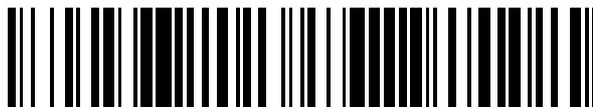


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 578 367**

21 Número de solicitud: 201630606

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

11.05.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

26.07.2016

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (100.0%)
Edificio Emprendia - Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**FERNÁNDEZ ÁLVAREZ, Clara;
FERNÁNDEZ GONZÁLEZ, Santiago y
SANTOS RODRÍGUEZ, Ysabel**

74 Agente/Representante:

CAMIÑA TATO, Montserrat

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y/O IDENTIFICACIÓN DE
AEROMONAS SALMONICIDA SPP. SALMONICIDA**

57 Resumen:

La presente invención es un procedimiento para detectar, cuantificar y/o identificar Aeromonas salmonicida spp. salmonicida en un ensayo de PCR en tiempo real. El procedimiento comprende realizar un ensayo de PCR en tiempo real en muestras de cultivos bacterianos, puros o mixtos, o en ADN aislado de cultivos bacterianos, puros o mixtos o en tejidos de peces, usando una pareja de cebadores específicos para Aeromonas salmonicida spp. salmonicida y detectar, cuantificar e identificar las secuencias nucleotídicas amplificadas. La invención también proporciona un kit para detectar, cuantificar e identificar Aeromonas salmonicida spp. salmonicida que comprende los cebadores mencionados anteriormente, fragmentos de ADN control, desoxinucleótidos trifosfato, tampón de reacción y manual de instrucciones.

ES 2 578 367 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la detección, cuantificación y/o identificación de *Aeromonas salmonicida* spp. *Salmonicida*

SECTOR TÉCNICO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a procedimiento y kit para su utilización en la detección específica de *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* en cultivos bacterianos, puros y mixtos, y en muestras de tejidos de peces, mediante un procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real con un fluorocromo. El procedimiento es de aplicación en el sector de la acuicultura para el control de infecciones en peces salmónidos y no salmónidos, así como para la detección del patógeno en poblaciones naturales.

ESTADO DE LA TÉCNICA

10 La furunculosis clásica es una enfermedad bacteriana causada por una bacteria Gram-negativa denominada *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* o también conocida como *A. salmonicida* típica. La enfermedad presenta una amplia distribución geográfica y afecta a peces salmónidos y no salmónidos de agua dulce y marina, tanto en poblaciones naturales como en granjas de producción (Austin y Austin, 2007). La furunculosis es una enfermedad sistémica con manifestaciones aguda, crónica y subclínica, que causa grandes pérdidas económicas en el sector de la acuicultura a nivel mundial (Austin y Austin, 2007). Sin embargo, se han descrito otras subespecies de *A. salmonicida*, como *Aeromonas salmonicida* spp. *achromogenes*, *Aeromonas salmonicida* spp. *masoucida* y *Aeromonas salmonicida* spp. *smithia* que también son capaces de afectar a una gran variedad de especies de peces, produciendo furunculosis atípica. Los signos clínicos de las furunculosis causadas por las subespecies típicas y atípicas de *A. salmonicida* en los peces afectados son muy similares, dificultando el diagnóstico presuntivo basado en la clínica.

25 Debido a esto, el diagnóstico de la enfermedad se basa habitualmente en el aislamiento del agente patógeno, a partir de tejidos de los peces enfermos, y su identificación mediante métodos microbiológicos convencionales que implican el aislamiento del agente patógeno y su identificación mediante pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, empleando métodos clásicos o sistemas multiprueba de caracterización (Santos *et al.*, 1993. *Aquaculture*. 116: 111-120). Los estudios fenotípicos, serológicos y moleculares han demostrado que *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* constituye un grupo homogéneo, a diferencia de las restantes subespecies conocidas como *Aeromonas salmonicida* atípicas (*A. salmonicida* spp. *achromogenes*, *A. salmonicida* spp. *masoucida*). Sin embargo, estos métodos presentan limitaciones importantes como son: i) lento crecimiento de la bacteria y ii) dificultad para distinguir entre las subespecies de *Aeromonas salmonicida* en base a caracteres fenotípicos.

35 La identificación de *A. salmonicida* y su detección en tejidos de peces enfermos también puede realizarse utilizando métodos que no requieran el aislamiento del microorganismo en cultivo puro como son la técnica de ELISA (Hiney *et al.*, 1994. *Dis. Aquat. Organ.* 19: 161-167), PCR convencional (Hiney *et al.*, 1992. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1039-1042; Gustafson *et al.*, 1992. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3816-3825; Miyata *et al.*, 1996. *Aquaculture*, 141: 13-24), amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP) (Kulkarni *et al.*, 2009. *J Rapid Methods Autom Microbiol.* 17: 476-489), PCR múltiple (mPCR) (Altinok *et al.*, 2008. *Vet. Microbiol.* 131:332-338; Onuk *et al.*, 2010. *J Vet Sci.* 11(3): 235-241; Kulkarni *et al.*, 2010. *Aquac. Res.* 41, 1533-1538), mPCR combinada con microarrays (González *et al.*, 2004. *J Clin Microbiol.*, 42:1414-1419). Sin embargo, ninguno de los métodos descritos hasta el momento permiten la diferenciación de *Aeromonas salmonicida* a nivel de subespecies.

