y *DT1*. Calle 1: Marcador de tamaño molecular; Calle 2: control negativo (sin fago); Calle 3: fago *Tuc2009*; Calle 4: fago *bIL170*; Calle 5: fago *C2*; Calle 6: fago *LL-H*; Calle 7: fago *DT1*.

15 Figura 7.- Análisis en gel de agarosa de los productos de Multi-PCR de muestras de leche y de yogur. A: Calle 1: marcador 100 pb, Calle 2: 1  $\mu$ l de leche. B: Calle 1: marcador 100 pb, Calle 2: 1  $\mu$ l de yogur. C: Calle 1: marcador de 100 pb, Calle 2; 1  $\mu$ l de leche, Calle 3: 1  $\mu$ l de yogur.

### Ejemplo de realización de la invención

20 Ejemplo 1

*Identificación de fagos de BAL usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en una muestra de leche infectada artificialmente con los fagos DT1, LL-H, Tuc2009, Bil170 y C2*

25 Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador iCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad). Se utilizó un kit de PCR (Amersham) en el que se incluyen los cuatro dideoxinucleótidos 1  $\mu$ M, 1 U de Taq Polimerasa y tampón de reacción para un volumen final de 25  $\mu$ L. Se añadieron 0,5 U de pirofosfatasa (Biotools) y 0,4  $\mu$ M de los cebadores SEQ ID NO1, SEQ ID NO2, SEQ ID NO3, SEQ ID NO4, SEQ ID NO5, SEQ ID NO6, SEQ ID NO7, SEQ ID NO8, SEQ ID NO9, SEQ ID NO10).

30 Se prepararon muestras de leche y de yogur contaminadas artificialmente con 10<sup>6</sup> PFU/ml de los distintos tipos de fagos (*DT1*, *LL-H*, *Tuc2009*, *Bil170* y *C2*) que se pretenden detectar. A la mezcla de reacción previamente descrita se le añadió 1  $\mu$ L de muestra leche infectada.

35 Las condiciones de la reacción son las siguientes:

✓ un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos.

✓ 35 ciclos:

- 40 • Desnaturalización a 94°C (30 segundos)
- Anillamiento a 50°C (1 minuto)
- 45 • Extensión a 72°C (1 minuto).

✓ Incubación a 72°C durante 7 minutos para permitir la finalización de todas las cadenas iniciadas previamente.

50 Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1,5% en tampón Tris-Borato EDTA (Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1982. Molecular cloning. A laboratory manual. 2ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York). Después de la electroforesis los geles se tiñeron con bromuro de etidio (1  $\mu$ g/ml) y se visualizaron con luz ultravioleta (300 nm). Como patrón de tamaño molecular se utilizó un marcador de 100 pb PCR (Biorad).

55 Mediante la electroforesis en gel de agarosa, se pudo observar que los oligonucleótidos y las condiciones de la reacción de PCR diseñados permitían la amplificación de fragmentos de DNA del tamaño esperado (Figura 6). Mediante secuenciación automática del DNA amplificado, se comprobó que se correspondían con los genes diana (Servicio de Secuenciación Automática de DNA, CIB, Madrid).

Ejemplo 2

60 *Identificación de fagos de BAL en muestras de yogures proporcionadas por la Corporación Alimentaria Peña Santa, S.A. (C.A.P.S.A) usando la invención de Multi-PCR*

65 Se analizó la presencia de bacteriófagos que infectan BAL en muestras proporcionadas por C.A.P.S.A. Se seleccionaron yogures que habían sufrido un retraso en el tiempo de fermentación y otros que no, así como muestras de la leche utilizada en la producción de estos yogures.

## ES 2 276 597 B1

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador iCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad). Se utilizó un kit de PCR (Amersham) en el que se incluyen los cuatro dideoxinucleótidos 1  $\mu$ M, 1U de Taq Polimerasa y tampón de reacción para un volumen final de 25  $\mu$ L. Se añadieron 0,5 U de pirofosfatasa (Biotools) y 0,4  $\mu$ M de los cebadores SEQ ID NO1, SEQ ID NO2, SEQ ID NO3, SEQ ID NO4, SEQ ID NO5, SEQ ID NO6, SEQ ID NO7, SEQ ID NO8, SEQ ID NO9, SEQ ID NO10).

A la mezcla de reacción previamente descrita se le añadió 1  $\mu$ L de muestra yogur.

Las condiciones de la reacción son las siguientes:

✓ un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos.

✓ 35 ciclos:

• Desnaturalización a 94°C (30 segundos)

• Anillamiento a 50°C (1 minuto)

• Extensión a 72°C (1 minuto).

✓ Incubación a 72°C durante 7 minutos para permitir la finalización de todas las cadenas iniciadas previamente.

Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1,5% en tampón Tris-Borato EDTA (Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1982. Molecular cloning. A laboratory manual. 2ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York). Después de la electroforesis los geles se tiñeron con bromuro de etidio (1  $\mu$ g/ml) y se visualizaron con luz ultravioleta (300 nm). Como patrón de tamaño molecular se utilizó un marcador de 100 pb PCR (Biorad).

En la Figura 7 se muestran los fragmentos de DNA amplificados por Multi-PCR. Los fragmentos amplificados de 730 pb de las Figuras 7A y 7B corresponden a la amplificación de genes equivalentes al gen orf18 del fago DT1 que infecta *St. Thermophilus* (componente del fermento del yogur), como se demostró por secuenciación automática. Estas muestras corresponden a yogures en los que la fermentación se había retrasado. Los fragmentos amplificados de 196 pb y 318 pb que se muestran en la Figura 7C, calles 2 y 3, corresponden a la amplificación de genes equivalentes a orf21 del fago Tuc2009 y a msp del fago Bil170, respectivamente, como se demostró por secuenciación automática. Ambos fagos infectan *Lc. Lactis*, bacteria que no forma parte del fermento del yogur y de hecho los yogures correspondientes no habían sufrido retraso en la fermentación. La leche contaminada con estos fagos podría utilizarse en producción de yogures pero no en otros productos lácteos en los que *Lc. lactis* se emplee como fermento. Los resultados de los ejemplos 1 y 2 demuestran la eficacia de la invención para la detección de fagos que infectan BAL en muestras de leche y yogures procedentes de la Industria Láctea, así como su utilidad para decidir el destino de la leche en función de la carga viral que presente.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de detección e identificación simultánea de bacteriófagos de bacterias del ácido láctico **caracterizado** por el uso la técnica de reacción en cadena de la polimerasa MÚLTIPLE (MULTI-PCR), mediante una única reacción con cebadores que comprenden oligonucleótidos específicos de los genes orf18 del fago DT1 y sus equivalentes en otros fagos que infectan *St. thermophilus*; mur del fago LL-H y sus equivalentes en otros fagos que infectan *Lb. delbrueckii*; orf21 del fago Tuc2009, msp del fago Bil170 y mcp del fago C2 y sus equivalentes en otros fagos que infectan *Lc. lactis*.

