



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 331 679**

(21) Número de solicitud: **200801280**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

(12)

PATENTE DE INVENCIÓN

B1

(22) Fecha de presentación: **11.07.2008**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **12.01.2010**

Fecha de la concesión: **16.09.2010**

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **30.09.2010**

(45) Fecha de publicación del folleto de la patente:
30.09.2010

(73) Titular/es: **Universidad de Málaga
c/ Severo Ochoa, 4 PTA
29590 Campanillas, Málaga, ES
Fundación Imabis**

(72) Inventor/es: **Queipo Ortuño, María Isabel;
Colmenero Castillo, Juan de Dios y
Morata Losa, Pilar**

(74) Agente: **No consta**

(54) Título: **Conjunto de cebadores, sondas, procedimiento y kit para la detección y cuantificación de secuencias de ADN específicas de *Brucella* spp.**

(57) Resumen:

Conjunto de cebadores, sondas, procedimiento y kit para la detección y cuantificación de secuencias de ADN específicas de *Brucella* spp.

La presente invención se refiere a un conjunto de cebadores, sonda, procedimiento y kit de diagnóstico molecular de *Brucella* spp., y más concretamente para la detección de ADN específico de gérmenes del género *Brucella* en muestras clínicas basada en la amplificación y cuantificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. La técnica es mucho más sensible que la PCR convencional, la PCR-ELISA (PCR acoplada a un enzimoinmunoensayo), los métodos bacteriológicos, y más específica que los métodos serológicos habituales, permitiendo su utilización para la puesta en práctica de un procedimiento fácil y rápido de diagnóstico molecular de la infección por *Brucella* spp. en suero sanguíneo y en otras muestras clínicas.

DESCRIPCIÓN

Conjunto de cebadores, sondas, procedimiento y kit para la detección y cuantificación de secuencias de ADN específicas de *Brucella* spp.

5

Sector de la técnica

La presente invención se refiere a un conjunto de cebadores, sonda, procedimiento y kit de diagnóstico molecular de *Brucella* spp., y más concretamente para la detección de ADN específico de gérmenes del género *Brucella* en muestras clínicas basada en la amplificación y cuantificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real.

Estado de la técnica

15 La brucelosis es una zoonosis de distribución mundial que provoca una alta morbilidad en humanos. La enfermedad es endémica en amplias zonas del planeta. 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 brucelosis 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., 1996, Medicine (Baltimore), 75: 195-211].

25 Debido a lo heterogéneo y escasamente específico de su cuadro clínico, actualmente el diagnóstico de la brucelosis requiere siempre una confirmación mediante el aislamiento del germe, o la detección de anticuerpos específicos mediante diferentes pruebas serológicas. Ambos métodos poseen importantes limitaciones. De los métodos bacteriológicos, el hemocultivo es la muestra clínica más rentable para el diagnóstico microbiológico. Su sensibilidad oscila entre el 53-90% en los casos de brucelosis aguda producida por *B. melitensis*. Sin embargo, esta sensibilidad se reduce considerablemente en los pacientes con cuadros clínicos de larga evolución, en los pacientes con complicaciones focales y en las infecciones causadas por *B. abortus* y *B. suis*. Los resultados del hemocultivo son en muchas ocasiones excesivamente lentos. Por otra parte, la manipulación de estos gérmenes supone un alto riesgo para el personal de laboratorio que se ve obligado a operar con cepas vivas para su correcta identificación final, debido a que *Brucella* spp. es un patógeno de clase III.

35 Aunque en la actualidad existe una amplia batería de métodos serológicos aplicables al diagnóstico de la brucelosis humana, todos ellos adolecen de importantes limitaciones. Así, su sensibilidad es baja en las fases precoces de la enfermedad, en la cual los niveles de anticuerpos aún pueden ser bajos. Además su especificidad es escasa en zonas de alta endemia, en personas profesionalmente expuestas, en pacientes que han padecido una infección reciente y en las frecuentes recidivas de la enfermedad.

40 Se ha demostrado que la amplificación de secuencias específicas de ADN de *Brucella* mediante PCR es un procedimiento mucho más sensible que los hemocultivos, y que su positividad es una prueba bastante específica de enfermedad activa (ES 2137124). Gracias a este método, la detección del germe, y por tanto de la enfermedad, puede realizarse de forma rápida y fácil, 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 45 diagnóstico precoz de las recidivas.

50 Estas técnicas de amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permiten la amplificación exponencial e identificación de un fragmento específico de ADN y 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. En base a los conocimientos disponibles sobre la biología molecular de los gérmenes del género *Brucella*, y aplicando las técnicas de amplificación del ADN, se ha descrito una técnica sensible y específica de PCR en muestras de sangre humana (PCR-ELISA), que permite obtener mejores resultados en el diagnóstico que mediante el uso de técnicas de PCR o de técnicas microbiológicas convencionales, tanto de la infección primaria como 55 de las recidivas, así como en las complicaciones de la enfermedad (ES 2220180). Sin embargo, la PCR-ELISA, aunque es capaz de amplificar 10 fg de ADN bacteriano (cantidad equivalente aproximadamente a 2 células bacterianas), requiere la manipulación de los productos PCR una vez completada la amplificación y es obligatoria la detección mediante digoxigenín-ELISA. Además, esta técnica consume excesivo tiempo, no siendo por ello muy adecuada para laboratorios generales de diagnóstico clínico.

60 Otros autores han propuesto métodos para la detección, identificación y diferenciación de todas las especies de *Brucella*, incluidas las cepas vacunales, basados en la aplicación de la técnica de PCR convencional, y utilizando 8 parejas diferentes de cebadores (WO 2006/097347). Los métodos referidos requieren, para la detección de las diferentes especies de *Brucella*, la realización de un cultivo previo a partir de aislados procedentes de sangre u otros fluidos, tanto de origen humano como animal, y no directamente desde el suero sanguíneo u otras muestras clínicas, antes de la extracción del ADN bacteriano y de la posterior detección por PCR. El hecho de tener que realizar dicho cultivo incrementa el tiempo necesario para el diagnóstico y, lo más importante, representa un riesgo para el personal de laboratorio que maneja los microorganismos, al ser *Brucella* un patógeno de clase III.