45 La PCR en tiempo real es una técnica sensible que permite la cuantificación de los productos generados en la reacción de PCR, mediante la detección por fluorescencia del producto generado (Higuchi *et al.*, 1993. *Biotechnology* 11, 1026-1030). Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para la detección, cuantificación e identificación de bacterias patógenas Gram-negativas que infectan a peces incluyendo *A. salmonicida* (Balcázar *et al.*, 2007. *J. Med. Microbiol.*, 56: 323-328; Keeling, 2013. *J. Fish Dis.* 36: 495-503). Pero ninguno de estos procedimientos permite diferenciar entre las subespecies de *A. salmonicida*.

50 En 1996, Miyata *et al.* describieron una pareja de cebadores utilizando como diana un fragmento de 512 pares de bases (pb), obtenido tras la amplificación aleatoria del genoma (RAPD) de la cepa de referencia ATCC14174 de *A. salmonicida* spp. *salmonicida*, utilizando como cebadores de la reacción secuencias arbitrarias de ADN sintético. El método de PCR convencional descrito por estos investigadores permite la diferenciación de *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* de las subespecies atípicas *masoucida* y *achromogenes*. Sin embargo, este método es lento, tedioso y costoso al requerir la extracción del ADN a partir de los cultivos bacterianos y el análisis de los productos de amplificación mediante electroforesis. Además, la secuencia diana descrita por Miyata *et al.* (1996) no tiene una función conocida, no está depositada en GenBank y se desconoce si se trata de una secuencia de copia única o múltiple, lo cual dificulta el diseño de otros procedimientos de diagnóstico basados en PCR no convencional.

60 En 2014, otros autores proponen un método de diagnóstico para *A. salmonicida* spp. *salmonicida* basado en la detección de producto final (CN104357570), mediante amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP), utilizando tres parejas de cebadores. Sin embargo, este método cuenta con una especificidad baja ya que, no es capaz de detectar niveles bajos de ADN o ADN de baja calidad (Fukuta *et al.*, 2003. *Arch. Virol.* 148:1713-1720; Kubota *et al.*, 2008. *Phytopathology* 98:1045-1051). Sumado a esto, la técnica LAMP precisa la confirmación de los resultados

mediante métodos espectrofotométricos o de electroforesis, lo que incrementa el coste y tiempo necesario para el diagnóstico.

5 Todo lo expuesto pone de manifiesto la necesidad de desarrollar un procedimiento específico, sensible, rápido y barato para la identificación de *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* en muestras de peces así como, para su diferenciación de las especies que producen la furunculosis atípica. Un procedimiento que comprende la realización de una PCR en tiempo real con un fluorocromo junto a la curva de fusión para la identificación del patógeno de peces *A. salmonicida* spp. *salmonicida*, sería un procedimiento adecuado para alcanzar este fin.

10 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

15 La presente invención se refiere a un procedimiento y kit para la detección, cuantificación y/o identificación de *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* y, más concretamente, para la detección, cuantificación y/o identificación de ADN específico de *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* o bien, a partir de cultivos bacterianos, puros o mixtos, o bien a partir de muestras de tejidos de peces. La invención se basa en la amplificación y cuantificación de ADN mediante PCR en tiempo real. El procedimiento propuesto comprende la amplificación de un fragmento de 119 pb perteneciente a un gen que codifica una proteína efectora con actividad serina/treonina quinasa del sistema de secreción Tipo III específica de *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida*. En dicha amplificación se incluye el fluorocromo SYBR Green que permite la detección de los productos de la amplificación. La lectura continua de la fluorescencia durante el proceso permite identificar al patógeno en base al pico de fluorescencia específico. Este procedimiento no amplifica el ADN de otras subespecies de *Aeromonas salmonicida*, ni el ADN de peces hospedadores, siendo los cebadores diseñados altamente específicos e informativos.

25 La técnica propuesta es más sensible y específica que los métodos moleculares descritos hasta la fecha y presenta las siguientes ventajas:

- La identificación de *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* a partir de cultivos bacterianos, puros o mixtos, y de tejidos así como, su diferenciación de las subespecies *Aeromonas salmonicida* spp. *achromogenes* y *Aeromonas salmonicida* spp. *masoucida*, principales agentes causales de furunculosis atípica.
- Se reduce el coste y tiempo necesario para el diagnóstico de la furunculosis.
- 30 - La detección de los productos de 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 para la detección de los productos obtenidos.
- 35 - Gracias al uso de la PCR en tiempo real, donde no se requiere la manipulación de los productos de PCR al final de la amplificación, se disminuye el riesgo de contaminación.
- Permite la monitorización de la respuesta a los diversos tratamientos así como, la detección temprana de recidivas
- Es susceptible de ser automatizado.

40 Constituye un primer objeto de la presente invención un procedimiento para la detección, cuantificación y/o identificación de *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* en muestras de cultivos bacterianos, puros y mixtos, y en tejidos de peces que comprende las siguientes etapas:

- a) Aislar muestras de:
 - 45 i. Cultivo bacteriano, puro o mixto o,
 - ii. ADN de un cultivo bacteriano, puro o mixto, o de tejidos de peces
- b) Realizar un ensayo de PCR en tiempo real sobre las muestras de la etapa a) utilizando una pareja de cebadores específicos para *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* identificados por las secuencias SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2 y un fluorocromo.
- 50 c) Detectar, cuantificar y/o identificar las secuencias nucleotídicas amplificadas como resultado de la PCR en tiempo real.

Una realización de esta invención es el procedimiento de la invención, donde se utilizan cebadores que tienen una identidad del 75% respecto a los cebadores identificados por las secuencias SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2. Una realización preferente es un procedimiento de la invención donde dicha identidad es del 85%. Una realización más

preferente es un procedimiento de la invención donde dicha identidad es del 95% y una realización aún más preferente es un procedimiento de la invención donde dicha identidad es del 99%.