2. Procedimiento de detección e identificación simultánea de bacteriófagos de bacterias del ácido láctico según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la pareja de oligonucleótidos específicos del gen orf18 del fago DT1 y de los genes equivalentes presentes en otros fagos que infectan *St. thermophilus* está constituida por los oligonucleótidos SEQ ID NO1 y SEQ ID NO2.

3. Procedimiento de detección e identificación simultánea de bacteriófagos de bacterias del ácido láctico según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la pareja de oligonucleótidos específicos del gen mur del fago LL-H y de los genes equivalentes presentes en otros fagos que infectan *Lb. delbrueckii* está constituida por los oligonucleótidos SEQ ID NO3 y SEQ ID NO4.

4. Procedimiento de detección e identificación simultánea de bacteriófagos de bacterias del ácido láctico según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la pareja de oligonucleótidos específicos del gen orf21 del fago Tuc2009 y de los genes equivalentes presentes en otros fagos que forman parte de la especie P335 de *Lc. lactis* está constituida por los oligonucleótidos SEQ ID NO5 y SEQ ID NO6.

5. Procedimiento de detección e identificación simultánea de bacteriófagos de bacterias del ácido láctico según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la pareja de oligonucleótidos específicos del gen msp del fago Bil170 y de los genes equivalentes presentes en otros fago de la especie 936 de *Lc. lactis* está constituida por los oligonucleótidos SEQ ID NO7y SEQ ID NO8.

6. Procedimiento de detección e identificación simultánea de bacteriófagos de bacterias del ácido láctico según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la pareja de oligonucleótidos específicos del gen mcp del fago C2 y de los genes equivalentes presentes en otros fagos de la especie de fagos C2 de *Lc. lactis* está constituida por los oligonucleótidos SEQ ID NO9 y SEQ ID NO10.

7. Procedimiento de detección e identificación simultánea de bacteriófagos de bacterias del ácido láctico según las reivindicaciones 1 a 6 **caracterizado** porque la técnica multi-PCR para la amplificación de los fragmentos de doble cadena se realiza con las parejas de oligonucleótidos cebadores indicados en las reivindicaciones 2 a 6 correspondientes a las cinco parejas de oligonucleótidos específicos de los genes orf18, mur, orf21, msp y mcp de los fagos DT1, LL-H, Tuc2009, Bil170 y C2 y sus equivalentes en otros fagos y bajo las siguientes condiciones preferentes:

✓ un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos.

✓ 35 ciclos:

- Desnaturalización a 94°C (30 segundos)
- Anillamiento a 50°C (1 minuto)
- Extensión a 72°C (1 minuto)

✓ Incubación a 72°C durante 7 minutos para permitir la finalización de todas las cadenas iniciadas previamente.

8. Procedimiento de detección e identificación simultánea de bacteriófagos de bacterias del ácido láctico según las reivindicaciones 1 a 7 **caracterizado** porque utiliza como material de partida productos vegetales o animales.

9. Procedimiento de detección e identificación simultánea de bacteriófagos de bacterias del ácido láctico según la reivindicaciones 8 **caracterizado** porque utiliza como material de partida productos de origen animal, leche o derivados lácteos.

10. Procedimiento de detección e identificación simultánea de bacteriófagos de bacterias del ácido láctico según la reivindicaciones 8 **caracterizado** porque utiliza como material de partida productos de origen animal, carnes o pescados.

11. Pareja de nucleótidos cebadores específicos del gen orf18 del fago DT1 y de los genes equivalentes presentes en otros fagos que infectan *St. thermophilus* **caracterizados** por presentar la siguientes secuencias nucleotídicas SEQ ID NO1 y SEQ ID NO2 y por permitir la amplificación específica de dichos genes por PCR según el procedimiento indicado en las reivindicaciones 1 a 10.

## ES 2 276 597 B1

12. Pareja de nucleótidos cebadores específicos del gen mur del fago LL-H y de los genes equivalentes presentes en otros fagos que infectan *Lb. delbrueckii* **caracterizados** por presentar la siguientes secuencias nucleotídicas SEQ ID NO3 y SEQ ID NO4 y por permitir la amplificación específica de dichos genes por PCR según el procedimiento indicado en las reivindicaciones 1 a 10.

5

13. Pareja de nucleótidos cebadores específicos del gen orf21 del fago Tuc2009 y de los genes equivalentes presentes en otros fagos que forman parte de la especie P335 de *Lc. lactis* **caracterizados** por presentar la siguientes secuencias nucleotídicas SEQ ID NO5 y SEQ ID NO6 y por permitir la amplificación específica de dichos genes por PCR según el procedimiento indicado en las reivindicaciones 1 a 10.

10

14. Pareja de nucleótidos cebadores específicos del gen msp del fago Bil170 y de los genes equivalentes presentes en otros fago de la especie 936 de *Lc. lactis* **caracterizados** por presentar la siguientes secuencias nucleotídicas SEQ ID NO7 y SEQ ID NO8 y por permitir la amplificación específica de dichos genes por PCR según el procedimiento indicado en las reivindicaciones 1 a 10.

15

15. Pareja de nucleótidos cebadores específicos del gen mcp del fago C2 y de los genes equivalentes presentes en otros fagos de la especie de fagos C2 de *Lc. lactis* **caracterizados** por presentar la siguientes secuencias nucleotídicas SEQ ID NO9 y SEQ ID NO10 y por permitir la amplificación específica de dichos genes por PCR según el procedimiento indicado en las reivindicaciones 1 a 10.

20

16. Kit de diagnóstico por Multi-PCR para la detección e identificación simultánea de bacteriófagos que infectan a bacterias del ácido láctico (*St. thermophilus.*, *Lb. Delbrueckii*, *Lc. Lactis*) **caracterizado** por amplificarse por el procedimiento indicado en las reivindicaciones 1 a 10, los genes orf18 del fago DT1, mur del fago LL-H, orf21 del fago Tuc2009, msp del fago Bil170 y mcp del fago C2 o sus genes equivalentes presentes en otros fagos de las mismas especies y que contenga los oligonucleótidos cebadores específicos según las reivindicaciones 11 a 15.

25

17. Uso del procedimiento en procesos de fermentación o en la fabricación de cultivos iniciadores según las reivindicaciones 1 a 10 y de las parejas de oligonucleótidos cebadores para la amplificación por PCR de los genes equivalentes a los genes orf18, mur, orf21, msp y mcp, según las reivindicaciones 11 a 15 para la detección e identificación de fagos que infectan *St. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* y *Lc. lactis* en alimentos en general y productos vegetales y/o animales en particular, así como en aditivos de los mismos y en los cultivos iniciadores.

