



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



- (11) Número de publicación: **2 137 124**
(21) Número de solicitud: 009702234
(51) Int. Cl.⁷: C12Q 1/68

(12)

PATENTE DE INVENCION

B1

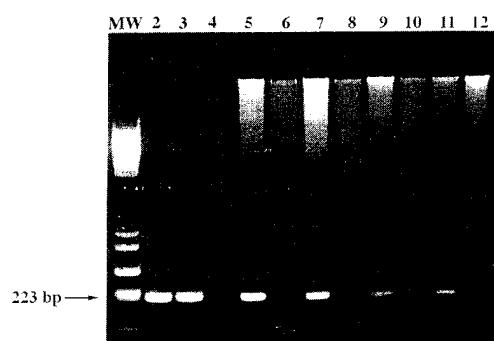
- (22) Fecha de presentación: **28.10.1997**
(43) Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.1999**
Fecha de concesión: **18.12.2000**
(45) Fecha de anuncio de la concesión: **01.10.2001**
(45) Fecha de publicación del folleto de patente:
01.10.2001

- (73) Titular/es: **UNIVERSIDAD DE MALAGA
COMPLEJO HOSPITALARIO CARLOS HAYA
Dpto. Medicina Interna
Avda. Carlos Haya s/n
29010 Malaga, ES**
(72) Inventor/es:
**Colmenero Castillo, Juan de Dios;
Morata Losa, Pilar y
Queipo Ortúño, María Isabel**
(74) Agente: **No consta**

(54) Título: **Método de diagnóstico molecular rápido para la detección de Brucella spp en muestras de sangre humana mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

(57) Resumen:
Método de diagnóstico molecular rápido para la detección de Brucella spp en muestras de sangre humana mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), basado en la amplificación selectiva del DNA del género Brucella en sangre periférica y otras muestras clínicas. Para ello se utilizan dos iniciadores de 21 nucleótidos respectivamente denominados B4 Y B5. Estos oligonucleótidos amplifican una señal de 223 pares de bases del gen que codifica la síntesis de una proteína de membrana de la superficie externa de Brucella abortus de 31 kDa (BCSP31) específica del género Brucella. La técnica propuesta se ha mostrado mucho más sensible que los métodos bacteriológicos y más específica que los métodos serológicos habituales permitiendo un fácil y rápido diagnóstico de la infección, la monitorización de la respuesta al tratamiento y la detección precoz de las recidivas evitando el riesgo de manipulación del germen para el personal del laboratorio.

Figura 1.



ES 2 137 124 B1

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

DESCRIPCION

Método de diagnóstico molecular rápido para la detección de *Brucella spp* en muestras de sangre humana mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La presente invención se refiere a un método de diagnóstico molecular rápido para la detección de *Brucella* en muestras de sangre humana, más concretamente para la detección de DNA específico de gérmenes del género *Brucella*. Dicho método comprende por tanto un diagnóstico molecular basado en la ampliación del DNA mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite la identificación rápida de *Brucella spp* en muestras de sangre y otras muestras clínicas.

Campo de la invención

El método se basa en la amplificación de una secuencia de 223 pares de bases del gen que codifica la síntesis de una proteína de 31 kDa, de la superficie externa de *B. abortus* (BCSP31). Como iniciadores de la reacción se han usado los oligonucleótidos B₄ y B₅. De este modo, la técnica propuesta se ha mostrado mucho más sensible que los métodos bacteriológicos y más específica que los métodos serológicos habituales permitiendo un fácil y rápido diagnóstico de la infección, la monitorización de la respuesta al tratamiento y la detección precoz de las recidivas evitando el riesgo que supone la manipulación para el personal de laboratorio.