5 En la presente solicitud, el porcentaje de identidad en una secuencia determinada se calcula teniendo en cuenta que un 99% de identidad significa que un 99% de residuos de la secuencia completa de los cebadores identificados por las secuencias SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2 son idénticos a los residuos de la secuencia determinada.

Otra realización de la invención es un kit para detectar, cuantificar y/o identificar *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* en un ensayo de PCR en tiempo real, que comprende:

- 10 a) La pareja de cebadores específicos para *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* identificados por las secuencias SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2,
- b) Un fluorocromo,
- c) Desoxinucleótidos trifosfato,
- d) Tampón de reacción,
- 15 e) Un control positivo,
- f) Manual de instrucciones que detalla el procedimiento a seguir.

El control positivo está presente en el kit para permitir determinar el correcto funcionamiento de los componentes del kit.

Una realización preferente es el kit de la invención donde el fluorocromo es SYBR Green.

20 Una realización preferente es el kit de la invención donde el control positivo es ADN de *A. salmonicida* spp. *salmonicida* de la cepa de referencia ATCC33658.

Otra realización preferente es un kit de la invención donde dichos desoxinucleótidos trifosfato son dATP, dCTP, dGTP y dTTP a una concentración final 200 μ M.

25 Otra realización preferente es un kit de la invención donde dicho tampón de reacción es 50 mM de cloruro de potasio, 10 mM TrisHCl pH 9,0 a temperatura ambiente, 2,5 mM de $MgCl_2$, 20mM $(NH_4)_2SO_4$, 2,5 unidades de polimerasa por 25 μ L de reacción.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30 **Figura 1.** Curva de disociación de los productos de amplificación obtenidos utilizando suspensiones bacterianas de *A. salmonicida* spp. *salmonicida* que muestra un valor de temperatura de fusión de 80,5-81,0°C, específica para el fragmento de 119 pb amplificado.

35 **Figura 2.** Curvas de disociación obtenidas utilizando ADN extraído a partir de tejidos infectados con suspensiones de *A. salmonicida* spp. *salmonicida* de diferentes concentraciones (2×10^9 hasta 2×10^2 células/mL) que muestra el producto de amplificación característico de la subespecie *salmonicida* ($T_m=80,5-81,0^\circ C$). En el eje de abscisas se indica la temperatura de fusión y en el eje de ordenadas la derivada de las unidades de fluorescencia relativa.

40 **Figura 3.** Curvas de disociación obtenidas utilizando suspensiones bacterianas de *A. salmonicida* típica y atípicas que muestra la ausencia del producto de amplificación característico de la subespecie *salmonicida* ($T_m=80,5-81,0^\circ C$) en las subespecies atípicas (*A. salmonicida* spp. *achromogenes*, y *A. salmonicida* spp. *masoucida*). En el eje de abscisas se indica la temperatura de fusión y en el eje de ordenadas la derivada de las unidades de fluorescencia relativa.

45 **Figura 4.** Recta de calibrado obtenida con el protocolo de PCR cuantitativa descrito utilizando como fuente de ADN suspensiones de *A. salmonicida* spp. *salmonicida* con diferentes concentraciones (2×10^9 hasta 2×10^2 células/mL). Coeficiente de correlación (R^2)=0,992.

50 **Figura 5.** Recta de calibrado obtenida con el protocolo de PCR cuantitativa descrito utilizando ADN obtenido a partir de tejidos infectados con diferentes concentraciones de *A. salmonicida* spp. *salmonicida*. Coeficiente de correlación (R^2)=0,981

MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se ilustra adecuadamente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

55

Ejemplo 1. Diseño de cebadores específicos

Los cebadores específicos se diseñaron en base a la secuencia de 3735 pb del gen *aopO* de *A. salmonicida* spp. *salmonicida* A449, localizado en el plásmido pAsa5 (GenBank Accession no.DQ386862.1) el cual codifica para una proteína serina/treonina kinasa de tipo III del sistema de secreción ligada a la virulencia (Dacanay *et al.*, 2006). Para el diseño de los cebadores y para testar su especificidad, se utilizaron las herramientas Pick Primer y Primer-BLAST, del Servicio de Información del Centro Nacional de Biotecnología. Para la evaluación de las propiedades de los cebadores y para optimizar las condiciones de la PCR en tiempo real se utilizó IDT SciTools Web Tools (Integrated DNA Technologies, Inc.). Se desarrollaron el cebador directo, *Asal-aopO-FW* y el cebador inverso *Asal-aopO-RV* (Tabla 1).

La especificidad de los cebadores se evaluó usando la herramienta BLAST para alineamiento frente a otras secuencias recogidas en la base de datos GenBank. Estos cebadores franquean un fragmento interno de 119 pb del gen *aopO*.

Tabla 1. Secuencias de los cebadores específicos diseñados para *A. salmonicida* spp. *salmonicida*.

