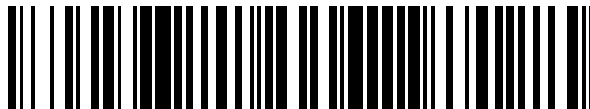


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 942 317**

21 Número de solicitud: 202131113

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/686 (2008.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

30.11.2021

43 Fecha de publicación de la solicitud:

31.05.2023

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (80.0%)
EDIFICIO EMPRENDIA - CAMPUS VIDA
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES y
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (20.0%)**

72 Inventor/es:

**LEIRO VIDAL, José Manuel;
LAMAS FERNÁNDEZ, Jesús y
PALENZUELA RUÍZ, Oswaldo**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN DE ESCUTICOCILIADOS PARÁSITOS**

57 Resumen:

Procedimiento de detección de escuticociliados parásitos.

La presente invención se refiere al uso de la reacción en cadena de la polimerasa para la detección de escuticociliados en muestras, preferiblemente escuticociliados que causan enfermedades en peces planos.

ES 2 942 317 A1

DESCRIPCIÓN

PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN DE ESCUTICOCILIADOS PARÁSITOS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al uso de la reacción en cadena de la polimerasa para la
5 detección de escuticociliados en muestras, preferiblemente escuticociliados que causan
enfermedades en peces planos.

ANTECEDENTES

La escuticociliatosis, producida mayoritariamente por dos especies de ciliados: *Philasterides*
dicentrarchi y *Miamiensis avidus*, es una grave enfermedad que provoca grandes
10 mortalidades en las piscifactorías de cría de peces planos de alto valor comercial,
generando graves pérdidas económicas en este sector de la Acuicultura. Específicamente
en Galicia, las infecciones en el rodaballo están atribuidas a la especie *P. dicentrarchi*;
mientras que, en Asia, las infecciones que afectan a peces planos en cultivo se relacionan
tanto con *P. dicentrarchi* como con *M. avidus*. A este respecto, recientemente se ha
15 establecido que ambos escuticociliados patógenos son especies crípticas, es decir, no
diferenciables morfológicamente, pero que poseen diferencias relevantes a nivel genético.
Estos escuticociliados son microorganismos marinos, originariamente de vida libre, que
poseen una única forma evolutiva vegetativa en su ciclo vital, el trofote, que pueden
transformarse en parásitos histiófagos facultativos produciendo una infección sistémica que
20 afecta a peces planos en cultivo, sobre todo cuando se produce un incremento en la
temperatura del agua del mar. Actualmente, no existen medidas quimioterapéuticas capaces
de controlar esta enfermedad y solamente el empleo de autovacunas pueden prevenir,
parcialmente, los brotes infecciosos. Sin embargo, debido a la gran capacidad de variación
antigénica, y otros mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria del hospedador que
25 poseen estos ciliados, así como la aparición de diferentes cepas, en la mayor parte de los
casos, es imposible lograr un control efectivo a medio y largo plazo de las infecciones con la
utilización de estas herramientas inmunoprolácticas. Actualmente, las medidas más
eficaces de las que dispone el piscicultor para el control de la enfermedad pasan por
implementar medidas de mejora y optimización de las condiciones de manejo e higiene de
30 los peces con el propósito de eliminar aquellos factores ambientales que favorezcan el
crecimiento y desarrollo de los ciliados en los tanques de cultivo. La presencia de estos
escuticociliados en los tanques de cultivo de los peces supone un riesgo evidente para el

desarrollo de los brotes infecciosos que, a su vez, se ven favorecidos por las condiciones de temperatura y presencia de elevadas concentraciones de nutrientes para el escuticociliado en el agua de mar. Por todo ello, para diseñar un control eficaz y minimizar el riesgo de infecciones en los peces, es necesaria una monitorización de la concentración de trofontes de ambas especies en el agua para establecer aquellos niveles de ciliados que, mediante estudios epidemiológicos, se haya comprobado que puedan provocar brotes infecciosos; así como también, localizar los puntos críticos del sistema de cultivo que puedan suponer reservorios o lugares de proliferación que actúen como focos de diseminación y propagación de los parásitos. Para lograr este objetivo, es necesario disponer de herramientas de identificación y cuantificación muy sensibles que permitan detectar niveles muy bajos de ciliados con el fin de establecer lo más rápido posible las medidas de profilaxis y control efectivas.

COMPENDIO DE LA INVENCION

Los inventores han desarrollado y optimizado un ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) que utiliza cebadores y una sonda de hidrólisis dirigida a la región del espaciador transcrito interno 2 (ITS-2, del inglés *internal transcribed spacer-2*) situada entre la subunidad pequeña 18 S y la subunidad grande 23S del ADN ribosómico (ADNr) que permite cuantificar de forma sensible y específica los niveles de trofontes de los escuticociliados parásitos *P. dicentrarchi* y *M. avidus*. Este método permite detectar niveles muy bajos de ciliados parásitos y es especialmente adecuado para su monitorización en el agua de piscifactorías.

Así, en un primer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la detección de escuticociliados en una muestra que comprende:

- a) someter los ácidos nucleicos obtenidos de dicha muestra a una reacción de amplificación de una región diana del genoma del escuticociliado que tiene al menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 1 o de un fragmento de la misma en presencia de un cebador directo y un cebador reverso específicos para dicha región capaces de amplificar dicha región o fragmento, y
- b) detectar el producto de amplificación producido en la etapa a)

donde la detección de un producto de amplificación es indicativa de la presencia de escuticociliados en la muestra.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un oligonucleótido seleccionado de un grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

Aún otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit que comprende una pareja de cebadores de secuencias SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3.

- 5 Otro aspecto más de la presente invención se refiere al uso del oligonucleótido según la invención o el kit según la invención para detectar escuticociliados en una muestra.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Gel de agarosa al 2% mostrando los resultados de PCR para la detección específica de *P. dicentrarchi* utilizando los cebadores f/r ITS2 y las condiciones optimizadas de 2,5 mM de MgCl₂ en la mezcla de reacción de PCR; a una temperatura de alineamiento de 60°C y 35 ciclos de amplificación. Las PCR se realizaron añadiendo 50 ng de ADN molde. M= marcadores de tamaño molecular (fragmentos de 50 pares de bases). Canal 1: control negativo –NTC- (sustitución de la muestra por agua destilada); canal 2: ADN de *P. dicentrarchi*, cepa I1; canal 3: ADN de *P. dicentrarchi*, cepa C1; canal 4: ADN de *P. dicentrarchi*, cepa D2; canal 5: ADN de *P. dicentrarchi*, cepa D3; canal 6: ADN de *P. dicentrarchi*, cepa S1; canal 7: ADN de *M. avidus*, cepa Ma/2; canal 8: ADN de *Uronema marinum*, cepa CTAS4/I; canal 9: ADN de *U. marinum*, cepa CLIT/I; canal 10: ADN de *Protocruzia adherens*; canal 11: ADN de *Euplotes minuta*.