Con el objetivo principal de evitar estas dificultades, la presente invención se refiere a una técnica de PCR cuantitativa en tiempo real optimizada y evaluada conforme a su uso diagnóstico en muestras de suero obtenido a partir de sangre periférica y en otras muestras, clínicas (LCR, orina, pus, etc.) de pacientes con brucelosis. La presente invención comprende cebadores diferentes a los especificados en las patentes ES 2137124 y ES 2220180, en las que figuran

5 los mismos inventores que en la presente. Dichos cebadores, aunque corresponden a secuencias de ADN que codifican para la misma proteína de membrana BCSP31 que los especificados en la presente invención, amplifican una región termodinámicamente inestable, imposibilitando el diseño de una sonda de hidrólisis (tipo TaqMan) compatible. Además, el producto amplificado usando los mismos puede dificultar, por su gran tamaño, la detección y cuantificación mediante PCR a tiempo real.

10 En los últimos años otros autores han desarrollado aplicaciones de la PCR a tiempo real para la detección ADN de *Brucella* spp. en muestras sanguíneas de pacientes con brucelosis. Debeaumont y colaboradores utilizaron la tecnología LightCycler para la amplificación mediante PCR a tiempo real (LC-PCR) en muestras de suero de un fragmento de 169 pb de la proteína BCSP31, presente en todas las especies y biovariedades de *Brucella*, usando cebadores distintos
15 a los especificados en la presente invención, así como sondas FRET (Debeaumont C. et al., 2005, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 24: 842-845). La sensibilidad del método propuesto por estos autores fue de 18 fg de ADN, lo que equivale a 6 células bacterianas, significativamente inferior a los 10 fg (3 células bacterianas) que permite detectar la
20 presente invención. Por otra parte, las sondas FRET son más complejas y su síntesis es más costosa económicamente respecto de las sondas de hidrólisis (también denominadas genéricamente sondas TaqMan) como la comprendida en la presente invención.

Del mismo modo, Navarro y colaboradores, utilizaron la tecnología LC-PCR para amplificar un fragmento de 251 pb de la secuencia de inserción IS711 en muestras de sangre total en lugar de suero (Navarro E. et al., 2006, Clin. Infect. Dis., 42: 1266-1273). En este caso la sensibilidad de los cebadores y la sonda TaqMan empleada fue de 15 fg (5
25 células bacterianas). El método propuesto por estos autores no comprende la negativización de la PCR, lo que interfiere notablemente a la hora de establecer un valor de *cut-off* durante la cuantificación de la carga bacteriana. Además, el hecho de utilizar sangre total aumenta el riesgo de aparición de falsos negativos debido a una mayor presencia de inhibidores de la PCR en este tipo de muestras.

30 Por último, Kattar y colaboradores han desarrollado un ensayo de LC-PCR que comprende el uso de sondas FRET para la detección de *Brucella* spp. empleando tres secuencias génicas, dos de ellas codificantes de las proteínas de membrana omop31 y omp25, y la tercera correspondiendo a la región espaciadora de transcripción ribosomal 16S-23S (ITS) (Kattar M.M. et al., 2007, Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 59: 23-32). El ensayo propuesto se aplica en muestras de sangre total y de tejidos parafinados, lo que dificulta el ensayo debido a la mayor cantidad de inhibidores
35 de la reacción de amplificación de dichas muestras. De las tres secuencias empleadas, la secuencia ITS es la más sensible, permitiendo la identificación de *Brucella* tanto en tejidos como en sangre total, y la detección de hasta 2 células bacterianas, sensibilidad comparable a la de la presente invención, aunque ésta comprende el uso de sondas menores complejas y costosas, y evita los problemas derivados del tipo de muestras antes mencionadas.

40 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un conjunto de cebadores, sonda, procedimiento y kit de diagnóstico molecular de *Brucella* spp., y más concretamente para la detección de ADN específico de gérmenes del género *Brucella* en muestras clínicas basada en la amplificación y cuantificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. El procedimiento propuesto comprende la amplificación de un fragmento de 140 pb de un gen que codifica la síntesis de una proteína inmunogénica de membrana de 31 kDa específica del género *Brucella* (BCSP31). Los productos amplificados resultantes son hibridados con una sonda de hidrólisis marcada por fluorescencia complementaria a una región interna del producto amplificado. Los híbridos así obtenidos, son purificados, donados y transfectedos a *E. coli*. El ADN plasmídico una vez purificado y linealizado es utilizado para realizar un análisis cuantitativo para obtener la concentración de ADN de *Brucella* spp.

La técnica propuesta es significativamente más sensible y específica que los métodos conocidos (métodos bacteriológicos, métodos serológicos, PCR-ELISA) y presenta las siguientes ventajas:

- 55 - La detección de los productos PCR es rápida, fácil y objetiva, permitiendo un fácil y rápido diagnóstico de la infección;
- No requiere utilizar electroforesis en geles de agarosa, luz ultravioleta, ni el uso de agentes tóxicos como el bromuro de etidio, o digoxigenín-ELISA para la detección de los productos obtenidos;
- 60 - Debido a que la PCR a tiempo real es un sistema cerrado, que no requiere manipulación de los productos PCR, una vez completada la amplificación, para conocer los resultados, disminuye notablemente el riesgo de contaminación por arrastre;
- Permite la monitorización de la respuesta al tratamiento y la detección precoz de las recidivas;
- Evita el riesgo de manipulación del germe por el personal de laboratorio;

- Permite el manejo simultáneo de un elevado número de muestras;
- Es susceptible de ser automatizada, lo cual la hace muy atractiva para el uso en cualquier laboratorio clínico.