Cebador (oligonucleótido)	Secuencia 5'→3'
<i>Asal-aopO-FW</i> Caracterizado por SEQ ID NO:1	AGCTCATCCAATGTTCCGGTATT
<i>Asal-aopO-RV</i> Caracterizado por SEQ ID NO:2	AAGTTCATCGTGCTGTTCCA

Ejemplo 2. Ensayos de patogenicidad

La infección bacteriana se realizó a través de una inyección intraperitoneal a juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (10,0 ±0,1 gramos) con una suspensión bacteriana de *A. salmonicida* SK181/12, SK164/12, MT416 y TO96 7.1, siguiendo la metodología previamente descrita (Santos *et al.*, 1991. *J Appl Ichthyol* 7, 160-167). En resumen, los peces fueron anestesiados por inmersión en tricaina metano sulfonato (MS-222, Sigma) (60mgL⁻¹, Neiffer & Stamper, 2009) y se les inyectó intraperitonealmente 0,1 mL de suspensión bacteriana que contenía entre 10⁶ y 10⁹ células/mL (10 peces por dosis). Durante el experimento, los peces fueron mantenidos en un tanque de 100 litros con agua dulce aireada. Los peces moribundos fueron sacrificados mediante una sobredosis de anestésicos y se extrajeron en condiciones asépticas muestras de sangre, bazo y riñón para su análisis mediante métodos basados en cultivo y caracterización bacteriana y análisis de PCR en tiempo real con SYBR Green.

Ejemplo 3. Aislamiento de ADN a partir de cultivos bacterianos y/o tejidos de peces

A partir de cultivos puros y mixtos de los microorganismos problema, se prepararon suspensiones bacterianas en agua estéril libre de nucleasas ajustadas a una concentración final aproximada de entre 3 x 10⁹ y 3 x 10¹² células/mL (tubo 7 de la escala MacFarland). El número de unidades formadoras de colonias (UFC) se determinó mediante el método de recuento en placa, usando medio agar Soja Tríplica suplementado con 1% de NaCl (TSA-1) y se contaron las colonias de bacterias producidas.

El ADN de cultivos bacterianos, puros y mixtos, se obtuvo usando InstaGene Matrix (BioRad).

A partir de peces sanos (sacrificados por sobredosis de anestésico), se obtuvieron tejidos (riñón, bazo y sangre), se homogenizaron con solución salina a una concentración final del 25% peso/volumen, se inocularon con un volumen igual de suspensiones bacterianas de la cepa de referencia de *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* ATCC33658 conteniendo entre 1,5 x 10⁹ y 1, 5x 10² células/mL y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. El número de unidades formadoras de colonias (UFC) se determinó mediante el método de recuento en placa. Se prepararon también homogenizados de tejidos no inoculados para utilizarlos como control negativo. Los homogenizados se utilizaron en la reacción de PCR con o sin extracción previa de ADN.

A partir de tejidos obtenidos a partir de peces infectados experimentalmente con *A. salmonicida* spp *salmonicida* (cepas SK181/12, SK164/12, MT416 y TO96 7.1), se prepararon homogenizados en solución salina como se describió en el párrafo anterior. Los homogenizados obtenidos se utilizaron en la reacción de amplificación directamente o previa extracción del ADN.

Además, para la validación y comparación del procedimiento, tejidos de 40 truchas arcoíris cultivadas (10g ±1g) y 40 rodaballos (45g ± 5g) con y sin síntomas clínicos de furunculosis y 20 rodaballos con síntomas de tenacibaculosis fueron procesados como se describió anteriormente antes de ser utilizados en los ensayos de PCR en tiempo real y métodos microbiológicos.

El ADN se obtuvo a partir de los homogenizados de tejidos utilizando Dynabeads® DNA Direct™ Universal (Dyna).

El ADN obtenido a partir de cultivos bacterianos y de homogenizados de tejidos se almacenaron a -20°C hasta su uso.

5 **Ejemplo 4. Amplificación de fragmentos de ADN a partir de cultivos puros y mixtos.**

En la amplificación se utilizó la siguiente mezcla de reacción: 12,5 µL de Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x), no ROX, (Thermo Scientific), 1 µL de cada cebador (SEC ID NO 1 y SEC ID NO 2) (400 nmoles), 5 µL de la suspensión bacteriana problema o 2 µL de ADN bacteriano purificado. Se completó el volumen de la reacción con agua destilada estéril hasta los 25 µL.

10 La mezcla de reacción se sometió a amplificación en un termociclador MiniOpticon para PCR en tiempo real, con el software de detección CFX Manager™ (BioRad), en las siguientes condiciones: un paso inicial de incubación a 95°C durante 15 min, seguido de 35 ciclos consistentes en una desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, y una hibridación a 62°C durante 30 segundos. El análisis de las curvas de fusión de los productos amplificados se llevó a cabo mediante el aumento gradual de la temperatura desde 60°C a 100°C en intervalos de 0,5°C durante 10 segundos y lectura continua de la fluorescencia para determinar la Tm del producto de amplificación específico para *A. salmonicida* spp. *salmonicida*. En todas las muestras positivas para *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* se detectó un pico de amplificación con una temperatura de fusión de 80,5-81,0°C (Figura 1). Estos resultados indican que la técnica de PCR y los cebadores descritos en la presente invención, permiten un diagnóstico sensible, rápido y económico de la furunculosis típica.

20 **Ejemplo 5. Amplificación de fragmentos de ADN a partir de tejidos de peces.**

En la amplificación se utilizó la siguiente mezcla de reacción: 12,5 µL de Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific), 1 µL de cada cebador (SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 2) (concentración final de 400 nm) y 2-5 µL de ADN extraído. Se completó el volumen de la reacción con agua destilada estéril hasta los 25 µL.