30

18. Uso del procedimiento en procesos de fermentación según las reivindicaciones 1 a 10 y de las parejas de oligonucleótidos cebadores para la amplificación por PCR de los genes equivalentes a los genes orf18, mur, orf21, msp y mcp, según las reivindicaciones 11 a 15 para la identificación de fagos que infectan *St. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* y *Lc. lactis* en muestras de leche, permitiendo decidir su destino más adecuado.

35

19. Uso del procedimiento en procesos de fermentación según las reivindicaciones 1 a 10 y de las parejas de oligonucleótidos cebadores para la amplificación por PCR de los genes equivalentes a los genes orf18, mur, orf21, msp y mcp, según las reivindicaciones 11 a 15 para la identificación de fagos que infectan *St. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* y *Lc. lactis* en muestras fermentativos de leche, como el yogur, cuajadas y queso entre otros para ordenar tratamientos antisépticos de la planta de producción.

40

45

50

55

60

65

ES 2 276 597 B1

MD2 CTTACCAACTTCTTCAAAGAAGACAGCACAAATCCAGCAGATTATACATG 60  
Sfi21 CTTACCAACTTCTTCAAAGAAGACAGCACAAATCCAGCAGATTATACATG 60  
Sfi19 CTTACCAACTTCTTCAAAGAAGACAGCACAAATCCAGCAGATTATACATG 60  
DT1 TACACCGATTCAATCAGGCGGGCAGCACTAACCCAGCTGATTATACTGG 60  
Q5 CTTACCAACTTCTTCAAAGAAGACAGTACTAATCCAGAAAGATTATACTGG 60

MD2 GTGGAGGTAITTCGGTTGGCCGGTCGGAACTTACITGTAAAA--ACCAATC---AAGGT 114  
Sfi21 GTGGAGGTAITTCGGTTGGCCGGTCGGAACTTACITGTAAAA--ACCAATC---AAGGT 114  
Sfi19 GTGGAGGTAITTCGGTTGGCCGGTCGGAACTTACITGTAAAA--ACCAATC---AAGGT 114  
DT1 GCTGGCAGTGTTCGGTTGGTGGTGATAATTAACTACTAATCATCTTCCCAAAAAT 120  
Q5 GCGGTAGAAICTGTTGGTGGTAGGAATCTATAGA----AAGGTTCG--A-- 108

MD2 ATTACTAATTGGGATTGG-ACGATGTCGAATGG--TGACAAGAGCGITGAAGAAGTCAAT 171  
Sfi21 ATTACTAATTGGGATTGG-ACGATGTCGAATGG--TGACAAGAGCGITGAAGAAGTCAAT 171  
Sfi19 ATTACTAATTGGGATTGG-ACGATGTCGAATGG--TGACAAGAGCGITGAAGAAGTCAAT 171  
DT1 CTTGACAATTGGGATATTGGGAGCTGATCGCCTAATGAAAATCTTCATATAG-CAAC 179  
Q5 -----GG-ACCTTTTAAACCTG---ACC---GTAACCACAGATT-TTGAT 147

MD2 ATCGATGGT-ATTCGTGCTGTTAAATTAACC---AAAGGTACAAAAACAGCA---AATA 223  
Sfi21 ATCGATGGT-ATTCGTGCTGTTAAATTAACC---AAAGGTACAAAAACAGCA---AATA 223  
Sfi19 ATCGATGGT-ATTCGTGCTGTTAAATTAACC---AAAGGTACAAAAACAGCA---AATA 223  
DT1 AC-ATGGTTTTTATACAAATGGCACAAGA---CACTTTTAGACTAGATTGTGATA 232  
Q5 A--ATTACGTTTATIA--TG-AAAATG---AACTICT--GTCTAT-TTAGAACA 191

MD2 CTGG-TGGGAACACTACATTCAATATCAAGGTTTGTTCG--TAAAC-TCATAC-GACCAAA 278  
Sfi21 CTGG-TGGGAACACTACATTCAATATCAAGGTTTGTTCG--TAAAC-TCATAC-GACCAAA 278  
Sfi19 CTGG-TGGGAACACTACATTCAATATCAAGGTTTGTTCG--TAAAC-TCATAC-GACCAAA 278  
DT1 ATAGTTACGGGGTTCCTGCAGCATCAAGACGTTTTCCAGTAAACGTAACACTGATTATT 292  
Q5 AGGAAAAAATATATCATCAGTGCCAAAAC-----AGATG--GTAATTTACTAAAT 241

MD2 CACACAGTACACTCTTTTCGT--TTGATGT-AAAACCAAGTGITGATGTAAGITTTTCAG- 334  
Sfi21 CACACAGTACACTCTTTTCGT--TTGATGT-AAAACCAAGTGITGATGTAAGITTTTCAG- 334  
Sfi19 CACACAGTACACTCTTTTCGT--TTGATGT-AAAACCAAGTGITGATGTAAGITTTTCAG- 334  
DT1 CTCTCAATATTAGATGTTT-GCAACTGAAAACATCAAAGGIGTAAATATCTATTTCTC 351  
Q5 GGCACAA---CGGAGGAATCGAAAGTGACAAATATCACAC-ICTGGTJATTTCGTTCTG 296

MD2 CAACGCTAAAGAGGCAACTACCAAGCTGAATTGA--CTGATACTGTCCTTATGAATAA 392  
Sfi21 CAACGCTAAAGAGGCAACTACCAAGCTGAATTGA--CTGATACTGTCCTTATGAATAA 392  
Sfi19 CAACGCTAAAGAGGCAACTACCAAGCTGAATTGA--CTGATACTGTCCTTATGAATAA 392  
DT1 GGGCGAAGTCAATGAACTAACGAGATG--TTA-CTAAAGCAGTTAATAA---CAA 404  
Q5 GGATGTGGTIGACAT-----TG-TTT-----CTGAT---I----- 322

MD2 AGCTT-TGGCAAAATCAATGGA---CTAAAGTATCATGTGTTCTGACAAGTAAAGAAAC 446  
Sfi21 AGCTT-TGGCAAAATCAATGGA---CTAAAGTATCATGTGTTCTGACAAGTAAAGAAAC 446  
Sfi19 AGCTT-TGGCAAAATCAATGGA---CTAAAGTATCATGTGTTCTGACAAGTAAAGAAAC 446  
DT1 ACATTTGAAAAATTCGCCGTCAACGACTGA--TGTCTGGAAGTCCAC---TTCA-CATT 458  
Q5 -----CAAATACAGGTA---CTACAGGAACG-CAGT--TTACTTGAAT--CAT 363