Objeto de la invención

La brucellosis es una zoonosis que afecta a múltiples especies animales, tanto domésticas como salvajes y es fácilmente transmisible al ser humano en el cual produce una elevada morbilidad. La enfermedad es endémica en amplias zonas del planeta. En España la incidencia de brucellosis humana es muy elevada produciéndose más de 5000 casos anualmente lo cual genera un elevadísimo coste socio-sanitario (Colmenero J.D. et al. Rev. Clin. Esp 1989; 185: 459-463). Los gérmenes del género *Brucella* son capaces de sobrevivir e incluso multiplicarse dentro de las células del sistema mononuclear-fagocítico lo cual explica la marcada tendencia de la enfermedad a producir complicaciones e incluso recaídas una vez concluido el tratamiento. Algunas de las complicaciones de la brucellosis humana son muy graves pudiendo conducir a la muerte del paciente. Se ha demostrado que la aparición de complicaciones se relaciona significativamente con una demora en el diagnóstico de la infección (Colmenero J. D. et al. Medicine, [Baltimore], 1996; 75:195-211).

La presente invención aporta un nuevo método de diagnóstico que permite la detección de *Brucella spp* con una alta sensibilidad en cualquier muestra clínica. Dicho método se fundamenta en la detección y amplificación del DNA específico del germe. Gracias a este método la detección del germe y por tanto de la enfermedad puede realizarse de una forma fácil y rápida independientemente del tiempo de evolución de la infección y de la respuesta serológica que pueda producirse en el paciente. Este método también permite la monitorización del tratamiento y el di-

agnóstico precoz de las recidivas.

Antecedentes de la invención

Actualmente el diagnóstico de la brucellosis se basa en el aislamiento del germe o bien en la demostración de anticuerpos específicos mediante diferentes pruebas serológicas. Ambos métodos poseen importantes limitaciones. Los métodos bacteriológicos carecen de una adecuada sensibilidad, son excesivamente lentos y entrañan un considerable riesgo para el personal que los realiza (Yagupsky, P et al. J. Clin Microbiol. 1994; 32: 1899-1901). Por otra parte los métodos serológicos adolecen de una escasa especificidad en zonas endémicas, especialmente en pacientes profesionalmente expuestos, en sujetos con antecedentes de haber padecido la enfermedad y en las recidivas (Ariza, J. et al. Clin. Infect. Dis. 1992; 14: 131-140).

Las técnicas de amplificación del DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa permiten la amplificación exponencial e identificación de un fragmento específico de DNA (Saiki et al. Science 1988; 239: 487-491 y Mullis en la patente U.S. N° 4.683.195). Estas técnicas se han mostrado muy útiles en el diagnóstico de diversas enfermedades infecciosas producidas por gérmenes de difícil aislamiento con las técnicas bacteriológicas convencionales. Los gérmenes del género *Brucella* crecen lentamente y requieren ocasionalmente medios y condiciones especiales. Se han descrito previamente algunos métodos que permiten el diagnóstico molecular de la brucellosis, pero la mayoría de ellos solo se han ensayado en muestras animales. Hasta el momento solo se ha aplicado un método de diagnóstico por PCR para la detección de *Brucella* en la sangre humana (Matar GM et al. J. Clin Microbiol 1996; 34:477-478). Sin embargo el mismo solo se ha ensayado en muestras sanguíneas requiriendo la obtención previa del buffy-coat y una segunda PCR lo cual lo hace muy complejo para su aplicación rutinaria en la práctica clínica, fundamentalmente por los problemas de contaminación que una segunda PCR origina.

Apoyándose en los conocimientos previos sobre Biología Molecular de los gérmenes del género *Brucella* y aplicando las técnicas de amplificación del DNA se ha desarrollado una técnica rápida, sensible, y específica de diagnóstico molecular para la detección de la *Brucella* en una muestra de sangre humana, objeto de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

En dicha figura se observa lo siguiente:
 Calle 1 MW marcador de peso molecular.
 Calles 2 y 3: controles positivos (*B. melitensis* Rev-1 y *B. abortus* B-19). Calle 4: Control negativo en ausencia de DNA en la mezcla de reacción.
 Calles 5 y 7: DNAs de dos pacientes con brucellosis y hemocultivo positivo.
 Calle 6: DNA de un sujeto sano.
 Calle 8: DNA de un paciente con bacteriemia producida por *E. coli*.
 Calles 9 y 11: DNAs de dos pacientes con brucellosis activa y hemocultivo negativo.
 Calle 10: DNA de un paciente con psittacosis;
 Calle 12: DNA de un paciente con una historia

previa de brucelosis, pero sin evidencia de enfermedad activa y con altos títulos de anticuerpos de anti-Brucella.