25 La mezcla de reacción se sometió a amplificación en un termociclador MiniOpticon para PCR en tiempo real, con el software de detección CFX Manager™ (BioRad), en las siguientes condiciones: un primer paso de incubación a 95°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos consistentes en una desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, hibridación a 62°C durante 30 segundos. El análisis de las curvas de fusión de los productos amplificados se llevó a cabo mediante el aumento gradual de la temperatura desde 65°C a 95°C en intervalos de 0,5°C durante 10 segundos y lectura continua de la fluorescencia para determinar la Tm del producto de amplificación específico para *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida*. En todas las muestras de tejido analizadas, la presencia de un pico de amplificación con una Tm de 80,5-81,0°C (Figura 2), indicó la presencia de *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* en el tejido del pez infectado. La bacteria se detectó en todas las muestras de peces que mostraron síntomas clínicos de furunculosis. No se obtuvo amplificación con muestras de ADN de tejidos de peces sanos o infectados con otras especies bacterianas. Estos resultados indican que la técnica de PCR cuantitativa y los cebadores descritos en la presente invención pueden ser empleados como un método de diagnóstico utilizando los tejidos de peces enfermos como fuente de ADN.

40 **Ejemplo 6. Especificidad y sensibilidad de la PCR en tiempo real con SYBR Green.**

La especificidad del ensayo de la PCR en tiempo real y la existencia de amplificaciones cruzadas fueron evaluadas utilizando una muestra de ADN de *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* (40 cepas) y varias bacterias no diana incluyendo subespecies atípicas de *Aeromonas salmonicida* (*Aeromonas salmonicida* spp. *achromogenes* (n=1), *Aeromonas salmonicida* spp. *masoucida* (n=1), *Aeromonas sobria* (n=1), *A. caviae* (n=1), *A. bestiarum* (n=1) y *A. hydrophila* (n=1), así como, otras bacterias representativas de especies patógenas de peces no relacionadas pertenecientes a los géneros, *Tenacibaculum* (n=4), *Flavobacterium* (n=2), *Yersinia* (n=1), *Vibrio* (n=5), *Listonella* (n=2), *Edwardsiella* (n=2), *Streptococcus* (n=2), *Vagococcus* (n=1), *Lactococcus* (n=2) y *Renibacterium* (n=1) que afectan a peces de agua dulce y salada.

50 En las PCR en tiempo real realizadas se detectó el gen *aopO* en todas las cepas de *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida*, cuando se utilizaron las suspensiones bacterianas directamente o el ADN extraído a partir de ellas. La curva de fusión mostró un único pico con un valor Tm medio de entre 80,5 y 81,0°C. No se obtuvo amplificación cuando se utilizaron las suspensiones bacterianas o el ADN extraído de subespecies atípicas (*Aeromonas salmonicida* spp. *achromogenes*, *Aeromonas salmonicida* spp. *masoucida*) (Figura 3) o de otras especies bacterianas no relacionadas taxonómicamente.

55 Para el ensayo de sensibilidad, tanto las suspensiones bacterianas (con y sin previa extracción de ADN) como el ADN de tejidos de peces infectados, fueron utilizados para generar una curva estándar usada para la cuantificación de las muestras desconocidas. Se preparó un gráfico representando los valores Ct frente al log₁₀ de ADN o concentración bacteriana. La eficiencia de los ensayos de la PCR en tiempo real se calculó con la pendiente de la recta de acuerdo con la ecuación $E=10^{(-1/m)}-1$. La linealidad de la curva de calibración se expresó como coeficiente de correlación (R²). Las Figura 4 y 5 muestran las rectas de calibrado obtenidas utilizando ADN bacteriano o ADN obtenido a partir de tejidos, respectivamente.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la detectar, cuantificar y/o identificar *Aeromonas salmonicida spp. salmonicida* en un único ensayo de PCR en tiempo real que comprende:
 - 5 a. Aislar muestras de:
 - i. Cultivo bacteriano, puro o mixto, o,
 - ii. ADN de un cultivo bacteriano, puro o mixto, o de tejidos de peces
 - 10 b. Realizar dicho ensayo de PCR en tiempo real sobre las muestras de la etapa a) utilizando una pareja de cebadores específicos para *Aeromonas salmonicida spp. salmonicida* identificados por las secuencias SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2.
 - c. Detectar las secuencias nucleotídicas amplificadas como resultado de dicha PCR en tiempo real.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde se utilizan cebadores que tienen una identidad del 75% respecto a los cebadores identificados por las secuencias SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, donde dicha identidad es del 85%.
- 15 4. Procedimiento según la reivindicación 2, donde dicha identidad es del 95%.
5. Procedimiento según la reivindicación 2, donde dicha identidad es del 99%.
6. Procedimiento según la reivindicación 1 a 5 en el que la temperatura de fusión del producto de amplificación obtenido mediante la PCR en tiempo real está comprendida entre 80,5°C y 81,0°C
- 20 7. Kit para la detección, cuantificación y/o identificación de *Aeromonas salmonicida spp. salmonicida* en un único ensayo de PCR en tiempo real, que comprende:
 - a. Los cebadores específicos identificados por las secuencias SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2.
 - b. Un fluorocromo
 - c. Control positivo
 - d. Desoxinucleótidos trifosfato,
 - 25 e. Tampón de reacción
 - f. Manual de instrucciones que detalla el procedimiento a seguir.
8. Kit según la reivindicación 7, donde el fluorocromo se selecciona de la lista que consiste en: FAM, DABCYL, CY-3, JOE, VIC, CY-5, TAMRA, SYBR Green, ROX, Rojo de Texas.
9. Kit según la reivindicación 8, donde el fluorocromo es SYBR Green.
- 30 10. Kit según la reivindicación 7 a 9 donde los desoxinucleotidos trifosfato son dATP, dCTP, dGTP y dTTP en una concentración final de 200 µM.
11. Kit según una de las reivindicaciones 7 a 10, donde dicho tampón de reacción es 50 mM de cloruro de potasio, 10 mM TrisHCl pH 9,0 a temperatura ambiente, 2,5 mM de MgCl₂, 20mM (NH₄)₂SO₄, 2,5 unidades de polimerasa por 25 µL de reacción).
- 35 12. Kit según una de las reivindicaciones 7 a 11, donde el control positivo es ADN de *A. salmonicida spp. salmonicida* de la cepa de referencia ATCC33658.