Figura 2: Recta de calibración construida con los valores de Cq obtenidos mediante qPCR utilizando como molde el vector pSparkII clonado con el fragmento de ITS2 de *P. dicentrarchi*. En la qPCR se ensayaron diferentes concentraciones del plásmido clonado con el fragmento ITS2 y su correspondiente número de copias utilizando los cebadores f/rITS2 y la sonda pITS2. En el gráfico se incluye también el valor de la pendiente (m) de la recta, la eficiencia (E) de la PCR y la linealidad (coeficiente de correlación línea R^2) de la recta.

Figura 3: Recta de calibrado construida con los valores de Cq obtenidos de una qPCR utilizando como molde ADN obtenido a partir de entre 1 y 64 ciliados. En la qPCR se emplearon los cebadores f/rITS2 y la sonda pITS2 de *P. dicentrarchi*. En la figura se incluyen también los valores de la pendiente (m) de la recta obtenida, así como, la eficiencia (E) de la PCR y la linealidad (R^2) de la recta.

Figura 4: Recta patrón construida para la determinación del límite de detección (LOD) de la qPCR.

En la figura se representan los valores de Cq obtenidos en la qPCR empleando los cebadores f/rITS2 y la sonda pITS2 y, como molde, concentraciones de ADN entre 50 ng y 50 pg. El límite de detección (LOD) del ensayo se corresponde con la menor concentración de ADN (en equivalentes de genoma completo por reacción) que se detecta de forma reproducible con una probabilidad del 95%. Para la determinación del valor de corte del ensayo (*cutoff value*), se calculó el Cq medio del LOD + 2 veces la desviación estándar (\bar{x} LOD+ 2SD) y el resultado se redondeó al número entero más próximo. NTC: Cq obtenida en la qPCR sustituyendo el ADN molde por agua bidestilada.

10 **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

La presente invención se refiere a un procedimiento desarrollado para detectar y cuantificar de forma sensible y específica niveles muy bajos de los escuticociliados *P. dicentrarchi* y *M. avidus*, esencial para poder controlar y limitar la contaminación de dichos parásitos en cultivos de peces planos de alto valor comercial, generando graves pérdidas económicas en este sector de la Acuicultura.

Para ello los inventores han optimizado un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sensible y específica. Así, en un primer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la detección de escuticociliados en una muestra que comprende:

- a) someter los ácidos nucleicos obtenidos de dicha muestra a una reacción de amplificación de una región diana del genoma del escuticociliado que tiene al menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 1 o de un fragmento de la misma en presencia de un cebador directo y un cebador reverso específicos para dicha región capaces de amplificar dicha región o fragmento, y
- b) detectar el producto de amplificación producido en la etapa a)

donde la detección de un producto de amplificación es indicativa de la presencia de escuticociliados en la muestra.

En el contexto de la presente invención el término “detección” se refiere a la identificación de la presencia de un substrato diana. En el presente caso, dicha identificación se refiere a una región presente en el genoma de los escuticociliados. El término “escuticociliados”, tal como se usa en la presente descripción, se refiere a microorganismos unicelulares eucariotas ciliados que pertenecen a la subclase Scuticociliatia en la clase Oligohymenophorea. Estos organismos son marinos, normalmente de vida libre y ampliamente distribuidos por los

océanos mundiales. Cerca de 20 miembros de esta subclase han sido identificados como agentes causantes de la enfermedad escuticociliatosis, en donde estos ciliados son parásitos de otros organismos marinos. En una realización, los escuticociliados pertenecen al orden Philasterida. En una realización preferida, pertenecen a la familia Philasteridae, más preferiblemente al género *Philasterides*. En otra realización preferida, pertenecen a la familia Parauronematidae, más preferiblemente al género *Miamiensis*. En una realización más preferida, los escuticociliados detectados por el método de la invención son *Philasterides dicentrarchi* y/o *Miamiensis avidus*.

En una realización preferida de la invención los escuticociliados son parásitos, preferiblemente son parásitos de peces planos.

El término “parásito”, tal como se usa en la presente invención, se refiere a un tipo de relación entre dos seres vivos, en la cual uno de los participantes, el parásito, depende del otro, el huésped (también llamado hospedante, hospedador o anfitrión) y obtiene algún beneficio. En la mayoría de los casos de parasitismo el hospedador percibe un daño o perjuicio, hasta la muerte, por parte del parásito en algún momento del ciclo de la relación.

El término “muestra”, en el contexto de la presente invención, se refiere a una pequeña cantidad o parte aislada que es representativa del todo, es decir, cuyas características son idénticas al todo de donde se saca la muestra. En una realización particular del procedimiento de la invención la muestra es una muestra biológica o ambiental.

En otra realización particular del procedimiento de la invención la muestra biológica es un fluido biológico o un tejido biológico. Aún en otra realización particular la muestra es un fluido biológico seleccionado de un grupo que consiste en la sangre, líquido peritoneal y orina. En otra realización particular la muestra es un tejido biológico que se selecciona de un grupo que consiste en músculo, hígado, piel, branquias, cerebro, uretra, arteria, estómago, médula espinal, ciego pilórico, bulbo olfativo, ojo, boca, faringe, bazo, páncreas, intestino, ovarios, vejiga natatoria, vejiga urinaria y ano. En una realización particular la muestra es una muestra de tejido u órgano de un pez, preferiblemente de un pez plano. En una realización preferida el pez plano se selecciona del grupo que consiste en rodaballo, lenguado, gallo, platija, rémol, halibut, En una realización aún más preferida, el pez plano es rodaballo.

En otra realización particular del procedimiento de la invención la muestra es una muestra ambiental seleccionada de un grupo que consiste en agua o sustratos sólidos, preferiblemente agua, más preferiblemente agua salada. El agua puede proceder, sin

limitación, del mar, de la desembocadura de ríos (estuarios), de marismas, de rías, de piscifactorías marinas de engorde y de cría o de acuarios públicos o privados de agua salada fría o caliente.