Descripción y realización de la invención

De acuerdo con la presente invención, se emplea la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de la Brucella en muestras de sangre humana utilizando la siguiente metodología.

- 1) Extracción y purificación del DNA total de una muestra de sangre periférica y otras muestras clínicas de pacientes con brucelosis.
- 2) Amplificación del DNA.

Extracción y purificación del dna.

El DNA total se extrae a partir de una muestra de sangre periférica, almacenada a -20 °C. En esta alícuota se encontrará el DNA genómico leucocitario y el bacteriano, este último en pequeña concentración. El aislamiento y purificación del mismo es un paso clave en esta metodología ya que la sangre contiene gran cantidad de inhibidores de la reacción de PCR. Para la realización de la prueba se utiliza una alícuota de 0,5 ml de sangre anticoagulada con citrato sódico, la cual se resuspende en 1 ml de tampón de lisis de hematíes (320 mM de sacarosa, 5mM de Mg₂ Cl, 1% de Triton X-100 y 10 mM de Tris HCl pH 7,5) se mezcla y centrifuga a 15000 x g durante 2 min. Despues de la centrifugación el sobrenadante es eliminado, y el precipitado obtenido se lava de tres a cuatro veces con agua Milli-Q, y se centrifuga como se ha descrito anteriormente, hasta que el sedimento de leucocitos pierde casi por completo el color rojo. Posteriormente, el DNA se extrae del sedimento de leucocitos añadiendo 0,4 ml de tampón de lisis nuclear (60 mM NH₄Cl y 24 mMn Na₂-EDTA pH 8.0) que además contiene proteinasa K (1 mg/ml) y dodecil sulfato sódico (1 %). Se mezcla, incuba y agita durante media hora a 55°C. Despues de la digestión, las muestras se enfrian a temperatura ambiente, añadiéndoles 100 ml de acetato amónico (7,5 M) se vuelven a agitar y centrifugar a 15000 x g durante 10 min. El sobrenadante contenido el DNA se transfiere a un tubo eppendorf limpio al cual se le añade 1 ml de etanol absoluto a -20°C, invirtiéndose varias veces el mismo hasta que la madeja de DNA sea visible. Este ultimo se recupera por centrifugación a 15000 x g durante 10 min. El sedimento se lava con etanol al 70%, se centrifuga igual que se describe anteriormente y se resuspende en 30 µl

agua estéril. La concentración y pureza del DNA es determinada espectrofotometricamente a longitudes de onda comprendidas entre 260 y 280 nm.

Amplificación

Para la identificación del género Brucella se amplificó una región de 223 pares de bases de un gen que codifica una proteína de superficie celular de 31 kDa de *B. abortus* que fue clonada y secuenciada por Mayfield (Mayfield J. E. et al. Gene 1988; 63: 1-9). Esta proteína es común para todas las biovariedades de Brucella. Como iniciadores de la reacción de amplificación de la secuencia diana, se emplean los oligonucleótidos B₄(TGG CTC GGT TGC CAA TAT CAA) y B₅(CGC GCT TGC CTT TCA GGT CTG). Una cantidad comprendida entre 2 y 4 µg de DNA extraído y purificado de las muestras como se describe anteriormente es utilizado para la amplificación. La mezcla de reacción se realiza en un volumen final de 50 µl, conteniendo 10 mM tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 1 mM Mg₂Cl, 200 mM de cada uno de los cuatro desoxirribonucleotidos (GTP, ATP, CTP y TTP), 100nM de cada oligonucleotido (B₄ y B₅) y 1,25 U de Tap polimerasa. 100 ng de DNA de *B. melitensis* Rev-1 y *B. abortus* B-19 son utilizadas como controles positivos.