5 De este modo, constituye un primer objeto de la presente invención un conjunto de cebadores para la detección y cuantificación de ADN específico de *Brucella spp.* en muestras clínicas, en el cual al menos dos de los cebadores de dicho conjunto presentan secuencias que comprenden a las secuencias mostradas en las SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2 Preferentemente, dicho conjunto está formado por un primer cebador cuya secuencia comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 1 y por un segundo cebador cuya secuencia comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 2. Más preferentemente, la secuencia de nucleótidos del primer cebador es idéntica a la SEQ ID NO 1 y la secuencia de nucleótidos del segundo cebador es idéntica a la SEQ ID NO 2.

10 15 Constituye un segundo objeto de la presente invención una sonda para la detección y cuantificación de ADN específico de *Brucella spp.* en muestras clínicas, que presenta una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 3, siendo preferentemente la secuencia de nucleótidos idéntica a la SEQ ID NO 3. Dicha sonda se marca por fluorescencia en el extremo 5' con fluorescina-6-carboxi y en el extremo 3' con tetrametilrodamina-5-carboxi.

20 25 30 Constituye un tercer objeto de la presente invención un procedimiento para la detección y cuantificación de ADN específico de *Brucella spp.* en muestras clínicas que incluye las siguientes etapas:

- a. extracción y purificación del ADN de las muestras clínicas,
- b. amplificación mediante PCR cuantitativa en tiempo real de una secuencia de 140 pb del gen que codifica una proteína inmunogénica de la membrana celular de 31 kDa de *Brucella spp.* utilizando el conjunto de cebadores anteriormente referido, preferentemente un primer cebador cuya secuencia es idéntica a SEQ ID NO 1 y un segundo cebador cuya secuencia es idéntica a SEQ ID NO 2;
- c. simultáneamente con la etapa anterior, hibridación del producto amplificado mediante la sonda referida, preferentemente una sonda que presente una secuencia de nucleótidos idéntica a la SEQ ID NO 3 marcada por fluorescencia en el extremo 5' con fluorescina-6-carboxi y en el extremo 3' con tetrametilrodamina 5-carboxi; y
- d. cuantificación mediante comparación con una curva patrón determinada a partir de ADN plásmido purificado y linealizado obtenido por donación del producto hibridado en un vector y posterior transfección en células de *E. coli*.

35 40 Las muestras clínicas pueden ser muestras de orina, muestras de líquido cefalorraquídeo, muestras de pus, o muestras de suero obtenido a partir de sangre periférica (las altas concentraciones de ADN humano presentes en las muestras de sangre periférica interfieren en ocasiones la amplificación deseada, lo que se evita utilizando suero).

45 Constituye un cuarto objeto de la presente invención un kit para la detección y cuantificación de ADN específico de *Brucella spp.* en muestras clínicas que comprende:

- a. un conjunto de cebadores tal y como el anteriormente referido,
- b. una sonda como la referida, y
- c. una muestra control para la determinación de ADN de *Brucella spp.*

50 Preferentemente el kit comprende:

- a. dos cebadores con secuencias de nucleótidos idénticas a las SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2,
- b. una sonda que presenta una secuencia de nucleótidos idéntica a la SEQ ID NO 3 y marcada por fluorescencia en el extremo 5' con fluorescina-6-carboxi y en el extremo 3' con tetrametilrodamina-5-carboxi, y
- c. una muestra control para la determinación de ADN de *Brucella spp.*

60 Descripción de los dibujos

Figura 1. Curvas de amplificación en muestras de suero para la detección de *Brucella spp.*: curvas patrón (1), pacientes con brucellosis (2), y controles negativos (paciente con síndrome febril de etiología diferente y control negativo de la reacción -agua-) (3).

ES 2 331 679 B1

Figura 2. Curvas de amplificación en muestras de orina para la detección de *Brucella* spp.: curvas patrón (1), paciente con brucelosis (4), y controles negativos (paciente con síndrome febril de etiología diferente y control negativo de la reacción -agua-) (5).

5 Figura 3. Curvas de amplificación en muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) para la detección de *Brucella* spp.: curvas patrón (1), pacientes con brucelosis (6), y controles negativos (paciente con síndrome febril de etiología diferente y control negativo de la reacción -agua-) (7).

10 Figura 4. Curvas de amplificación en muestras de pus procedente de abscesos para la detección de *Brucella* spp.: curvas patrón (1), pacientes con brucelosis (8), y controles negativos (paciente con síndrome febril de etiología diferente y control negativo de la reacción -agua-) (9).

Modos de realización de la invención

15 A continuación, se describe detalladamente, y sin carácter limitativo, un modo de realización de la invención, particularmente desarrollado para suero sanguíneo, optimizado para la tecnología *LightCycler* (Roche Applied Science), y comprendiendo el uso de una sonda TaqMan (Applied Biosystems).

Extracción y purificación del ADN

20 El ADN total se extrae a partir de una muestra de suero de sangre periférica, el cual se almacena a -20°C. En esta alícuota se encuentra el ADN genómico leucocitario y el bacteriano, este último en baja concentración. Para la realización de la prueba, el ADN total es extraído utilizando el kit *UltraClean BloodSpin DNA Isolation Kit* (Mo Bio Laboratories) a partir de muestras de 200 µL de suero según las instrucciones del fabricante. El ADN precipitado resultante del protocolo comercial es resuspendido en 200 µL de agua. Posteriormente, el ADN es concentrado añadiendo 8 µL de NaCl en una concentración de 5 mol/L y 400 µL de etanol absoluto frío, se mezcla y centrifuga a 15000 g durante 5 minutos. El ADN precipitado se resuspende en un volumen final de 40 µL de agua y se almacena a 4°C hasta su utilización. Para el análisis por PCR se utilizan alícuotas de 5 µL de la suspensión obtenida.