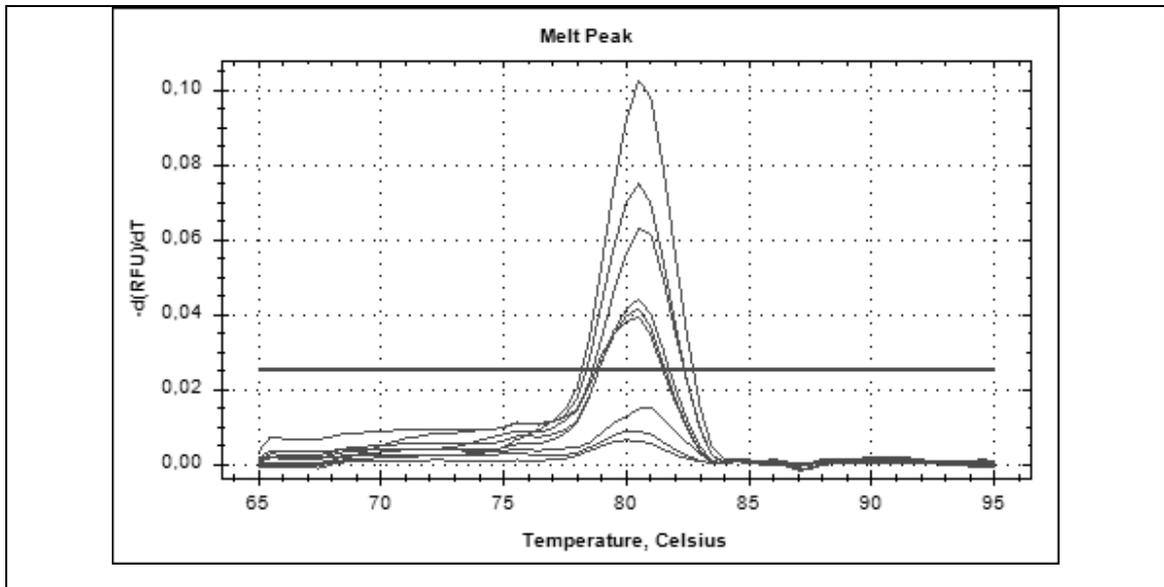


FIG.1

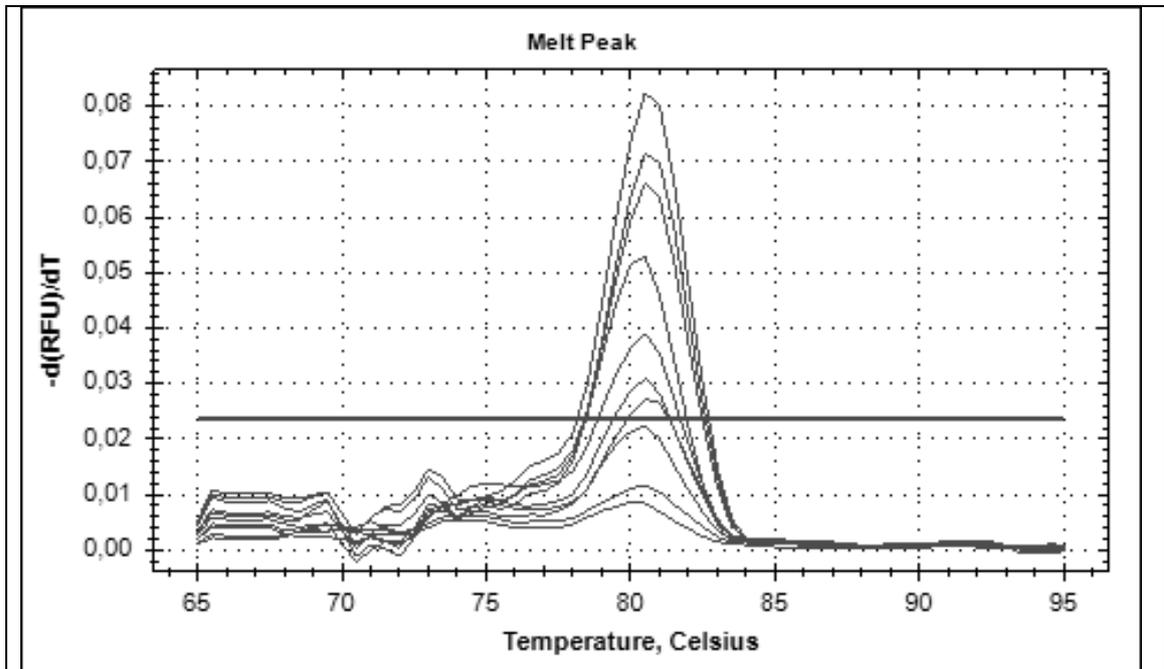


FIG.2

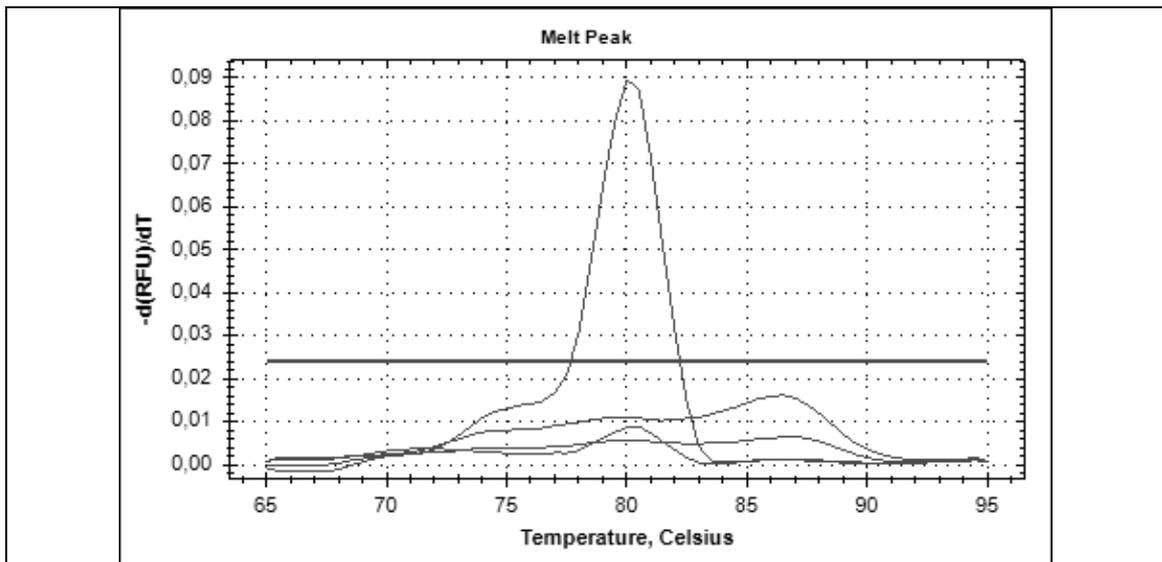


FIG.3

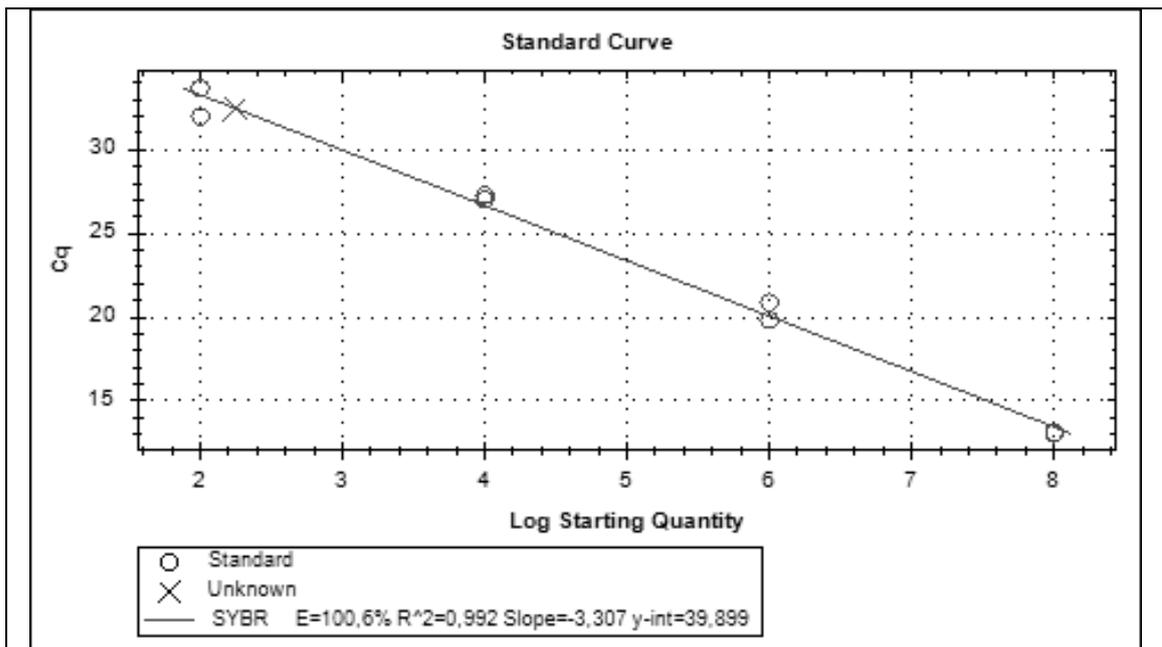


FIG.4

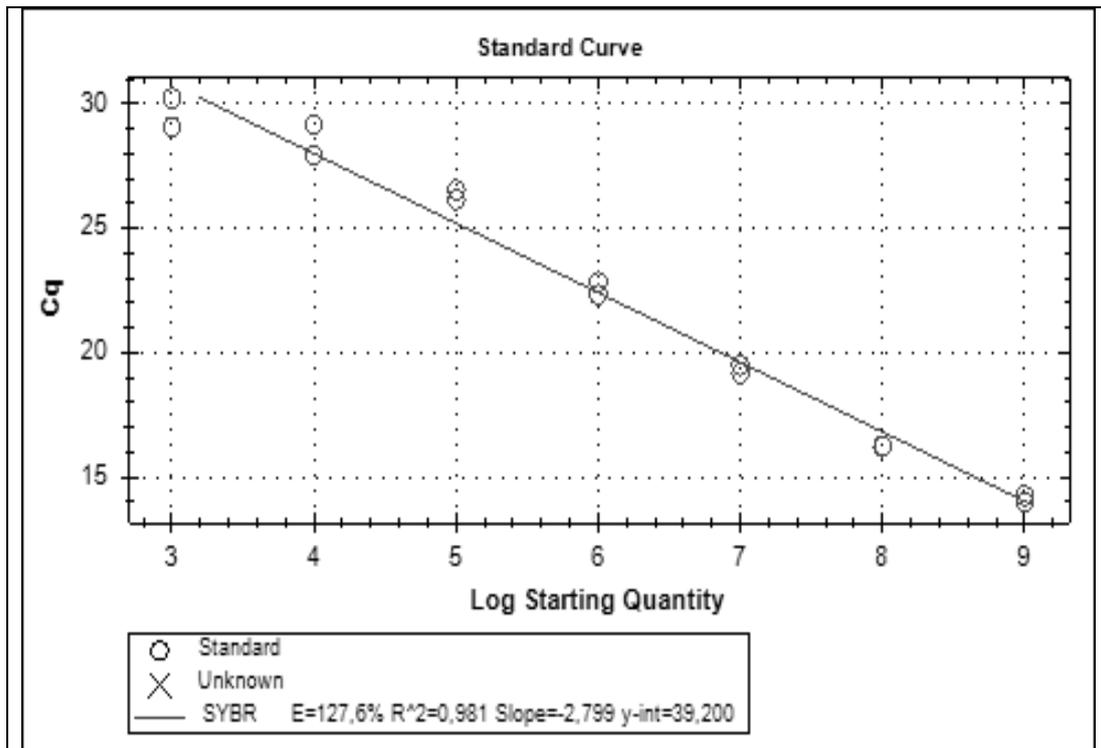


FIG.5



- ②① N.º solicitud: 201630606
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 11.05.2016
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CN 104357570 A (FW FISHERIES RES CT CAFS) 18.02.2015, resumen de la base de datos WPI. Recuperado de EPOQUE el 13/07/2016; número de acceso: 2015-22901A.	1-12
A	WO 9311263 A1 (GANNON, BERNARD, FRANCIS, XAVIER [IE/IE]) 10.06.1993, página 2, línea 4 – página 4, línea 21.	1-12
A	JPH 03280882 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO) 11.12.1991, resumen de la base de datos WPI. Recuperado de EPOQUE el 13/07/2016; AN: 1992-035928.	1-12

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:

<p>Fecha de realización del informe 14.07.2016</p>	<p>Examinador M. D. García Grávalos</p>	<p>Página 1/4</p>
---	--	------------------------------

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, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EBI, USPTO PATENT DATABASE, GOOGLE PATENTS.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 14.07.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones	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 se publica.

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	CN 104357570 A	18.02.2015
D02	WO 9311263 A1	10.06.1993
D03	JPH 03280882	11.12.1991