Las condiciones de amplificación son las siguientes: desnaturalización, durante 1 min a 92°C, hibridación con los iniciadores durante 30 sg a 60°C y una extensión de 1 min a 72°C, durante 35 ciclos.

La PCR es precedida de una fase de incubación de la mezcla de reacción a una temperatura de 94°C durante 5 min. y un período de extensión al final a 72°C durante 7 min. En cada reacción de amplificación se incluyen controles positivos y negativos y todas las muestras se procesan por duplicado. El producto resultante de la PCR se analiza mediante electrofóresis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (2mg/ml). El tamaño del fragmento amplificado, se estima comparándolo con un marcador de peso molecular analizado en paralelo en el mismo gel. La visualización por fluorescencia de fragmentos de 223 pares de bases demuestra la presencia de la secuencia diana de DNA tanto en los controles positivos como en las muestras de los pacientes con brucelosis (ver Fig. 1).

Los controles negativos que contenían todos los reactivos de la mezcla de reacción excepto el DNA, fueron procesados de forma rutinaria para monitorizar cualquier tipo de posible contaminación con DNA de Brucella.

REIVINDICACIONES

1. Método de diagnóstico molecular rápido para la detección de *Brucella* spp en muestras de sangre humana mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite la amplificación de DNA específico del género *Brucella*, **caracterizado** por usar como sondas los oligonucleótidos B₄ (TGG CTC GGT TGC CAA TAT CAA) y B₅ (CGC GCT TGC CTT TCA GGT CTG). Dichos iniciadores amplifican una señal de 223 pares de bases del gen que codifica una proteína de membrana de 31 kDa de *Brucella abortus*.

2. Método de diagnóstico molecular rápido para la detección de *Brucella* spp en muestras de sangre humana mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según la reivindicación 1, **caracterizado** por la amplificación del DNA genómico bacteriano por PCR.

3. Método de diagnóstico molecular rápido para la detección de *Brucella* spp en muestras de sangre humana mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según las reivindicaciones an-

teriores, **caracterizado** por permitir la detección e identificación rápida de bacterias del género *Brucella* en muestras clínicas de sangre periférica.

4. Método de diagnóstico molecular rápido para la detección de *Brucella* spp en muestras de sangre humana mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** por poseer una alta sensibilidad y especificidad.

5. Método de diagnóstico molecular rápido para la detección de *Brucella* spp en muestras de sangre humana mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según las reivindicaciones anteriores, que podrá emplearse en relación a un control evolutivo de los pacientes y la detección precoz de las recidivas de la enfermedad.

6. Método de diagnóstico molecular rápido para la detección de *Brucella* spp en muestras de sangre humana mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según las reivindicaciones 1, 2 y 4, **caracterizado** por poder emplearse en otras muestras clínicas no sanguíneas.