MD2 GTTATCAGGTGATITAAATCAAG--TTG-TCTACTTGGCAGGTATGCC-AACAACAAAC 501  
Sfi21 GTTATCAGGTGATITAAATCAAG--TTG-TCTACTTGGCAGGTATGCC-AACAACAAAC 501  
Sfi19 GTTATCAGGTGATITAAATCAAG--TTG-TCTACTTGGCAGGTATGCC-AACAACAAAC 501  
DT1 TAATTCTGGTGAATGTGATGAAGGTTTCATCCGAGTTGACAACTATGG--AGCGACTTA 516  
Q5 CCGA-CAGGTACATATCATCTAC--GTG-TAAA---TACATAT-CATAAACAGCAATC 414

MD2 GGTA--ITGTTAATAATCAAGAATATCAAGCTAGAAGAAAGGTAATATAC----- 550  
Sfi21 GGTA--ITGTTAATAATCAAGAATATCAAGCTAGAAGAAAGGTAATATAC----- 550  
Sfi19 GGTA--ITGTTAATAATCAAGAATATCAAGCTAGAAGAAAGGTAATATAC----- 550  
DT1 GGAACGTCITCCTATTCTCACAGAGTACTGCTATGAGGTTACTACTG----- 568  
Q5 A--AA---ICTGTTTGGAA-----GTGAAGATTGAAGAAGGGACAATC----- 453

MD2 --CTACTCCAATG---GACACCAGCCATCG-AGGACATACAAGAAAGAGATTGATTCCAA 602  
Sfi21 --CTACTCCAATG---GACACCAGCCATCG-AGGACATACAAGAAAGAGATTGATTCCAA 602  
Sfi19 --CTACTCCAATG---GACACCAGCCATCG-AGGACATACAAGAAAGAGATTGATTCCAA 602  
DT1 --ATAGATCGTG---GCAAGCGTCAACGGAAACTTAAAGGACGAGATAGACACTAA 620  
Q5 -AAAACGATG---GACACCCGCCATCG-AGGATAACAAGATGAAATGATTCCAA 506

MD2 AGCCGATGATGTCCTTACGCAAGCACAACCTCAACAAGCTGAATGAAATGAAITCTAATGT 662  
Sfi21 AGCCGATGATGTCCTTACGCAAGCACAACCTCAACAAGCTGAATGAAATGAAITCTAATGT 662  
Sfi19 AGCCGATGATGTCCTTACGCAAGCACAACCTCAACAAGCTGAATGAAATGAAITCTAATGT 662  
DT1 AGCTGACAAATGCATTAACCGCAGCTCAGCTTAATAAATTAAGTGAATTAATTCGGTGA 680  
Q5 AGCCGATGATGCTATGACGATTGAACAGATTAAATGCGCTTAAATGAAAGGGCTGGAAATCAT 566

Continuación

ES 2 276 597 B1

MD2 TAAAGCTGAACITGCTGCTAAAGCCTCACTTGATACACITGACCAATGGAAGCAAGCCTA 722  
Sfi21 TAAAGCTGAACITGCTGCTAAAGCCTCACTTGATACACITGACCAATGGAAGCAAGCCTA 722  
Sfi19 TAAAGCTGAACITGCTGCTAAAGCCTCACTTGATACACITGACCAATGGAAGCAAGCCTA 722  
DT1 GAAAGCAGAGCTCGAAACAAAAGCATCCCTTGCCACTAATAATCAATGGATTAAGGCTTA 740  
Q5 TAAAGCAGAGATGGAAGCCAAAGCAAGCGCTGAAATTTTGAATAACIGGATTAATAATTA 626

MD2 TCAAGATTTTCGTTAACGCAAAACAATGCCAATCGTGCACAAGCTGAAAAAGATTTAGCTGA 782  
Sfi21 TCAAGATCTCGTTAACGCAAAACAATGCCAATCGTGCACAAGCTGAAAAAGATTTAGCTGA 782  
Sfi19 TCAAGATTTTCGTTAACGCAAAACAATGCCAATCGTGCACAAGCTGAAAAAGATTTAGCTGA 782  
DT1 TCAAGATTTTGTAAATGCAAAACAGCGCAGATCCCGCACAAGCTCAAAAGGCTTTGGCAGA 800  
Q5 CCAAGATTTTCGTTAAGGCAAAACGAGACCGAGAGAGCTGCAGCCGAGAAAGCTTTGATTAG 686

MD2 TGCAAGTGCTCGTGTAAACCAACTAGAAAACGACTTAAATGATATGTCAGAAAGTGGAA 842  
Sfi21 TGCAAGTGCTCGTGTAAACCAACTAGAAAACGACTTAAATGATATGTCAGAAAGTGGAA 842  
Sfi19 TGCAAGTGCTCGTGTAAACCAACTAGAAAACGACTTAAATGATATGTCAGAAAGTGGAA 842  
DT1 TGCCAGTGCAAGAGTAGTGAACCTAGAAAATAACTTAAACGATAATGTCAGAGAGTGGAA 860  
Q5 ITCAAGTCAGCGGGTATCAACCAATTGCTAAGGAATTAGGTGAACITGCTGATLAATGGAA 746

MD2 TTTCATCGATAGCTACATCAACTGCATCAAACGAGGGTCITGTTGTTGGTAAAACCTGATAA 902  
Sfi21 TTTCATCGATAGCTACATCAACTGCATCAAACGAGGGTCITGTTGTTGGTAAAACCTGATAA 902  
Sfi19 TTTCATCGATAGCTACATCAACTGCATCAAACGAGGGTCITGTTGTTGGTAAAACCTGATAA 902  
DT1 TTTATCGATAGCTACATCAACTGCAGCATCAAATGATGGTTTGGTTATCGGGAAAGAAAGATAA 920  
Q5 TTTCATCGATAGCTACATCAACTGCATCAAATGATGGGCTTGTGATGGAAAGAAATG--A 803