5 En otra realización particular el agua es agua salada obtenida de un estuario, lago salado, marisma, mar, océano, ría, acuicultura marina en instalaciones en tierra o en jaulas, piscifactoría o acuario. En una realización aún más particular el agua es agua de piscifactoría marina. En otra realización particular el agua es de acuarios de animales marinos de agua caliente o fría. Ejemplos de sustratos sólidos son las arenas en contacto con las aguas, redes usadas en sistemas de acuicultura, entre otros. En otra realización
10 particular los sustratos sólidos son arena o redes.

En una realización particular del procedimiento de la invención la muestra es agua y es una muestra pretratada en donde los microorganismos presentes en la muestra de agua han sido concentrados. La concentración de microorganismos en la muestra permite aumentar la sensibilidad del procedimiento de la invención. Así, la concentración de microorganismos se
15 puede realizar de varias formas. Las técnicas más usadas para concentrar microorganismos son la centrifugación y el filtrado, ambas técnicas conocidas por el experto en la materia. Una de dichas técnicas se ejemplifica en la sección de Ejemplos de la presente descripción. En una realización particular el volumen de la muestra de agua es de al menos 1 litro. En otra realización particular el volumen de agua es de al menos 2 litros. En una realización
20 particular del procedimiento de la invención la concentración de microorganismos se realiza mediante un sistema de filtración a vacío secuencial. El término “filtración a vacío secuencial”, tal como se usa en la presente invención, se refiere a un método de filtración donde la filtración se realiza con la ayuda de presión reducida en un contenedor que fuerza el paso del líquido por el filtro. Este proceso se realiza varias veces utilizando filtros con
25 poros secuencialmente más pequeños. En una realización particular del procedimiento de la invención la concentración de microorganismos en una muestra se hace por filtración a vacío secuencial con filtros de 150 μm , 75 μm , 10 μm y 0,8 μm .

El término “microorganismos”, en el presente contexto, se refiere a seres vivos o sistemas biológicos que solo se pueden visualizar con el microscopio. En una realización preferida de
30 la presente invención el término microorganismo hace referencia a los escuticociliados *P. dicentrarchi* y *M. avidus*.

Procedimiento de aislamiento previo de la invención

Tal como se ha mencionado, la muestra del procedimiento de la invención puede ser pretratada para aumentar la concentración de escuticociliados y/o obtener los ácidos nucleicos de los escuticociliados para que sean accesibles a una reacción de amplificación. Así, en una realización particular del procedimiento de la invención, la muestra de agua se procesa previamente según un procedimiento para aislar los ácidos nucleicos, de ahora en adelante el procedimiento de aislamiento de la invención, que comprende:

- (i) Concentración de microorganismos en la muestra, obteniendo una primera solución;
- (ii) Lisis de la primera solución, obteniendo una segunda solución;
- 10 (iii) Neutralización y remoción de polisacáridos de la solución obtenida en la etapa (ii), obteniendo una tercera solución;
- (iv) Remoción de proteínas de la solución obtenida en la etapa (iii) obteniendo una cuarta solución; y
- 15 (v) Purificación del material genético en la solución obtenida en la etapa (iv), obteniendo una solución final que contiene los ácidos nucleicos.

La etapa (i) del procedimiento de aislamiento de la invención permite concentrar los microorganismos existentes en la muestra, de modo que aumenta la sensibilidad del procedimiento de la invención. Las definiciones de “concentración” y “microorganismos” se han descrito previamente, así como las realizaciones particulares referentes a dicha concentración. Dichas definiciones y realizaciones particulares son igualmente aplicables en el presente procedimiento.

Tras realizar concentración a través de filtraciones, los filtros se recogen, rehidratan y los depósitos presentes en los filtros son recogidos en una solución que es utilizada en el procedimiento de la invención. En una realización particular del procedimiento de aislamiento de la invención, los filtros obtenidos en la filtración a vacío secuencial son rehidratados con solución tampón durante 15 minutos a 45 minutos, preferiblemente 30 minutos, a temperatura ambiente. Una “solución tampón” es una mezcla de un ácido débil y su base conjugada o una base débil y su ácido conjugado. Las soluciones tampón sirven para ayudar a mantener un valor estable del pH de otra solución que se mezcla con la solución tampón. En otra realización particular del procedimiento de aislamiento de la invención, los filtros son agitados en la solución tampón. Este paso se realiza para que los depósitos presentes en los filtros pasen a la solución tampón.

Tras obtener la solución de la etapa (i) del procedimiento de aislamiento de la invención, se prosigue con la lisis de dicha solución en la etapa (ii). El término "lisis", tal como se usa en la presente descripción, se refiere a la desintegración de la pared celular y/o membrana celular de los microorganismos presentes en la solución a través de métodos mecánicos, tales como sonicación y ciclos de congelación/descongelación, o métodos químicos, tales como tampones de lisis que cambian el pH, o detergentes que perforan la membrana celular. Durante la lisis celular, también se pueden usar enzimas proteolíticas que degradan proteínas para eliminar proteínas con actividad enzimática que actúan sobre los ácidos nucleicos y así proteger dichos ácidos nucleicos de degradación. En una realización particular del procedimiento de aislamiento de la invención, la etapa (ii) se realiza con dodecilsulfato sódico (SDS) con una concentración de 1% a 20%, preferiblemente 10%, y/o proteinasa K con una concentración de 10 mg/ml a 30 mg/ml, preferiblemente 20 mg/ml. En una realización particular, la etapa (ii) del procedimiento de aislamiento de la invención se realiza con agitación. En otra realización particular la etapa (ii) del procedimiento de aislamiento de la invención se realiza durante 30 min a 90 min. En otra realización particular la etapa (ii) del procedimiento de aislamiento de la invención se realiza durante a 60 min. En otra realización particular la etapa (ii) del procedimiento de aislamiento de la invención se realiza a una temperatura de 30°C a 50°C. En otra realización particular la etapa (ii) del procedimiento de aislamiento de la invención se realiza a una temperatura de 37°C.