25

30

35

40

45

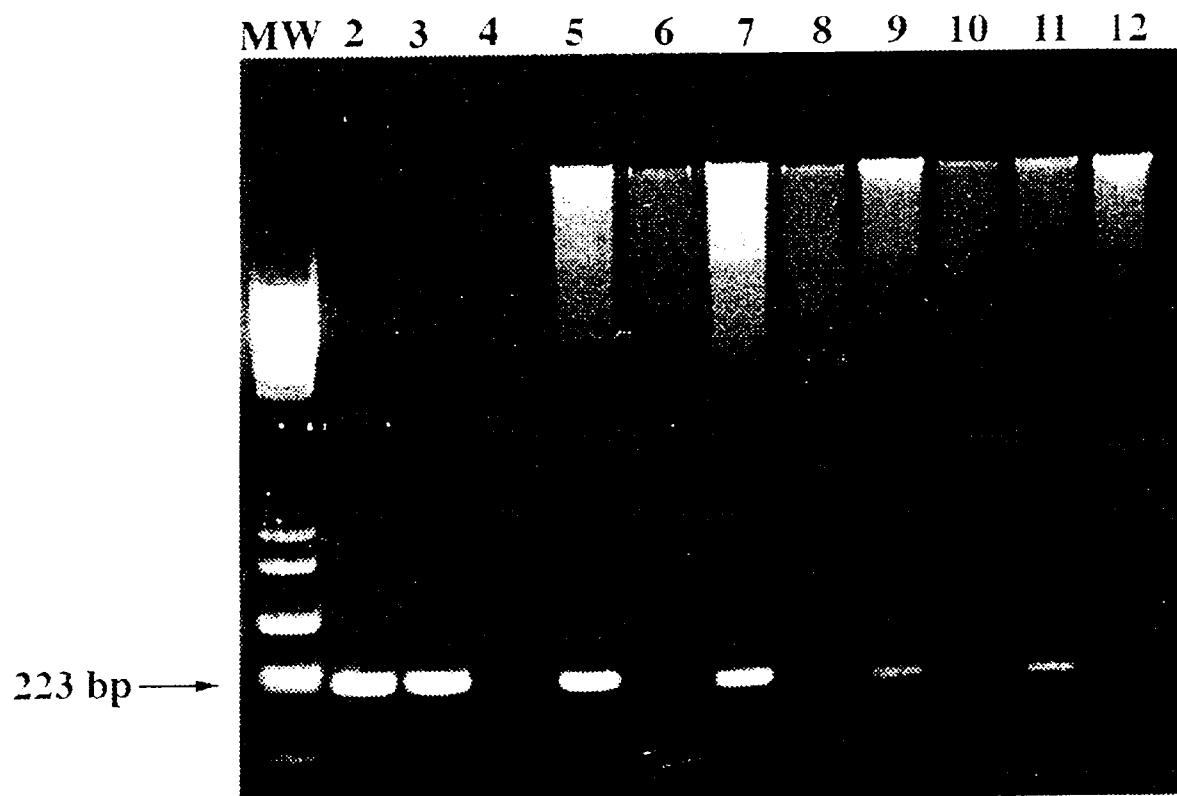
50

55

60

65

Figura 1.





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- (11) ES 2 137 124
 (21) N.º solicitud: 009702234
 (22) Fecha de presentación de la solicitud: 28.10.1997
 (32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) Int. Cl.⁶: C12Q 1/68

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	BAILY, G.G. et al. "Detection of Brucella melitensis and Brucella abortus by DNA amplification", JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE, 1992, Vol. 95, páginas 271-275, todo el documento.	1-6
X	MATAR, G.M. et al. "Rapid laboratory confirmation of human Brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-kilodalton Brucella antigen DNA", JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 1996, Vol. 34, N° 2, páginas 477-478, todo el documento.	1-6
A	FEKETE, A. et al. "Preliminary development of a diagnostic test for Brucella using polymerase chain reaction", JOURNAL OF APPLIED BACTERIOLOGY, 1990, Vol. 69, páginas 216-227, todo el documento.	1-6
A	LEAL-KLEVEZAS, D.S. et al. "Molecular detection of Brucella spp.: Rapid identification of B. abortus biovar I using PCR", ARCHIVES OF MEDICAL RESEARCH, 1995, Vol. 26, N° 3, páginas 263-267, todo el documento.	1-6
A	ROMERO, C. et al. "Specific detection of Brucella DNA by PCR", JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 1995, Vol. 33, N° 3, páginas 615-617, todo el documento.	1-6
A	OUAHRANI-BETTACHE, S. et al. "IS6501-anchored PCR for the detection and identification of Brucella species and strains", JOURNAL OF APPLIED BACTERIOLOGY, 1996, Vol. 81, páginas 154-160, todo el documento.	1-6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

O: referido a divulgación no escrita

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

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

A: refleja el estado de la técnica

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 n°:

Fecha de realización del informe 26.10.1999	Examinador J.L. Vizán Arroyo	Página 1/1
--	---------------------------------	---------------