FIGURA 1

## ES 2 276 597 B1

mv4 AACCCGAAGGGGGCCAAGCAGGTGGACAGCTGCAAGGCTAAGCCAGCTCTACACTGATGCC 60  
 mv1 AACCCG-AAGGGGGCCAAGCAGGTGGACAGCTGCAAGGCTAAGCCAGCTCTACACTGATGCC 59  
 LL-H AACCCCAAGGCCTCAAGCAGGTGGACAGCTGCAAGGCTAAGCCAGCTCTACACTGATGCC 60

mv4 TACCATTTCGGCGG-TTITGGCTCATCTGTTAGCCGCGCCAAAAAAGAAGGGGCTTACTT 119  
 mv1 TACCATTTCGGCGAGTTTTGGCTCATCTGTTAGCCGCGCCAAAAAAGAAGCGGCTTACTT 119  
 LL-H TACCACITTGGCGGTTTGG-ATCCTCTGTAGCCAGGCCAAAAAGGAAGCGACCTACTT 119

mv4 CCTTAAGGAAGCCAAGAAGCAAGACATTAGCAAGAAACGGATGCTTTGGCTAGACTGGGA 179  
 mv1 CCTTAAGGAAGCCAAGAAGCAAGACATTAGCAAGAAACGGATGCTTTGGCTAGACTGGGA 179  
 LL-H CATCAAGGAAGCTAAGAAGGAAGACATTAGCCAAAGCGGATCGTTTGGCTGGACTGGGA 179

mv4 AGCCGGTAGCGGCAATGTGGTAACTGGGTCAAAGTCATCCAACACGGCGGCAATCCTGGA 239  
 mv1 AGCCGGTAGCGGCAATGTGGTAACTGGGTCAAAGTCATCCAACACGGCGGCAATCCTGGA 239  
 LL-H ATCCGGTAGCGGCAACACCGTAGCCGGGTCAAAGCATCCAACACGTGGCAATCCTGGC 239

mv4 CTTTATGGACGCGATTAAAGCCGCAAGGCTGGCGGCCGGGTCTCTATAGCGGTGCATCCCT 299  
 mv1 CTTTATGGACGCGATTAAAGCCGCAAGGCTGGCGGCCGGGTCTCTATAGCGGTGCATCCCT 299  
 LL-H ATTTATGGATGCGATTAAAGCCGCTGGCTGGCGTCTCTGGGCTCTACTCTGGTGCATCCCT 299

mv4 GATGCGGACGGCGATTGACACCAAGCAGGTGGTAAAAAAGTATGGCACCTGTCTCTGGGT 359  
 mv1 GATGCGGACGGCGATTGACACCAAGCAGGTGGTAAAAAAGTATGGCACCTGTCTCTGGGT 359  
 LL-H GCTGCGGACTGCCATCGACACTGCGCAGGTGGTCAAAGTATGGCACCTGCCTCTGGGT 359

mv4 GGCAAGCTACCCGACCATGGCGGCAGTCTCCACGGCTGACTTTGGATACTTCCCGTCAAT 419  
 mv1 GGCAAGCTACCCGACCATGGCGGCAGTCTCCACGGCTGACTTTGGATACTTCCCG-TCAAT 418  
 LL-H AGCTTCC-TACCTACGATGGCGGCAGTCTCATCAGCAGACTTCCGC-TACTTCCCGTCTAT 419

mv4 GGACGGGGTCCGCATCTGGCAGTTTACCAGTAACTGGCATGGCCTGGACGTAGACGGGAA 479  
 mv1 GGACGGGGTCCGCATCTGGCAGTTTACCAGTAACTG-CATGGCCTGGACGTAGACGGGAA 477  
 LL-H GGACGGGGTGGCTATCTGGCAGTTTACCAGTAACTGGAAGGGCCTGGCGTAGACGGCAA 479

mv4 CGTTGCTCTGGTTGACCTCAACAGCGAGAACAAGCCTAAAGCCGAGGTCAAGCCAAAGAC 539  
 mv1 CGTTGCTCTGGTTGACCTCAACAGCGAGAACAAGCCTAAAGCCGAGGTCAAGCCAAAGAC 537  
 LL-H TTTGGCACTGGTTGATCTCAACAGCGACGCTAAGCCTAAAGCAGAGGCCAAACCTAAGCC 539

mv4 AAAGCAAAGGCCACGGCGACTGACTTCCATGGTGTGTCAAAGTAAAGAGCCGTTGGGGC 599  
 mv1 AAAGCAAAGGCCACGGCGACTGACTTCCATGGTGTGTCAAAGTAAAGAGCCGTTGGGGC 597  
 LL-H AAAGCCTAAAGCCACCTCCAATGACTTTAACCCACGTTGTCAAAGTCAAGAATCTTGGCCC 599

mv4 TAGCAAGGCCAGCTGGAAGGTTCCGGCTGCTCTCAAAGGATGCCACTACACTGAAAGCTA 659  
 mv1 AG-CAAGGCCAGCTGGAAGGTTCCGGCTGCTCTCAAAGGATGCCACTACACTGAAAGCTA 656  
 LL-H GGGCAAGGCCAGCTGGAAGTCCGGTGGCTCTCAAAGGATGCTGACTACACTAACAGCTA 659

**FIGURA 2**

ES 2 276 597 B1

Q30	<u>ITAAATATGGGATATTACGACACAAAAAAT</u> <u>CTAGCTAGGCGAATCAGTAAACTTGCCTAGT</u> 60
ul36A	<u>ITAAATATGGGATATTACGACACAAAAAAT</u> <u>CTAGCTAGGCGAATCAGTAAACTTGCCTAGT</u> 60
R1T	<u>I-AAATATGGGATATTACGACACAAAAAAT</u> <u>CTAGCTAGGCGAATCAGTAAAGTTGCTACT</u> 59
Tuc2009	<u>ITAATTATGGGATATTACGACACAAAAAAC</u> <u>CTAGCTAGGCGAATCAGTAAACTTGCCTAGT</u> 60
BIL285	<u>ITAATTATGGGATATTACGACACAAGAAAT</u> <u>CTAGCTAGGCGAATCAGTAAACTTGCCTAGT</u> 60
Q30	<u>CAAAATATATCGAGTGAGCAAAACAAAAAAGAATTTGAATTAGATAGCCAAAGCAAGTTT</u> 120
ul36A	<u>CAAAATATATCGAGTGAGCAAAACAAAAAAGAATTTGAATTAGATAGCCAAAGCAAGTTT</u> 120
R1T	<u>CAAAATATATCGAGTGAGCAAAACAAAAAAGAATTTGAATTAGATAGCCAAAGCAAGTTT</u> 119
Tuc2009	<u>CAAAATATATCGAGTGAGCAAAACAAAAAAGAATTTGAATTAGATAGCCAAAGCAAGTTT</u> 120
BIL285	<u>CAAAATATATCGAGTGAGCAAAACAAAAAAGAATTTGAATTAGATAGACAAAGCAAGTTT</u> 120
Q30	<u>AATCAGGAAATGCAAGCTGAGTTTCACGAAAGAATTAATAAATTAGGAGAAAAAAATGGT</u> 180
ul36A	<u>AATCAGGAAATGCAAGCTGAGTTTCACGAAAGAATTAATAAATTAGGAGAAAAAAATGGT</u> 180
R1T	<u>AATCAGGAAATGCAAGCTGAGTTTCACGAAAGAATTAATAAATTAGGAGAAAAAAATGGT</u> 179
Tuc2009	<u>AATCAGGAAATGCAAGCTGAGTTTCACGAAAGAATTAATAAATTAGGAGAAAAAAATGGT</u> 180
BIL285	<u>AATCAGGAAATGCAAGCTGAGTTTCACGAAAAAATTAATAAATTAGGAGAAAAAAATGGT</u> 180
Q30	<u>AGTTAAAGTCTTTGATGCTTATATTGAAGGCGAAAAAAAACCAACCGGAACAAATTGACGA</u> 240
ul36A	<u>AGTTAAAGTCTTTGATGCTTATATTGAAGGCGAAAAAAAACCAACCGGAACAAATTGACGA</u> 240
R1T	<u>AGTTAAAGTCTTTGATGCTTATATTGAAGGCGAAAAAAAACCAACCGGAACAAATTGACGA</u> 239
Tuc2009	<u>AGTTAAAGTCTTTGATGCTTATATTGAAGGCGAAAAAAAACCAACCGGAACAAATTGACGA</u> 240
BIL285	<u>AGTTAAAGTCTTTGATGCTTATATTGAAGGCGAAAAAAAACCAACCGGAACAAATTGACGA</u> 240
Q30	<u>GATAGCCGATTACTTTGATCTTTCCCGCAACTCT</u> 274
ul36A	<u>GATAGCCGATTACTTTGATCTTTCCCGCAACTCT</u> 274
R1T	<u>GATAGCCGATTACTTTGATATTTCCCGCAACTCT</u> 273
Tuc2009	<u>GATAGCCGATTACTTTGATGTTTCCCGCAACTCT</u> 274
BIL285	<u>GATAGCCGATTACTTTGATATTTCCCGCAACTCT</u> 274