Una vez realizada la lisis celular, la próxima etapa, etapa (iii) del procedimiento de aislamiento de la invención, es la neutralización de los compuestos químicos añadidos en el paso anterior para la lisis celular y, si es el caso, para la degradación proteica. Esto se puede llevar a cabo a través de una precipitación en una solución con elevada concentración de sales o con el uso de detergentes, tal como el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), que permite la separación de los ácidos nucleicos de los polisacáridos. Una vez precipitados los polisacáridos, la solución se puede centrifugar y el sobrenadante se recoge. En una realización particular la etapa (iii) del procedimiento de aislamiento de la invención se realiza con bromuro de hexadeciltrimetilamonio a una concentración de 1% a 20%. En una realización particular la etapa (iii) del procedimiento de aislamiento de la invención se realiza con bromuro de hexadeciltrimetilamonio a una concentración preferiblemente del 10% y/o clorato de sodio a una concentración de 0,1M a 1,5M. En otra realización particular la etapa (iii) del procedimiento de aislamiento de la invención se realiza durante 5 min a 15 min, preferiblemente 10 min, a una temperatura de 55°C a 75°C, preferiblemente 65°C.

La próxima etapa del procedimiento de aislamiento, etapa (iv), es la remoción de las proteínas que aún se mantienen en la solución. Típicamente esta etapa se realiza con la precipitación de las proteínas en una mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico seguida de centrifugación y recogida del sobrenadante. En una realización particular la etapa (iv) del procedimiento de aislamiento de la invención se realiza con una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. En otra realización particular dicha mezcla contiene un ratio de 25:24:1. En otra realización particular de la etapa (iv) del procedimiento de aislamiento de la invención, la recogida del sobrenadante se realiza por centrifugación.

Finalmente, la última etapa del procedimiento de aislamiento, etapa (v) de la invención, es la purificación del material genético en la solución obtenida en la etapa anterior. Tal como se ha descrito anteriormente, esta etapa se puede realizar por precipitación de los ácidos nucleicos usando para tal fin un alcohol, tal como isopropanol, seguida de la centrifugación para recoger el precipitado. En una realización particular, la etapa (v) del procedimiento de aislamiento de la invención se realiza con isopropanol. En otra realización particular de la etapa (v) del procedimiento de aislamiento de la invención, la recogida del precipitado se realiza por centrifugación.

El procedimiento de aislamiento de la invención permite la obtención de muestras concentradas de escuticociliados o sus ácidos nucleicos, de modo que dicha muestra se pueda usar en el procedimiento de la invención. El procedimiento de aislamiento de la invención se ejemplifica en su totalidad en la sección de Ejemplos de la presente descripción.

Primera etapa del procedimiento de detección de la invención

La primera etapa del procedimiento de detección de la invención es “someter los ácidos nucleicos obtenidos de dicha muestra a una reacción de amplificación de una región diana del genoma del escuticociliado que tiene al menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 1 o de un fragmento de la misma en presencia de un cebador directo y un cebador reverso específicos para dicha región capaces de amplificar dicha región o fragmento”. En la presente invención, se entiende por “ácido nucleico” a la repetición de monómeros llamados nucleótidos, unidos mediante enlaces fosfodiéster. Existen dos tipos de ácidos nucleicos: ADN (ácido desoxirribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico). En la presente invención se entiende por “ADN” al material genético de los organismos vivos que controla la herencia y se localiza en el núcleo o en las mitocondrias de las células. En la presente invención se entiende por “ARN” a la molécula resultado de la transcripción de una secuencia de ADN. El

ácido nucleico de la invención puede contener una o más modificaciones en las nucleobases, en los azúcares y/o en los enlaces entre nucleótidos.

Tras obtener una muestra o los ácidos nucleicos contenidos en dicha muestra, dicha muestra o sus ácidos nucleicos son sometidos a una reacción de amplificación de una
5 región diana del genoma del escuticociliado. Como entiende el experto en la materia, una “reacción de amplificación” consiste, básicamente, en la multiplicación exponencial de una molécula de ADN diana (o de una región diana de una molécula de ADN) mediante el empleo de oligonucleótidos que hibridan con los extremos de la región diana que se quiere amplificar.

10 Las diferentes técnicas o procedimientos de llevar a cabo reacciones de amplificación están ampliamente descritas en el estado de la técnica, por ejemplo, en Sambrook et al., 2001. (Molecular Cloning A Laboratory Manual. 3rd Edition, Vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York). Ejemplos de reacciones de amplificación son, sin limitarse a, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y variaciones de la misma [amplificación regional de la
15 reacción en cadena de la polimerasa (RA-PCR, del inglés Regional Amplification PCR), la reacción en cadena de la polimerasa a Tiempo Real (RT-PCR del inglés Real Time PCR, etc.]. En un modo de realización particular del procedimiento de la invención, la reacción de amplificación se lleva a cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El protocolo seguido para llevar a cabo una PCR es ampliamente conocido en el estado de la
20 técnica y actualmente existen kits comerciales que contienen los materiales necesarios para llevar a cabo dicha amplificación. Asimismo, las condiciones de temperatura, tiempo, concentraciones de reactivos y número de ciclos de la PCR dependerán de la ADN polimerasa utilizada en la reacción de amplificación, de la especificidad de los cebadores, etc. Así, en un modo de realización particular del procedimiento de la invención, la reacción
25 de amplificación se lleva a cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a Tiempo Real. Una reacción de PCR a Tiempo Real es, básicamente, una PCR convencional en la que los equipos de amplificación (llamados termocicladores) llevan incorporados un sistema de detección de fluorescencia, basándose dicha detección en la utilización de unas moléculas específicas. En otra realización la reacción de amplificación se lleva a cabo
30 mediante una PCR convencional. En otra realización particular la reacción de amplificación se lleva a cabo mediante una PCR digital.

Para llevar a cabo una reacción de amplificación son necesarios varios componentes en una solución. Así, en un modo de realización particular del procedimiento de la invención, la reacción de amplificación se realiza en presencia de tampón de reacción,

desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP), iones de magnesio y ADN polimerasa. El término “tampón de reacción” se refiere a una solución tampón que proporciona un entorno químico adecuado para la actividad de la ADN polimerasa. El pH del tampón suele estar entre 8,0 y 9,5 y a menudo se estabiliza con Tris-HCl. Un componente habitual del tampón es el ion potasio (K⁺) procedente del KCl, o el sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄, que favorece la hibridación de los cebadores. Dicho tampón de reacción es normalmente proporcionado comercialmente en conjunto con la ADN polimerasa. El término “desoxirribonucleótidos trifosfato” o su sigla “dNTP” se refiere a los nucleótidos trifosfato adenina (dATP), citosina (dCTP), timina (dTTP) y guanina (dGTP), las bases necesarias para la construcción de ADN.