30 Amplificación

Para la identificación de *Brucella* spp. se amplificó una región de ADN de 140 pb del gen que codifica una proteína de la superficie celular de *Brucella abortus* de 31 kDa (Mayfield J.E. *et al.*, 1988, Gene, 63: 1-9), común a todas las biovariedades de *Brucella*. Como iniciadores de la reacción de amplificación de la secuencia diana, se emplean los cebadores identificados en las SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2. La sonda TaqMan empleada se corresponde a la secuencia identificada como SEQ ID NO 3, marcada por fluorescencia en el extremo 5' con fluorescina 6-carboxi (FAM) como reporter dye y en el extremo 3' con tetrametilrodamina-5-carboxi (TAMRA) como quencher dye.

Construcción del plásmido

40 El producto de 140 pb resultante de la amplificación obtenida con referidos cebadores se purifica en un gel de agarosa mediante el kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN) según las instrucciones del fabricante. El amplicón purificado es donado en un vector PCR2.1-TOPO (Invitrogen) y transfectado a *E. coli* DH-5 alpha mediante el kit de donación TOPO-TA (Invitrogen). Se purifica el DNA plasmídico mediante el kit *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIA-GEN) y se linealiza mediante digestión enzimática con *EcoRI*. La absorbancia a 260 nm de cada muestra es medida tres veces en un lector ND-1000 (NanoDrop). El ADN plasmídico es utilizado en la elaboración de una curva estándar externa que es exportada en cada carrera utilizando el software del termociclador y que es calibrada con el control positivo (calibrador) incluido en cada carrera.

50 Análisis cuantitativo de PCR en tiempo real

La mezcla de reacción se realiza en un volumen final de 20 µL, conteniendo 4 µL de *LightCycler FastStart DNA MasterPLUS HybProbe* (Roche Diagnostic), 0,6 µmol/L de cada cebador iniciador de reacción, 200 nmol/L de sonda TaqMan, y 5 µL del ADN molde. La reacción se lleva a cabo en un termociclador *LightCycler* (Roche Applied Science). Los capilares son sellados, centrifugados a 500 g durante 5 segundos, y amplificados en el termociclador. La activación de la polimerasa se realiza a 95°C durante 10 min y se llevan a cabo 45 ciclos compuestos de 10 segundos a 95°C, 20 segundos a 60°C y 6 segundos a 72°C. La temperatura de transición se fija a 20°C/s durante todos los pasos. La concentración de ADN de *Brucella* se calcula mediante el software del termociclador. Todos los ensayos realizados incluyen un control negativo y un control positivo de 2 x 10⁴ copias por reacción del plásmido. Para prevenir la contaminación de las muestras se realizan medidas estándares y flujos unidireccionales en la extracción y amplificación del ADN. Un ensayo se considera negativo para ADN de *Brucella* si el valor Cp supera los 45 ciclos.

Los resultados obtenidos, resumidos en la figura 1, evidencian la fiabilidad del procedimiento propuesto en la presente invención. Las curvas patrón (1) fueron elaboradas a partir de 10 fg, 100 fg y 100 pg de ADN plasmídico. 65 También se aportan resultados obtenidos para otros tipos de muestras clínicas (figuras 2, 3 y 4).

REIVINDICACIONES

1. Conjunto de cebadores para la detección y cuantificación de ADN específico de *Brucella* spp. en muestras clínicas, **caracterizado** porque al menos dos de los cebadores de dicho conjunto presentan secuencias que comprenden a las secuencias mostradas en las SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2.
- 5
2. Conjunto de cebadores para la detección y cuantificación de ADN específico de *Brucella* spp. en muestras clínicas según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho conjunto está formado por un primer cebador cuya secuencia comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 1 y por un segundo cebador cuya secuencia comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 2.
- 10
3. Conjunto de cebadores para la detección y cuantificación de ADN específico de *Brucella* spp. en muestras clínicas según la reivindicación 2, **caracterizado** porque la secuencia de nucleótidos del primer cebador es idéntica a la SEQ ID NO 1 y la secuencia de nucleótidos del segundo cebador es idéntica a la SEQ ID NO 2.
- 15
4. Sonda para la detección y cuantificación de ADN específico de *Brucella* spp. en muestras clínicas, **caracterizado** porque presenta una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 3.
- 20
5. Sonda para la para la detección y cuantificación de ADN específico de *Brucella* spp. en muestras clínicas según la reivindicación 4, **caracterizada** porque presenta una secuencia de nucleótidos idéntica a la SEQ ID NO 3.
- 25
6. Sonda para la detección y cuantificación de ADN específico de *Brucella* spp. en muestras clínicas según las reivindicaciones 4 y 5, **caracterizado** porque dicha sonda se marca por fluorescencia en el extremo 5' con fluorescina-6-carboxi y en el extremo 3' con tetrametilrodamina-5-carboxi.
- 30
7. Procedimiento para la detección y cuantificación de ADN específico de *Brucella* spp. en muestras clínicas **caracterizado** porque incluye las siguientes etapas:
- a. extracción y purificación del ADN de las muestras clínicas,
- b. amplificación mediante PCR cuantitativa en tiempo real de una secuencia de 140 pb del gen que codifica una proteína inmunogénica de la membrana celular de 31kDa de *Brucella* spp. utilizando el conjunto de cebadores según las reivindicaciones 1-3, preferentemente un primer cebador cuya secuencia es idéntica a SEQ ID NO 1 y un segundo cebador cuya secuencia es idéntica a SEQ ID NO 2;
- 35
- c. simultáneamente con la etapa anterior, hibridación del producto amplificado mediante una sonda según las reivindicaciones 4-6, preferentemente una sonda que presente una secuencia de nucleótidos idéntica a la SEQ ID NO 3 marcada por fluorescencia en el extremo 5' con fluorescina-6-carboxi y en el extremo 3' con tetrametilrodamina-5-carboxi; y
- d. cuantificación mediante comparación con una curva patrón determinada a partir de ADN plásmido purificado y linealizado obtenido por donación del producto hibridado en un vector y posterior transfección en células de *E. coli*.
- 40
8. Procedimiento para la detección y cuantificación de ADN específico de *Brucella* spp. en muestras clínicas según la reivindicación 7, **caracterizado** porque las muestras clínicas son muestras de suero obtenido a partir de sangre periférica.
- 45
9. Procedimiento para la detección y cuantificación de ADN específico de *Brucella* spp. en muestras clínicas según la reivindicación 7, **caracterizado** porque las muestras clínicas son muestras de orina.
- 50
10. Procedimiento para la detección y cuantificación de ADN específico de *Brucella* spp. en muestras clínicas según la reivindicación 7, **caracterizado** porque las muestras clínicas son muestras de líquido cefalorraquídeo.
- 55
11. Procedimiento para la detección y cuantificación de ADN específico de *Brucella* spp. en muestras clínicas según la reivindicación 7, **caracterizado** porque las muestras clínicas son muestras de pus.
- 60
12. Kit para la detección y cuantificación de ADN específico de *Brucella* spp. en muestras clínicas **caracterizado** porque comprende:
- a. un conjunto de cebadores según las reivindicaciones 1-3,
- b. una sonda según las reivindicaciones 4-6, y
- 65
- c. una muestra control para la determinación de ADN de *Brucella* spp..