FIGURA 3

ES 2 276 597 B1

Sk1 GAGTTTACTAACCATAAAAATTGTAAC TGGTTAGT TTCACTTGGCTCAATGGAAAGACCA 180  
P2 GAGTTTACTAACCATAAAAATTGTAAC TGGTTAGT TTCACTTGGCTCAATGGAAAGACCA 180  
Q42 GTGTTTACTAACCATAAAAATTGTAAC TGGTTAGT TTCACTTGGCTCAATGGAAAGACCA 180  
Bil170 GAGTTCACTAACCATAAAAATTGTAAC TGGTTAGT TTCACTTGGCTCAATGGAAAGACCA 158  
Q7 GAGTTTCCAACCATAAAAATTGTAAC TGGTTAGT TTCACTTGGCTCAATGGAAAGACCA 180

Sk1 AGACTAACAGCTATCCAGCTGATGATGTACCAGACCATGGAGTGAAAAAAGGAGCT 240  
P2 AGACTAACAGCTATCCAGCTGATGATGTACCAGACCATGGAGTGAAAAAAGGAGCT 240  
Q42 AGACTAACAGCTATCCAGCTGATGATGTACCAGACCATGGAGTGAAAAAAGGAGCT 240  
Bil170 AAACTAACAGTTATCCAGCTGATGACGTACCAGACCATGGAGTGAAAAAAGGAGCT 218  
Q7 AAACTAACAGCTATCCAGCTGATGACGTACCAGACCATGGAGTGAAAAAAGGAGCT 240

Sk1 ACCTTACTTCAAGGGCGAAAATGGTATTTATTCAAACAGACCAAGCGCTCAAAGAAGATATT 300  
P2 ACCTTACTTCAAGGGCGAAAATGGTATTTATTCAAACAGACCAAGCACTTAAAGAAGGATATG 300  
Q42 ACCTTACTTCAAGGGCGAAAATGGTATTTATTCAAACAGACCAAGCGCTTAAAGAAGACATT 300  
Bil170 ACCTTGCTTCAAGGGCGAAAATGGTATTTATTCAAACAGACCAAGCACTTAAAGAAGACATT 278  
Q7 ACCTTACTTCAAGGGCGAAAATGGTATTTATTCAAACAGACCAAGCACTTAAAGAAGATATC 300

Sk1 TTAGGTCAACAAAGAACAGAAAATGGCTTGGGTTGGTCTCCTACTGGTAATTGGAAAAACG 360  
2 CTAGGGCAACAAAGAACAGAAAATGGCTTGGGTTGGTCTCCTACGGGTAACTGGAAAACT 360  
Q42 TTAGGTCAACAAAGAACAGAAAATGGCTTGGGTTGGTCTCCTACTGGTAATTGGAAAAACG 360  
Bil170 TTAGGTCAACAAAGAACAGCAAAACGGCTTGGGTTGGTCTCCTACTGGTAATTGGAAAAACG 338  
Q7 TTAGGTCAACAAAGAACAGCAAAATGGCTTGGGTTGGTCTCCTACTGGTAATTGGAAAAACG 360

Sk1 AAATGTGTTCAATACCTTATTAAGGGCGTAAGCGTGATAAAAGTTACAGGGGAATTTGTC 420  
P2 AAATGTGTTCAATACCTTATTAAGGGCGTAAGCGTGATAAAAGTTACAGGGGAATTTGTC 420  
Q42 AAATGTGTTCAATACCTTATTAAGGGCGTAAGCGTGATAAAAGTTACAGGGGAATTTGTC 420  
Bil170 AAATGTGTTCAATACCTTATTAAGGGCGCAAAACGTGATAAAAGTTACAGGAGAGTTTAT 398  
Q7 AAATGTGTTCAATACCTTATTAAGGGCGCAAAACGTGATAAAAGTTACAGGAGAAATTTGTC 420

P2 GACGGTTATCGCGTAGITGTTTATCTCCTTTTGACACCAACAGCAGAAAGCAAAAAAGAA 480  
Sk1 GACGGTTATCGCGTAGITGTTTATCTCCTTTTGACACCAACAGCAGAAAGCAAAAAAGAA 480  
Q42 GACGGTTATCGCGTAGITGTTTATCTCCTTTTGACACCAACAGCAGAAAGCAAAAAAGAA 480  
Bil170 GACGGTTACCGTGTAGTCGTTTATCTCAATTTTGACACCAACAGCAGAAAGCTAAAAAGAA 458  
Q7 GACGGTTATCGTGTGGTCGTTTATCTCCTTTTGACACCAACAGCAGAAAGCAAAAAAGAA 480