El término “iones divalentes”, tal como se usa en la presente descripción, se refiere a elementos químicos, en este caso iones, que tienen una valencia de dos, es decir, pueden formar hasta dos enlaces. En una realización particular, el ion divalente es magnesio (Mg²⁺). En una realización particular los iones de magnesio se obtienen de cloruro de magnesio (MgCl₂) presente en la mezcla de reacción a una concentración de 2 a 3 mM. En otra realización particular los iones de magnesio se obtienen de cloruro de magnesio (MgCl₂) presente a una concentración de 2,5 mM en la mezcla de reacción.

El término “ADN polimerasa”, tal como se usa en la presente descripción, se refiere a enzimas (E.C.:2.7.7.7) (celulares o virales) que intervienen en el proceso de replicación del ADN y que llevan a cabo la síntesis de la nueva cadena de ADN emparejando los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) con los desoxirribonucleótidos complementarios correspondientes del ADN molde.

La reacción de amplificación se realiza en un equipamiento especializado denominado termociclador, lo cual permite realizar múltiples ciclos de un conjunto de etapas con distintas temperaturas y distintos tiempos por etapa. Así, en una realización particular del procedimiento de la invención, las condiciones de la reacción de amplificación comprenden:

- (i) Una etapa de desnaturalización inicial a una temperatura comprendida entre 90°C y 98°C durante un tiempo comprendido entre 3 min y 10 min;
- (ii) Una etapa de desnaturalización a una temperatura comprendida entre 90°C y 98°C durante un tiempo comprendido entre 15 s y 60 s;
- (iii) Una etapa de hibridación a una temperatura comprendida entre 50°C y 68°C durante un tiempo comprendido entre 15 s y 45 s;
- (iv) Una etapa de extensión a una temperatura comprendida entre 68°C y 72°C durante un tiempo comprendido entre 45 s y 90 s; y

- (v) Una etapa de extensión final a una temperatura comprendida entre 68°C y 72°C durante un tiempo comprendido entre 5 min y 15 min,

5 donde las etapas (ii), (iii) y (iv) se repiten al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 30 veces, al menos 32 veces, al menos 35 veces antes de llevar a cabo la etapa (v). En otra realización particular del procedimiento de la invención las condiciones de la reacción de amplificación comprenden:

- (i) Una etapa de desnaturalización inicial a una temperatura de 95°C durante un tiempo de 5 min;
- 10 (ii) Una etapa de desnaturalización a una temperatura de 95°C durante un tiempo de 30 s;
- (iii) Una etapa de hibridación a una temperatura de 60°C durante un tiempo de 45 s;
- (iv) Una etapa de extensión a una temperatura de 72°C durante un tiempo de 90 s; y
- (v) Una etapa de extensión final a una temperatura de 72°C durante un tiempo de 10 min,

15 donde las etapas (ii), (iii) y (iv) se repiten 35 veces antes de llevar a cabo la etapa (v).

En una realización más particular del procedimiento de la invención las condiciones de la reacción de amplificación comprenden:

- (i) Una etapa de desnaturalización inicial a una temperatura comprendida entre 90°C y 98°C durante un tiempo comprendido entre 3 min y 10 min;
- 20 (ii) Una etapa de desnaturalización a una temperatura comprendida entre 90°C y 98°C durante un tiempo comprendido entre 5 s y 15 s; y
- (iii) Una etapa de hibridación y extensión a una temperatura comprendida entre 58°C y 62°C durante un tiempo comprendido entre 30 s y 90 s;

25 donde las etapas (ii) y (iii) se repiten al menos 10 veces. En una realización particular las etapas (ii) y (iii) se repiten al menos 14 veces, al menos 16 veces, al menos 18 veces, al menos 20 veces, al menos 22 veces, al menos 24 veces, al menos 26 veces, al menos 28 veces, al menos 29 veces, al menos 30 veces, al menos 32 veces, al menos 34 veces, al menos 36 veces, al menos 38 veces, al menos 40 veces.

30 En aún otra realización particular del procedimiento de la invención las condiciones de la reacción de amplificación comprenden:

- (i) Una etapa de desnaturalización inicial a una temperatura de 95°C durante un tiempo de 5 min;
- (ii) Una etapa de desnaturalización a una temperatura de 95°C durante un tiempo de 10 s; y
- 5 (iii) Una etapa de hibridación y extensión a una temperatura de 60°C durante un tiempo de 60 s;

donde las etapas (ii) y (iii) se repiten 40 veces.

Los términos “desnaturalización”, “hibridación” y “extensión” en el contexto de la presente invención hacen referencia a: la separación de las dobles cadenas de los ácidos nucleicos presentes en la muestra en monocadenas; la hibridación de los cebadores a las monocadenas de ácidos nucleicos formadas anteriormente, de manera que dichos cebadores tienen una secuencia de ADN complementaria a la región diana de los ácidos nucleicos; y extensión de una nueva cadena de ADN por la ADN polimerasa a partir del extremo 3' del cebador, de manera que la nueva cadena es complementaria a la cadena molde donde el cebador ha hibridado.

La reacción de amplificación permite amplificar una región diana en el genoma de los escuticociliados. El término “región diana”, en el contexto de la presente invención, se refiere a una zona específica del genoma de los escuticociliados que permite la identificación única de *Philasterides dicentrarchi* y *Miamiensis avidus*. Esta región forma parte del espaciador transcrito interno 2 y tiene al menos un 80% de identidad con la SEQ ID NO: 1. El término “ITS” del inglés “internal transcribed spacer” o “espaciador transcrito interno”, tal como se usa en la presente descripción, se refiere a un fragmento del genoma llamado ADN espaciador, situado entre el ADN ribosómico (ADNr) para la subunidad pequeña y el de la subunidad grande. También se lo puede definir como la región ya transcrita en ARN, o precursor policistrónico que le corresponde al ADN espaciador luego de la transcripción. En bacterias y arqueas, existe un único ITS, ubicado entre los genes de ARNr 16S y 23S. Por el contrario, hay dos ITS en eucariotas: el ITS1, que se encuentra entre los genes de ARNr 18S y 5.8S; mientras que el ITS2 está entre los genes de ARNr 5.8S y 28S (en opistocontes o 25S en plantas). ITS1 corresponde al ITS en bacterias y arqueas, mientras que ITS2 se originó como una inserción que interrumpió el gen ancestral ARNr 23S.