ES 2 331 679 B1

13. Kit para la detección y cuantificación de ADN específico de *Brucella* spp. en muestras clínicas según la reivindicación 12, **caracterizado** porque comprende
- a. dos cebadores con secuencias de nucleótidos idénticas a las SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2,
 - b. una sonda que presenta una secuencia de nucleótidos idéntica a la SEQ ID NO 3, y
 - c. una muestra control para la determinación de ADN de *Brucella* spp..
14. Kit para la detección y cuantificación de ADN específico de *Brucella* spp. en muestras clínicas según la reivindicación 13, **caracterizado** porque la sonda está marcada por fluorescencia en el extremo 5' con fluorescina-6-carboxi y en el extremo 3' con tetrametilrodamina-5-carboxi.
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

ES 2 331 679 B1

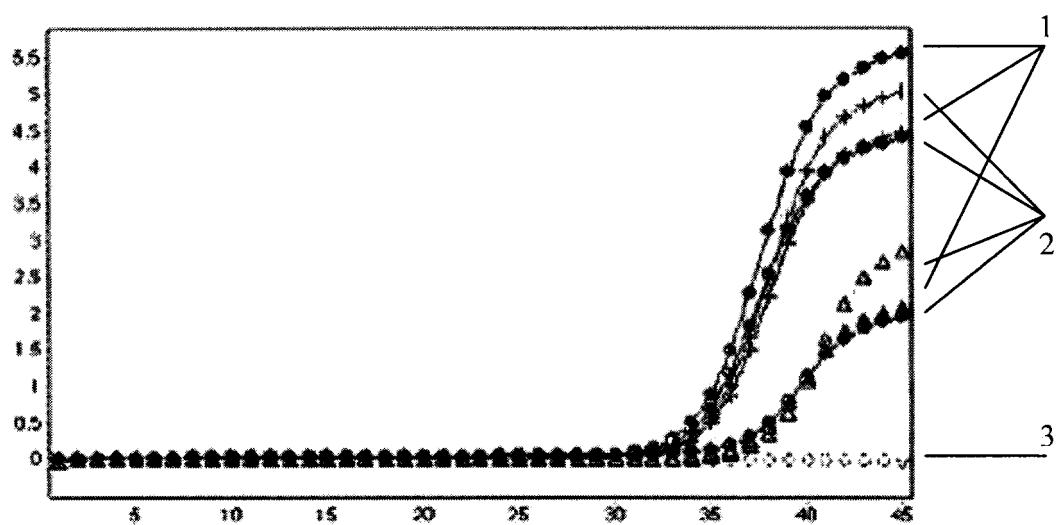


Figura 1

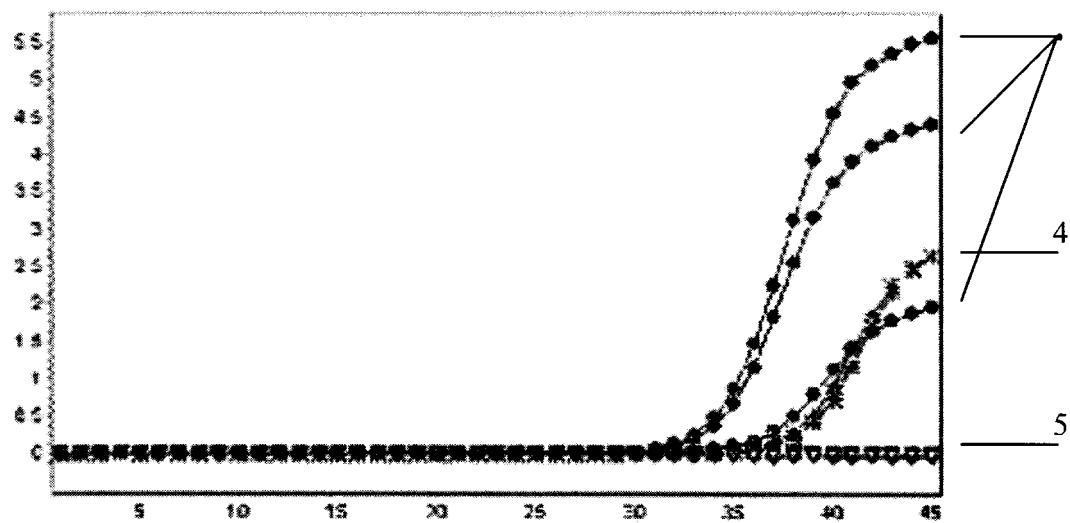


Figura 2

ES 2 331 679 B1

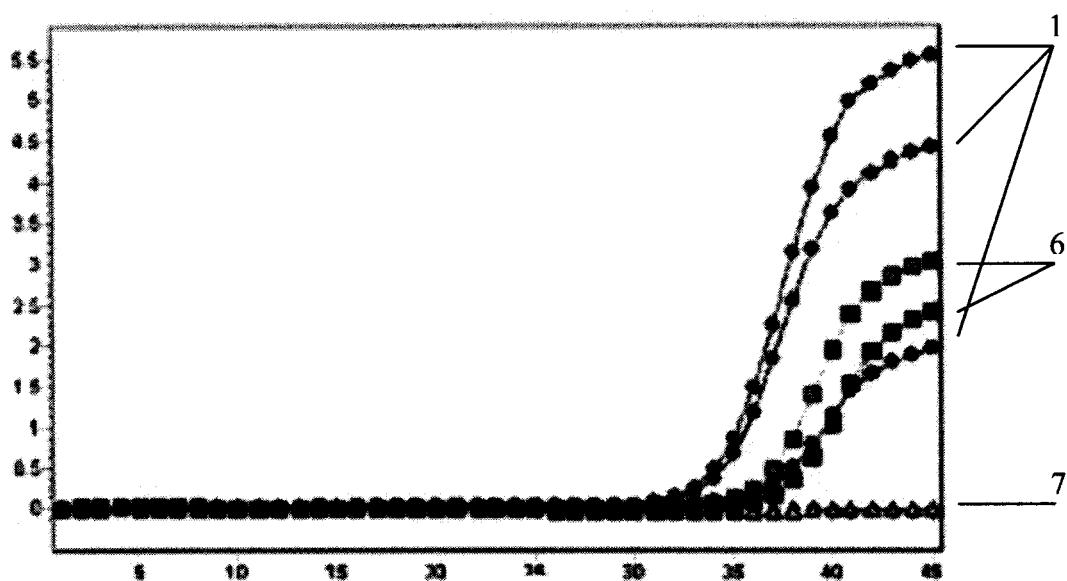


Figura 3

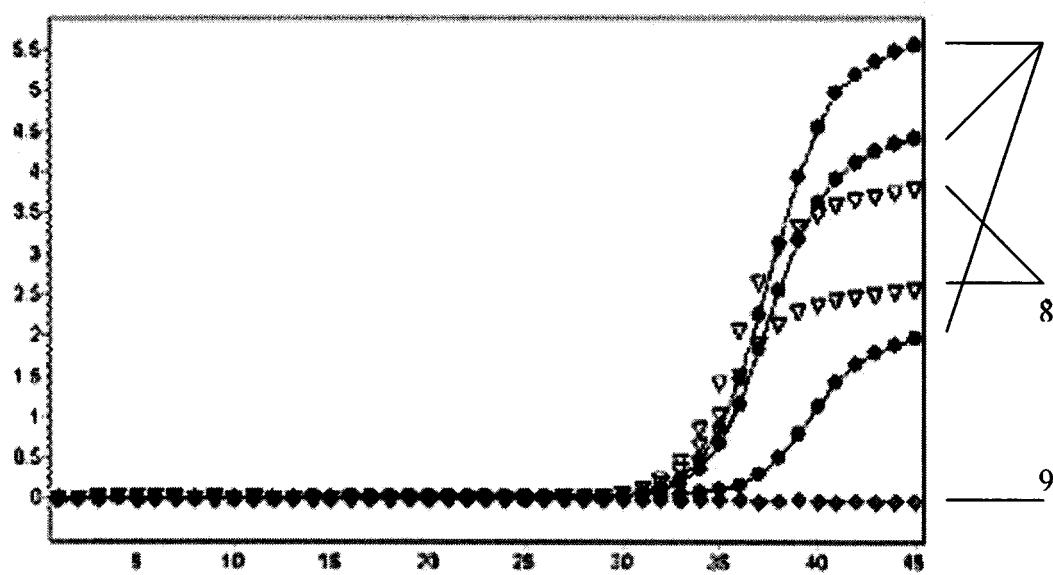


Figura 4

ES 2 331 679 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Málaga
Fundación IMABIS

5 <120> Conjunto de cebadores, sondas, procedimiento y kit para la detección y cuantificación de secuencias de ADN específicas de *Brucella* spp.

10 <130> SOLICITUD_IMABIS_UMA

<160> 3

15 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 20

20 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

25 <223> Cebador. Oligonucleótido Directo para la amplificación de una región de ADN de 140 pb, del gen que codifica una proteína de la superficie celular de *Brucella abortus* de 31 kDa

<400> 1

30 tgccggagcc tataaggacg 20

<210> 2

<211> 20

35 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

40 <223> Cebador. Oligonucleótido Inverso para la amplificación de una región de ADN de 140 pb, del gen que codifica una proteína de la superficie celular de *Brucella abortus* de 31 kDa

<400> 2

45 cgagtgcctt gcgtgtatcc 20

<210> 3

<211> 21

50 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

55 <223> Sonda. Oligonucleótido Directo para la hibridación y detección de una región de ADN de 140 pb, del gen que codifica una proteína de la superficie celular de *Brucella abortus* de 31 kDa