FIGURA 4

ES 2 276 597 B1

c2 CTTGAAGCTAAACTGGAAAGAGCTTAAACAAGAAACGGTGAAGAATTAAAAAAGAACGTGAA 523  
eb1 CTTGAAGCTAAACTGGAAAGAGCTTAAACAAGAAACGGTGAAGAATTAAAAAAGAACGTGAA 540  
Q44 CTTGAAGCTAAACTGGAAAGAGCTTAAACAAGAAACGGTGAAGAATTAAAAAAGAACGTGAA 540  
Q38 CTTGAAGCTAAACTGGAAAGAGCTTAAACAAGAAACGGTGAAGAATTAAAAAAGAACGTGAA 540

c2 GCGTCATCCCTAGCGAAAAACCAGAAGACGCAGAACGTAAATTCATGCGTGAACTTGGT 583  
eb1 GCGTCATCCCTAGCGAAAAACCAGAAGACGCAGAACGTAAATTCATGCGTGAACTTGGT 600  
Q44 GCTAAATTCCTAGCGAAAAACCCAAGACGTAGAACGTAAATTTATGCGTGAACTTGGG 600  
Q38 GCTAAATTCCTAGCGAAAAACCCAAGACGTAGAACGTAAATTTATGCGTGAACTTGGG 600

c2 TCTAAAAATGGCTGAAATGCCAGAACCAAGGTTTCTTGGCGTGAATTTGCTAATGGTGCAGAT 643  
eb1 TCTAAAAATGGCTGAAATGCCAGAACCAAGGTTTCTTGGCGTGAATTTGCTAATGGTGCAGAT 660  
Q44 GACAAAAATGACTGAAATGCCAGAACCAAGGTTTCTTGGCGTGAATTTGCTAATGCGTCAGCT 660  
Q38 GACAAAAATGACTGAAATGCCAGAACCAAGGTTTCTTGGCGTGAATTTGCTAATGCGTCAGAT 660

c2 TTGAATGTTGTCAACTCTCTTGGGTCTATCACTTCAAAAATATGCTCGTAAAGTCAGGTATT 703  
eb1 TTGAATGTTGTCAACTCTCTTGGGTCTATCACTTCAAAAATATGCTCGTAAAGTCAGGTATT 720  
Q44 TTGAATGTTGTTAACTCTCTTGGGTCTATCACTTCAAAAATACGCTCGTAAAGTCAGGTATT 720  
Q38 TTGAATGTCGTCAACTCTCTTGGATCTATCACTTCAAAAATATGCTAAAAGTCAGGTATC 720

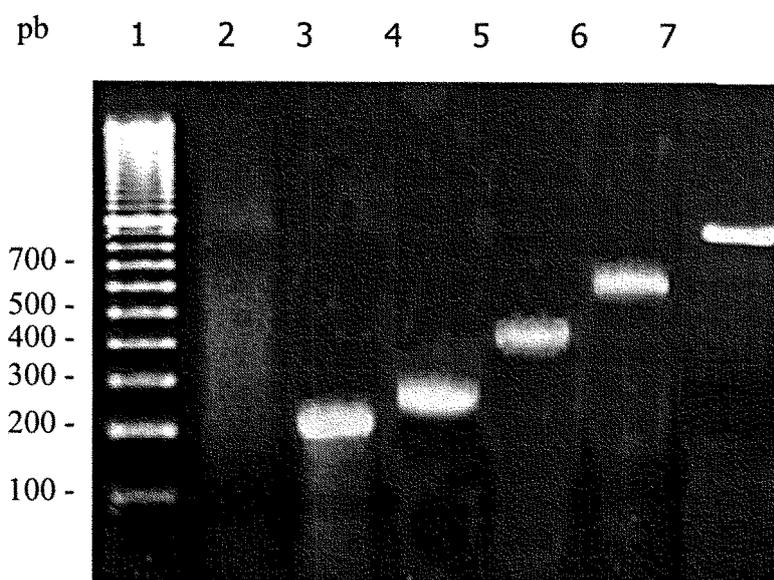
c2 IATGACGGTGCTATGAAAGCACGCTTCAAGGTTTGACACTTGCAGAGGACGGGTGTAGAT 763  
eb1 IATGACGGTGCTATGAAAGCACGCTTCAAGGTTTGACACTTGCAGAGGACGGGTGTAGAT 780  
Q44 IATGACGGTGCTATGAAAGCACGCTTCAAGGTTTGACACTTGCAGAGGACGGGTGTAGAT 780  
Q38 IATGACGGTGCTATGAAAGCACGCTTCAAGGTTTGACACTTGCAGAGGACGGGTGTAGAT 780

c2 GATACATTTATCTCTGGTACTTTCAAAGCAGGTACAGATAAAAACAAATCTCAAACGGCT 823  
eb1 GATACATTTATCTCTGGTACTTTCAAAGCAGGTACAGATAAAAACAAATCTCAAACGGCT 840  
Q44 GATACATTTCATTGAGGGTACTTTAAAGCAGGTACAGACAAAAATAAAGCTCAAACAGCG 840  
Q38 GATACTTTCATCGAGGGTACTTTAAAGCAGGTACAGATAAAAAATAAAGCTCAAACGGCT 840

c2 ACTAAACGTTCACTACGTCCACAAATGGCAGAAAGCATACTTACAAAATGGACAAAGCAACT 883  
eb1 ACTAAACGTTCACTACGTCCACAAATGGCAGAAAGCATACTTACAAAATGGACAAAGCAACT 900  
Q44 TCTAAAGCGCTCACTACGTCCACAAATGGCAGAAAGCATACTTACAAAATGGATAAAGCAACT 900  
Q38 TCTAAACGCTCACTACGTCCGCAAAATGGCAGAAAGCATACTTACAAAATGGATAAAGCAACA 900

c2 GTTCAAGCTGAAATGATTCAGGTCATTAATGTAATGTCTGAAATGGTAAAC 943  
eb1 GTTCAAGCTGAAATGATTCAGGTCATTAATGTAATGTCTGAAATGGTAAAC 960  
Q44 GTCCTGGTGAATGATTCAGGTCATTAATGTAATGTCTGAAATGGTAAAC 960  
Q38 GTCCTGGTGAATGATTCAGGTCATTAATGTAATGTCTGATATGGTAAAT 960