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

La presente solicitud de invención divulga un procedimiento para detectar, cuantificar y/o identificar *Aeromonas salmonicida* spp *salmonicida* realizando un ensayo PCR en tiempo real en muestras de cultivos bacterianos, puros o mixtos, o en ADN aislado de estos cultivos o de tejidos de peces, empleando una pareja de cebadores específicos definidos por las secuencias SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 (reivindicaciones 1-6). Se refiere también a un Kit para llevar a cabo el procedimiento de la invención que contiene o cebadores específicos, incluyendo también otros reactivos (reivindicaciones 7-12).

El documento D01 divulga un método para detección rápida de *Aeromonas salmonicida* spp *salmonicida*, empleando tres pares de cebadores específicos para el gen *fstC* y el método de "Amplificación Isotérmica Mediada por Loop (LAMP) de Ácidos Nucleicos". Se refiere también al uso de este método para identificación y seguimiento de especies de patógenos de animales acuáticos (ver resumen WPI, AN: 2015-22901A).

El documento D02 divulga una sonda de ADN específica para *Aeromonas salmonicida* y su uso en un método de detección o determinación de *Aeromonas salmonicida* en una muestra de un cultivo bacteriano, de tejido de pescado, de heces de salmónidos o de una muestra de agua y/o sedimentos procedentes de la cría de salmónidos (ver todo el documento).