<400> 3

60 accgaccctt gccgttgcgg c 21



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- (11) ES 2 331 679
(21) N° de solicitud: 200801280
(22) Fecha de presentación de la solicitud: 11.07.2008
(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) Int. Cl.: C12Q 1/68 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	BAILY, G. G.et ak. "Detection of Brucella melitensis and Brucella abortus by DNA amplification". Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1992, Vol. 95, páginas 271-275. ISSN 0022-5304. Ver página 271-272 y tabla 1.	1-14
X	DE 10261468 A1 (BUNDESREP DEUTSCHLAND [DE]) 15.07.2004, párrafos 1,3,5,7,12-14,20; reivindicaciones 1-2; párrafos 3,5,7,12-14,20.	1-14
X	KANANI, A. N. "Serological, cultural and molecular detection of brucella infection in breeding bulls". Tesis doctoral de la universidad de Anand, Gujarat (India). 08.01.2008. [recuperado el 27.07.2009] Recuperado de Internet: <URL:http://openmed.nic.in/2224/>.	1-14

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 30.09.2009	Examinador M. Jesús García Bueno	Página 1/6
--	-------------------------------------	---------------

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

Nº de solicitud: 200801280

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

C12Q

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

INVENES,EPODOC, WPI, TXTE, TXTF, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP, EMBASE, EMBL All.

OPINIÓN ESCRITA

Nº de solicitud: 200801280

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.09.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones Reivindicaciones	1-14	SÍ NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones Reivindicaciones	1-14	SÍ NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	BAILY, G. G. et ak. "Detection of Brucella melitensis and Brucella abortus by DNA amplification". Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1992, Vol. 95, páginas 271-275.	1992
D02	DE 10261468 A1	15.07.2004
D03	KANANI, A. N. "Serological, cultural and molecular detection of brucella infection in breeding bulls". Tesis doctoral de la Universidad de Anand, Gujarat (India).	08.01.2008

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la presente solicitud consiste en un conjunto de cebadores, sondas, procedimiento y kit para la detección y cuantificación de secuencias de ADN específicas de *Brucella spp.* en muestras clínicas.

Para la identificación de *Brucella spp.* se amplifica una región de ADN de 140 pb del gen que codifica una proteína de la superficie celular de *Brucella abortus* de 31 kDa (BCSP31), utilizando un conjunto de cebadores compuesto por al menos los cebadores identificados en las SEC ID NO 1 y SEC ID NO 2 (reivindicaciones 1-3). La sonda empleada comprende o es idéntica a la secuencia identificada como SEC ID NO 3 y está marcada por fluorescencia en el extremo 5' con fluorescina-6-carboxi (FAM) y en el extremo 3' con tetrametilrodamina-5-carboxi (TAMRA) (reivindicaciones 4-6).

El procedimiento para la detección y cuantificación de ADN específico de *Brucella spp.* en muestras clínicas incluye las etapas de extracción y purificación del ADN de las muestras clínicas (suero obtenido de sangre periférica, orina, líquido céfalorraquídeo o pus), la amplificación mediante PCR cuantitativa en tiempo real de la secuencia de 140 pb del gen que codifica para BCSP31 utilizando los cebadores anteriormente mencionados, la hibridación, simultánea a la amplificación, mediante la sonda citada en el párrafo anterior; y la cuantificación mediante comparación con una curva patrón (reivindicaciones 7-11).

Por último, el kit reivindicado en la solicitud de invención comprende un conjunto de cebadores, una sonda y una muestra control marcada por fluorescencia y una muestra control para la determinación de ADN de *Brucella spp.*, donde los cebadores y la sonda comprenden o son idénticas a SEC ID NO 1, SEC ID NO 2 y SEC ID NO 3, respectivamente (reivindicaciones 12-14).

El documento D01 divulga un estudio en el que se intenta desarrollar una técnica, usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), capaz de detectar específicamente una pequeña cantidad de *Brucella*, siendo esta técnica útil para su aplicación en diagnosis. Los cebadores utilizado han sido elegidos dentro de la secuencia del gen que codifica para la proteína antígena de 31 kDa de *Brucella abortus* (BCSP31).

El documento D02 se refiere a un kit para la prueba de *Brucella melitensis* y de *Brucella abortus* por la amplificación específica de PCR, con la ayuda de dos cebadores de una secuencia específica de DNA y una sonda de detección (Taqman) marcada por fluorescencia en el extremo 5' con fluorescina-6-carboxi (FAM) y en el extremo 3' con tetrametilrodamina-5-carboxi (TAMRA).

El documento D03 divulga un procedimiento para la cuantificación de *Brucella spp.* en muestras de semen de toros mediante la técnica de PCR en tiempo real (reivindicaciones 12-14).

1. NOVEDAD (Art. 6 LP Ley 11/1986)

1.2. REIVINDICACIONES DE LA 1 A LA 14

Las reivindicaciones de la 1 a la 14 son nuevas al no existir anterioridad en el estado de la técnica según lo dispuesto en el art. 6 LP Ley 11/1986.

Hoja adicional

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8 LP Ley 11/1986)

2.1. REIVINDICACIONES DE LA 1 A LA 14

Las reivindicaciones 1 a 3 tienen por objeto un conjunto de cebadores donde al menos dos de estos cebadores presentan secuencias que comprenden o son idénticas a las secuencias mostradas en las SEC ID NO 1 y SEC ID NO 2. Las reivindicaciones 4 a 6 reivindican la sonda de hibridación que comprende o es idéntica a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID NO 3 y además está marcada por fluorescencia en el extremo 5' con fluorescina-6-carboxi (FAM) y en el extremo 3' con tetrametilrodamina-5-carboxi (TAMRA). La reivindicación 7 tiene por objeto el procedimiento a seguir para esta detección, que consta de las fases de extracción y purificación del ADN de las muestras clínicas, la amplificación mediante PCR cuantitativa en tiempo real de una secuencia de 140 pb de la proteína BCSP31 utilizando los cebadores de las reivindicaciones 1 a 3, la hibridación simultánea a la amplificación mediante la sonda de las reivindicaciones 4 a 6, y la cuantificación mediante comparación con una curva patrón. Las reivindicaciones 8 a 11 especifican que la muestra clínica puede ser de suero obtenido a partir de sangre periférica, orina, líquido cefalorraquídeo o pus. Por último, las reivindicaciones 12 a 14 tienen como objeto un kit compuesto por el conjunto de cebadores de las reivindicaciones 1 a 3, una sonda según las reivindicaciones 4 a 6 y una muestra control para la determinación de ADN de Brucella spp.