FIGURA 5



**FIGURA 6**

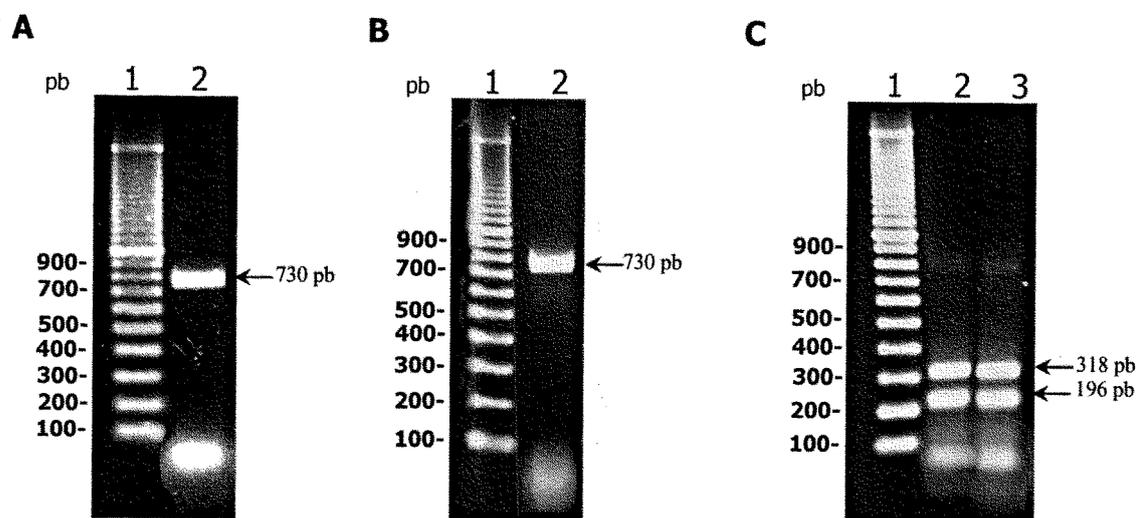


FIGURA 7



## ES 2 276 597 B1

	<code>&lt;400&gt; 4</code>		
	<code>ggtgtagtga ccatcctttg agagc</code>		25
5	<code>&lt;210&gt; 5</code>		
	<code>&lt;211&gt; 29</code>		
	<code>&lt;212&gt; DNA</code>		
10	<code>&lt;213&gt; Bacteriófago Tuc2009</code>		
	<code>&lt;400&gt; 5</code>		
15	<code>gaagctaggc gaatcagtaa acttgctag</code>		29
	<code>&lt;210&gt; 6</code>		
	<code>&lt;211&gt; 28</code>		
20	<code>&lt;212&gt; DNA</code>		
	<code>&lt;213&gt; Bacteriófago Tuc2009</code>		
	<code>&lt;400&gt; 6</code>		
25	<code>cggtatctc gtcaattgtt ccggttgc</code>		28
	<code>&lt;210&gt; 7</code>		
30	<code>&lt;211&gt; 29</code>		
	<code>&lt;212&gt; DNA</code>		
	<code>&lt;213&gt; del gen msp del bacteriófago Bil170 que infecta <i>Lactococcus lactis</i></code>		
35	<code>&lt;400&gt; 7</code>		
	<code>atcagttggc tcaatggaag accaagcgg</code>		29
40	<code>&lt;210&gt; 8</code>		
	<code>&lt;211&gt; 30</code>		
	<code>&lt;212&gt; DNA</code>		
45	<code>&lt;213&gt; del gen msp del bacteriófago Bil170 que infecta <i>Lactococcus lactis</i></code>		
	<code>&lt;400&gt; 8</code>		
50	<code>gttgctctg ctgttggtgt caaatgagga</code>		30
	<code>&lt;210&gt; 9</code>		
	<code>&lt;211&gt; 30</code>		
	<code>&lt;212&gt; DNA</code>		
55	<code>&lt;213&gt; del gen gen mcp del bacteriófago C2 que infecta <i>Lactococcus lactis</i></code>		
	<code>&lt;400&gt; 9</code>		
60	<code>caatcgaagc aggtgtaaaa gttcgagaac</code>		30
	<code>&lt;210&gt; 10</code>		
	<code>&lt;211&gt; 30</code>		
65	<code>&lt;212&gt; DNA</code>		
	<code>&lt;213&gt; del gen gen mcp del bacteriófago C2 que infecta <i>Lactococcus lactis</i></code>		

# ES 2 276 597 B1

<400> 10

gctttatcca ttgtaggta tgcttctgcc

30

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 276 597

② Nº de solicitud: 200501522

③ Fecha de presentación de la solicitud: **22.06.2005**

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	LABRIE, S. & MOINEAU, S. Multiplex PCR for detection and identification of Lactococcal bacteriophages. Appl. Environ. Microbiol. Marzo 2000. Vol 66, nº 3, páginas 987-994. Todo el documento.	13-15
Y		1-10,16-19
X	DUPLESSIS, M. & MOINEAU, S. Identification of a genetic determinant responsible for host specificity in Streptococcus thermophilus bacteriophages. Mol. Microbiol. Julio 2001. Vol 41, nº 2, páginas 325-336. Resumen; resultados, párrafos 1 y 2; discusión, párrafos 1 y 2; materiales y métodos, apartados 7 y 8.	11
Y		1-10,16-19
X	VASALA, A. et al. Genetic and biochemical characterization of the Lactococcus delbrueckii subsp. lactis bacteriophage LL-H lysin. Appl. Environ. Microbiol. Nov. 1995. Vol 61, nº 11, páginas 4004-4011. Materiales y métodos, apartado 10; resultados, párrafo 4; discusión, párrafos 1 y 2.	12
Y		1-10,16-19
P,X	BINETTI, A.G., et al. Detection and characterization of Streptococcus thermophilus bacteriophages by use of the antireceptor gene sequence. Appl. Environ. Microbiol. Oct. 2005. Vol 71, nº 10, páginas 6096-6103. Resumen; materiales y métodos, apartado 8; resultados, apartado 10; tabla 1; figuras 4 y 5.	11
A	BOTTERO, M.T. et al. Development of a multiplex PCR assay for the identification of pathogenic genes of Escherichia coli in milk and milk products. Mol. Cell. Probes. 2004. Vol 18, páginas 283-288. Todo el documento.	

#### 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**  
28.05.2007

**Examinador**  
B. Pérez Esteban

**Página**  
1/3



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 276 597

② Nº de solicitud: 200501522

③ Fecha de presentación de la solicitud: **22.06.2005**

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	JP 2005117980 A (FOOD SAFETY INNOVATION GIJUTSU KENKYU KUMIAI) 12.05.2005, (resumen) WPI [en línea] Londres (Reino Unido): Derwent Publications, Ltd. [recuperado el 31.10.2006]. Recuperado de: EPOQUENET, EPO, DW200536, nº de acceso 2005-349745 [36].	
A	JP 2004329161 A (NISSIN SHOKUHIN KAISHA LTD) 25.11.2004, (resumen) WPI [en línea] Londres (Reino Unido): Derwent Publications, Ltd. [recuperado el 31.10.2006]. Recuperado de: EPOQUENET, EPO, DW200481, nº de acceso 2004-817374 [81].	

#### 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

28.05.2007

Examinador

B. Pérez Esteban

Página

2/3

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**G01N 33/04** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12N 15/11** (2006.01)