El documento D03 divulga un método para una identificación temprana de patógenos causantes de la furunculosis y otras enfermedades en peces, empleando una secuencia de DNA de 352 pb perteneciente a una cepa de *Aeromonas hydrophila* o *Aeromonas salmonicida* (ver resumen WPI, AN: 1992-035928).

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)**1.1. REIVINDICACIONES 1-12**

El documento D01 se considera el más cercano al objeto técnico de la presente invención, ya que anticipa un método para detección rápida de *Aeromonas salmonicida* spp *salmonicida*, empleando tres pares de cebadores específicos para detección de este microorganismo.

La principal diferencia entre D01 y el objeto técnico de la presente invención radica en los cebadores empleados, que son diferentes y están diseñados en base a secuencias de genes diferentes. Por otra parte, el método de la invención, aunque también se basa en el uso de cebadores específicos, es diferente y permite la identificación específica de *Aeromonas salmonicida* spp *salmonicida* realizando un ensayo PCR en tiempo real en muestras de cultivos bacterianos, puros o mixtos, o en ADN aislado de estos cultivos o de tejidos de peces. De este modo, se considera que el método reivindicado en la presente invención es nuevo y ofrece una alternativa diferente a lo divulgado en el estado de la técnica.

En consecuencia, las reivindicaciones 1-12 cumplen el requisito de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986).

Los documentos D02 y D03 se refieren al estado de la técnica y no se consideran relevantes a efectos de la valoración de la novedad y actividad inventiva de la presente invención.