En una realización particular del procedimiento de la invención la región diana comprende o tiene al menos un 81%, al menos un 82%, al menos un 83%, al menos un 84%, al menos un 85%, al menos un 86%, al menos un 87%, al menos un 88%, al menos un 89%, al menos un

90%, al menos un 91%, al menos un 92%, al menos un 93%, al menos un 94%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99%, al menos un 100% de identidad con la SEQ ID NO: 1. En otra realización particular del procedimiento de la invención la región diana consiste en la secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

5 SEQ ID NO: 1

TCCCGCTAAACTCGAAAAGCGCTGAATCGTTTCAGTGCCGACCGAAGTAGTCACTTCTTCACAGAAAGTGATCTC
GGCT

El término "identidad", tal como se usa en la presente descripción, se refiere al grado de coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos alineadas de forma que se maximice el número de nucleótidos idénticos. Específicamente, la identidad está representada por el porcentaje (%) del número de nucleótidos idénticos en relación con el número total de nucleótidos. El porcentaje de identidad puede determinarse con el uso de algoritmos conocidos, como BLAST, FASTA o CLUSTAL. Cuando las dos secuencias son de tamaños distintos, el porcentaje de identidad se puede calcular en relación a la secuencia más pequeña (la cual tendrá un porcentaje de identidad mayor) o en relación a la secuencia mayor (la cual tendrá un porcentaje de identidad más pequeña). En la presente invención, la identidad se calcula para la totalidad de nucleótidos de cualquiera de las secuencias aquí descritas, es decir, se calcula a lo largo de toda la secuencia aquí descrita, independientemente del tamaño de la otra secuencia que está siendo comparada.

La región diana permite la identificación de escuticociliados debido a su especificidad para dichos organismos. En una realización particular del procedimiento de la invención los escuticociliados son seleccionados de un grupo que consiste en *Philasterides dicentrarchi*, *Miamiensis avidus* y combinaciones de los mismos. En el contexto de la presente invención, el término "*Philasterides dicentrarchi*", así como el término "*P. dicentrarchi*", utilizados de forma intercambiable, se refiere a una especie de protozoo ciliado de la subclase *Scuticociliatia* que parasita peces, produciendo una enfermedad fatal para el rodaballo y la lubina de piscifactoría. Los peces infectados muestran úlceras hemorrágicas en la piel (especialmente alrededor del opérculo), abundante líquido ascítico en la cavidad abdominal, exoftalmia uni o bilateral, e infección sistémica con presencia de ciliados en la sangre, las branquias, el tracto gastrointestinal, el hígado, el bazo, los riñones y la musculatura. En la fase final de la infección, los ciliados llegan al cerebro y provocan el reblandecimiento y la licuefacción del tejido. El término *Miamiensis avidus*, en la presente invención, así como el término *M. avidus*, utilizados de forma intercambiable, se refiere a una especie de protozoo

ciliado de la subclase *Scuticociliatia* que vive como parásitos de diversos tipos de peces teleósteos, tales como el rodaballo y la lubina, así como otros grupos de organismos marinos tales como los caballitos de mar, los tiburones y los crustáceos. La progresión de la enfermedad provocada por *M. avidus* es en toda idéntica a la descrita para la enfermedad causada por *P. dicentrarchi*.

La región diana del genoma del escuticociliado es la región que contiene un 80% de identidad con SEQ ID NO: 1. El procedimiento de la invención puede llevarse a cabo amplificando la totalidad de dicha región o bien un fragmento de dicha región. El término “fragmento”, tal como se usa en la presente descripción, hace referencia a cualquier porción de la SEQ ID NO: 1 que tenga una secuencia de menos de 77 nucleótidos y de más de 20 nucleótidos.

La reacción de amplificación de la región diana del escuticociliado se realiza con “un cebador directo y un cebador reverso específicos para dicha región capaces de amplificar dicha región o fragmento”.

El término “cebador”, tal como se usa en la presente descripción, se refiere a un oligonucleótido que es capaz de actuar como punto de iniciación para la síntesis de 5' a 3' de un producto de extensión del cebador que es complementario a una cadena de ácido nucleico. El producto de extensión del cebador se sintetiza en presencia de nucleótidos apropiados y de un agente de polimerización, como una ADN polimerasa, en un tampón apropiado y a una temperatura adecuada. Los cebadores pueden comprender sólo residuos de nucleótidos naturales o al menos uno o más análogos de nucleótidos, por ejemplo, análogos modificados químicamente, PNAs, etc.

Las modificaciones de uno o más residuos del esqueleto de los ácidos nucleicos pueden comprender una o más de las siguientes: modificaciones del azúcar en 2' tal como 2'-O-metil (2'-OMe), 2'-O-metoxietil (2'-MOE), 2'-O-metoxietoxi, 2'-fluoro (2'-F), 2'-alil, 2'-O-[2-(metilamino)-2-oxoetil], 2'-O-(N-metilcarbamato); modificaciones del azúcar en 4' incluyendo 4'-tio, puente 4'-CH₂-O-2', puente 4-(CH₂)₂-O-2'; ácido nucleico cerrado (LNA, locked nucleic acid); ácido péptido nucleico (APN); ácido nucleico intercalante (INA); ácido nucleico intercalante enrollado (TINA); ácidos nucleicos de hexitol (HNA); ácido arabinonucleico (ANA); ácidos ciclohexano nucleicos (CNA); ácido ciclohexenilnucleico (CeNA); ácido treosil nucleico (TNA); oligonucleótidos morfolinos; Gap-meros; Mix-meros; incorporación de péptidos ricos en arginina; adición de 5'-fosfato a ARN sintéticos; o cualquier combinación de los mismos.

Las modificaciones de uno o más enlaces de nucleósidos de los ácidos nucleicos pueden comprender una o más de las siguientes: fosforotioato, fosforamidoato, fosforodiamidoato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato y fosforanilidato, o cualquier combinación de los mismos.

- 5 Dos tipos de cebadores son normalmente utilizados, “directo” y “reverso” para amplificar una región de ADN de doble cadena. El cebador directo es complementario a la cadena antisentido y el cebador reverso es complementario con la cadena sentido. Los extremos 5' de ambos cebadores se unen a los extremos 3' de cada cadena de ADN. Los cebadores son, en la mayoría de los casos, oligonucleótidos cortos. En una realización preferida de la
- 10 etapa a) del procedimiento de la invención los cebadores tienen entre, preferiblemente consisten en, 18 a 30 nucleótidos. En otra realización particular del procedimiento de la invención los cebadores tienen entre, preferiblemente consisten en, 20 a 26 nucleótidos, más preferiblemente 20 nucleótidos, 21 nucleótidos, 22 nucleótidos, 23 nucleótidos, 24 nucleótidos o 25 nucleótidos. En otra realización particular de la etapa a) del procedimiento
- 15 de la invención el cebador directo consiste en la secuencia SEQ ID NO: 2.