El documento D01 divulga las condiciones de reacción y los cebadores favorables para la detección de *Brucella melitensis* y *Brucella abortus* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos cebadores han sido elegidos dentro de la secuencia del gen que codifica para el antígeno de 31 kDa de *B. abortus* (BCSP31) (ver página 271). Los cebadores elegidos son cinco, que tienen entre 17 y 21 pares de bases y están localizados por todo el gen que codifica para la proteína BCSP31 (ver tabla 1). Estos cebadores han sido elegidos usando un programa informático apropiado, desde la secuencia nucleótida publicada del gen de *B. abortus* que codifica para la proteína de 31 kDa (ver página 272).

Los cebadores elegidos en este documento (B1, B2, B3, B4, y B5) amplifican una región diferente de la proteína por lo que no concuerdan con los reivindicados en la solicitud de patente (reivindicaciones 1-3). Sin embargo, considerando que es un programa informático el que selecciona los cebadores a lo largo de la secuencia de nucleótidos del gen que codifica para la proteína CBSP31 mediante algoritmos, se considera que la elección de cebadores para la amplificación de un fragmento de 140 pares de bases de este gen es simplemente una de las varias posibilidades evidentes que un experto en la materia seleccionaría según las circunstancias, sin ejercicio de actividad inventiva, para resolver el problema planteado.

En consecuencia, la invención reivindicada en las reivindicaciones 1-3 no implica actividad inventiva según el art.8 LP Ley 11/1986.

A la vista de lo que se conoce en el documento D01 y el estado de la técnica conocido del uso de la PCR y sus distintas variantes, que son técnicas ampliamente conocidas en el campo de la biotecnología, no se considera que requiera ningún esfuerzo inventivo para un experto en la materia desarrollar una sonda para la hibridación de un fragmento determinado de la proteína CBSP31 como el descrito en las reivindicaciones 4 a 6 y el procedimiento y kit como el descrito en las reivindicaciones 7 a 11 y 12 a 14 respectivamente.

Por consiguiente, la invención reivindicada en las reivindicaciones 4-14 no implica actividad inventiva según el art. 8 LP Ley 11/1986.

El documento D02 divulga un kit para la prueba de *Brucella melitensis* y *Brucella abortus* en muestras biológicas mediante amplificación por PCR específica donde se utilizan unos cebadores seleccionados de la secuencia del gen que codifica para la proteína CBSP31 y una sonda de detección. La sonda de detección es una sonda Taqman con la sustancia fluorescente FAM en el extremo 5' y la sustancia fluorescente TAMRA en el extremo 3' (ver párrafos 3, 5, 7, 12-14 y 20). Los cebadores citados en este documento no coinciden con los reivindicados en la solicitud de patente, sin embargo se considera que la elección de otros cebadores para la amplificación de un fragmento de 140 pares de bases del gen que codifica para la proteína BCSP31 es simplemente una de las varias posibilidades evidentes que un experto en la materia seleccionaría según las circunstancias, sin ejercicio de actividad inventiva, para resolver el problema planteado, ya que no presenta ninguna ventaja adicional. La elección de la sonda, una vez elegidos los cebadores y el fragmento a amplificar mediante PCR, y el procedimiento reivindicado son considerados como una práctica rutinaria y conocida en el uso de la técnica PCR y por lo tanto, obvia para un experto en la materia.

Por consiguiente, la invención reivindicada en las reivindicaciones 1-14 no implica actividad inventiva según el art. 8 LP Ley 11/1986.

Hoja adicional

El documento D03 divulga un estudio comparativo de los métodos serológicos, culturales y moleculares de detección de organismos de Brucella en toros. Para ello realiza, entre otras, la técnica de la PCR en tiempo real utilizando los cebadores B4 y B5 de una secuencia nucleotídica del gen que codifica para la proteína BCSP31 y una sonda de hibridación marcada con sustancias fluorescentes, entre las que se encuentran FAM y TAMRA. Además, estos estudios comparativos que se divultan en este documento son realizados a partir de muestras de suero y también muestras de semen de toro (ver resumen, material y métodos, discusión y conclusión). Los cebadores elegidos en este documento (B4 y B5) no concuerdan con los reivindicados en la solicitud de patente, sin embargo, se considera que la elección de cebadores para la amplificación de un fragmento de 140 pares de bases de este gen es simplemente una de las varias posibilidades evidentes que un experto en la materia seleccionaría según las circunstancias, sin ejercicio de actividad inventiva, para resolver el problema planteado.

A la vista de lo que se conoce en el estado de la técnica sobre el uso de la PCR y sus distintas variantes, que son técnicas ampliamente conocidas en el campo de la biotecnología, no se considera que requiera ningún esfuerzo inventivo para un experto en la materia desarrollar una sonda para la hibridación de un fragmento determinado de la proteína CBSP31 como el descrito en las reivindicaciones 4 a 6 y el procedimiento y kit como el descrito en las reivindicaciones 7 a 11 y 12 a 14 respectivamente.

Además, el hecho de que se utilicen también muestras de semen además de las de suero, hacen que las muestras de orina, líquido cefalorraquídeo y pus reivindicadas en la solicitud de invención sean simplemente unas de varias posibilidades evidentes que un experto en la materia seleccionaría según las circunstancias, sin el ejercicio de actividad inventiva, para resolver el problema planteado.

Por consiguiente, la invención reivindicada en las reivindicaciones 1-14 no implica actividad inventiva según el art. 8 LP Ley 11/1986.