En una realización más particular del procedimiento de la invención el cebador comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos un 80% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 2. En otra realización particular de la etapa a) del procedimiento de la invención el cebador directo consiste en la secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 2.

- 20 En una realización particular del procedimiento de la invención el cebador comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos un 80% identidad con la secuencia SEQ ID NO: 3. En otra realización particular de la etapa a) del procedimiento de la invención el cebador reverso consiste en la secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 3.

SEQ ID NO: 2

- 25 TCCCGCTAAACTCGAAAAGC

SEQ ID NO: 3

AGCCGAGATCACTTTCTGTG

- La expresión “específicos para dicha región capaces de amplificar dicha región o
- 30 fragmento”, tal como se usa en la presente descripción, se refiere a que uno de los cebadores utilizados comprende una secuencia que es idéntica a un fragmento de la SEQ ID NO: 1 y otro de los cebadores comprende una secuencia que es idéntica a un fragmento reverso y complementario a la SEQ ID NO: 1, y que los dos cebadores juntos, en una

reacción de amplificación, se unen a las cadenas de SEQ ID NO: 1 y así permiten la amplificación de SEQ ID NO: 1 o de un fragmento de la misma.

La reacción de amplificación puede, además, comprender componentes necesarios para la detección o cuantificación de los productos de amplificación o amplicones. Así, en una realización particular de la etapa a) del procedimiento de la invención, la reacción de amplificación se realiza en presencia de una sonda de oligonucleótidos o en presencia de un marcador fluorescente, en donde la sonda de oligonucleótidos comprende una secuencia complementaria a un fragmento de la región diana. En una realización particular la sonda hibrida con una secuencia situada en la región de la SEQ ID NO: 1 comprendida entre los nucleótidos 22 y 57 de la SEQ ID NO: 1.

El término "sonda", de acuerdo con la presente descripción, se refiere a una molécula utilizada en una reacción de amplificación, típicamente para el análisis cuantitativo o qPCR, así como para el análisis de punto final. Dichas sondas pueden utilizarse para monitorizar la amplificación de la región diana y puede ser adecuada para monitorizar la cantidad de amplicones producidos en función del tiempo. En una realización particular de la etapa a) del procedimiento de la invención, la sonda de oligonucleótidos consiste o tiene entre 18 a 30 nucleótidos, preferiblemente entre 20 a 26 nucleótidos, más preferiblemente 20 nucleótidos, 21 nucleótidos, 22 nucleótidos, 23 nucleótidos, 24 nucleótidos o 25 nucleótidos. En otra realización particular de la etapa a) del procedimiento de la invención, la sonda de oligonucleótidos consiste o comprende una secuencia que tiene al menos un 80%, al menos un 81%, al menos un 82%, al menos un 83%, al menos un 84%, al menos un 85%, al menos un 86%, al menos un 87%, al menos un 88%, al menos un 89%, al menos un 90%, al menos un 91%, al menos un 92%, al menos un 93%, al menos un 94%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99%, o un 100% de identidad con la SEQ ID NO: 4. En aún otra realización particular de la etapa a) del procedimiento de la invención, la secuencia de la sonda de oligonucleótidos consiste en la SEQ ID NO: 4.

SEQ ID NO: 4

AATCGTTCAGTGCCGACCGAAGT

Dichas sondas oligonucleotídicas pueden estar modificadas de modo que la aparición de productos de la reacción de amplificación sea detectada por la aparición de fluorescencia. El fundamento de esta técnica se basa en el empleo de la transferencia de energía de resonancia de Förster, que es un mecanismo de transferencia de energía entre fluorocromos, en donde la presencia de un aceptor de energía cerca de un donador de

energía, bloquea la emisión de fluorescencia del donador de energía. Varios tipos de sondas se pueden utilizar, tales como, sin limitación, sondas tipo *TaqMan* y tipo *Molecular Beacons*. Las sondas tipo *TaqMan* se refieren a sondas que poseen un fluoróforo en un extremo y una molécula en el otro extremo que bloquea su emisión de fluorescencia (denominada en inglés “*quencher*”). Este tipo de sonda hibrida específicamente en la parte central del producto de PCR a obtener. De este modo, cuando se efectúa la reacción de amplificación, la sonda hibrida en la región diana pero, debido a la cercanía del fluoróforo al *quencher*, no se emite fluorescencia. Cuando la polimerasa se encuentra con la sonda, la hidroliza mediante su actividad exonucleasa 5'-3', lo cual provoca la separación del *quencher* del fluoróforo y, por tanto, la emisión de fluorescencia, que está directamente relacionada con la cantidad de amplicón producido. En una realización particular de la etapa a) del procedimiento de la invención la sonda de oligonucleótidos comprende un fluoróforo donador en el extremo 5' o el extremo 3' y un fluoróforo aceptor en el extremo opuesto al donador. En otra realización particular el fluoróforo donador se selecciona de un grupo que consiste en:

- 15 - Ácido 3',6'-dihidroxi-1-oxoespiro[2-benzofurano-3,9'-xanteno]-5-carboxílico (6-FAM);
- Cianina 3, 5: cloruro de (2Z)-2-[(3,6-dimetil-2-fenilpirimidin-3-ilo-4-il)metilideno]-1-etilquinolina (Cy3 o Cy5);
- 2,2-dimetilpropanoato de [2',4,4',5',7,7'-hexacloro-6-[6-[2-cianoetoxi-[di(propano-2-il)amino]fosfanil]oxihexilcarbamoil]-6'-(2,2-dimetilpropanoiloxi)-3-oxoespiro[2-
- 20 benzofuran-1,9'-xanteno]-3'-ilo] (HEX);
- 3R,4S,5S,6R,7R,9R,11S,12R,13S,14R)-6-[(2S,3R,4S,6R)-4-(dimetilamino)-3-hidroxi-6-metiloxano-2-il]oxi-14-etil-7,12,13-trihidroxi-4-[(2R,4R,5S,6S)-5-hidroxi-4-metoxi-4,6-dimetiloxan-2-il]oxi-10-(2-metoxietoximetoxiamino)-3,5,7,9,11,13-hexametil-oxacicotetradecano-2-ona (ROX);
- 25 - 5-clorosulfonil-2-(3-oxa-23-aza-9-azoniaheptaciclo[17.7.1.1^{5,9}.0^{2,17}.0^{4,15}.0^{23,27}.0^{13,28}]octacosa-1(27),2(17),4,9(28),13,15,18-heptaen-16-il)benzenosulfonato (Texas Red);
- 2-(7-etil-3,3,8,8,10-pentametil-7-aza-21-azoniahexaciclo[15.7.1.0^{2,15}.0^{4,13}.0^{6,11}.0^{21,25}]pentacosa-1,4(13),5,11,14,16,18,21(25)-octaen-14-il)-N-metil-N-(4-oxopentil)benzamida (ATTO[®] 647N);
- 30 - 4',5'-dicloro-3',6'-dihidroxi-2',7'-dimetoxi-1-oxoespiro[2-benzofuran-3,9'-xanteno]-5-carboxilato de (2,5-dioxopirrolidin-1-ilo) (6-JOE);
- (2S,4R)-N-[(1S)-2-metil-1-[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-metilsulfaniloxan-2-il]propil]-4-propilpiperidin-2-carboxamida (VIC); y
- 35 - 4,5,6,7-tetracloro-3',6'-dihidroxi-espiro[2-benzofuran-3,9'-xanteno]-1-ona (TET).

En una realización más particular el fluoróforo aceptor se selecciona de un grupo que consiste en:

- 2,5-Bis(2-metil-2-propanil)-1,4-bencenodiol (BHQ1, BHQ2);
- *N*-[2-[[*(E)*-3-[1-[(2*R*,4*S*,5*R*)-5-[[bis(4-metoxifenil)-fenilmetoxi]metil]-4-[2-cianoetoxi-
5 [di(propano-2-il)amino]fosfanil]oxioxolan-2-il)-2,4-dioxopirimidin-5-il]prop-2-
enoil]amino]etil]-6-[[7-[[2,5-dimetoxi-4-[(4-nitrofenil)diazenil]fenil]diazenil]-1-
azatriciclo[7.3.1.0^{5,13}]trideca-5(13),6,8-trien-6-il]oxi]hexanamida (BBQ650);
- 2-[3-(dimetilamino)-6-dimetilazanioidenexanten-9-il]benzoato (TAMRA);
- Ácido (2*S*)-2-[4-(3,4-dimetilfenil)-2-metilquinolin-3-il]-2-[(2-metilpropan-2-il)oxi]acético
10 (TQ2); y
- 5-fenilsulfanilquinazolin-2,4-diamina (TQ3).

Las sondas tipo *Molecular Beacons* son también oligonucleótidos de cadena simple que, por su estructura, poseen una zona de apareamiento de bases interna y que, por tanto, forman
15 una horquilla. En presencia de la región diana la sonda se abre y se une preferentemente a aquella, lo que produce la emisión de fluorescencia. Estructuralmente, poseen la zona complementaria a la región diana en el giro de la horquilla, la de complementariedad interna en el cuello y los fluoróforos donador y aceptor en sus extremos. Cuando la sonda está cerrada en horquilla, el aceptor impide la emisión de fluorescencia por parte del donador,
20 cosa que no sucede al unirse al amplicón.

El término “marcador fluorescente”, tal como se usa en la presente descripción, se refiere a un agente intercalante de la doble cadena o un fluoróforo que emite fluorescencia cuando se une a esta. Agentes adecuados para este propósito incluyen SYTO 15, SYTO 25, SYTO 13, SYTO 9, SYBR Green I, SYTO 16, SYTO 17, SYTO 21, SYTO 59, SYTOX, SYTO BC, DAPI,
25 Hoechst 33342, Hoechst 33258, PicoGreen, y cualquier combinación de los mismos. En una realización particular de la etapa a) del procedimiento de la invención, la reacción de amplificación comprende además un agente intercalante que se selecciona de un grupo que consiste en: SYTO 15, SYTO 25, SYTO 13, SYTO 9, [N',N'-dimetil-N-[4-[(*E*)-(3-metil-1,3-benzotiazol-2-ilideno)metil]-1-fenilquinolin-1-ilo-2-il]-N-propilpropano-1,3-diamina (SYBR
30 Green I), SYTO 16, SYTO 17, SYTO 21, SYTO 59, SYTOX, SYTO BC, 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), Hoechst 33342, Hoechst 33258, PicoGreen, y cualquier combinación de los mismos. En un modo de realización todavía más particular, el agente intercalante es N',N'-dimetil-N-[4-[(*E*)-(3-metil-1,3-benzotiazol-2-ilideno)metil]-1-fenilquinolin-1-ilo-2-il]-N-propilpropano-1,3-diamina, con número CAS 163795-75-3.

Segunda etapa del procedimiento de detección de la invención

Una vez realizada la reacción de amplificación es necesario detectar el producto de dicha amplificación. Técnicas para detectar los productos de amplificación están ampliamente descritas en el estado de la técnica, como por ejemplo, en Sambrook et al., 2001 (Molecular Cloning A Laboratory Manual. 3rd Edition, Vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York). En una realización particular de la etapa b) del procedimiento de la invención, la detección del producto de amplificación se lleva a cabo por electroforesis en gel y/o secuenciación de ADN. La “electroforesis en gel”, particularmente electroforesis en gel de agarosa, es una técnica que permite separar las moléculas de ADN en función de su tamaño o forma. La electroforesis en gel es una técnica ampliamente conocida por el experto en el arte y su realización parte del conocimiento rutinario de dicho experto. La “secuenciación de ADN”, en el contexto de la presente invención, se refiere a un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos en una secuencia de ADN. Existen varios métodos de secuenciación de ADN, siendo el más conocido el método de Sanger (Sanger F, *et al.*, 1977, Proc Natl Acad Sci U S A. Dec;74(12):5463-7).

La detección de un producto de amplificación en la etapa b) del procedimiento de la invención es indicativo de la presencia de escuticociliados en la muestra original. Además de permitir la detección de una región diana en el genoma de escuticociliados, el procedimiento de la invención también posibilita la cuantificación de los escuticociliados en la muestra. Así, en una realización particular, el procedimiento de la invención comprende, además, una etapa para cuantificar la concentración de escuticociliados en la muestra. El término “cuantificar”, en el contexto de la presente invención, hace referencia a la determinación del número, concentración, densidad, o cualquier otro parámetro cuantificable obtenido directamente o indirectamente de la reacción de amplificación de la etapa a) del procedimiento de la invención.

Para determinar el número de escuticociliados presentes en la muestra a través de la reacción de amplificación, es posible generar una curva estándar para poder relacionar la cantidad de producto de reacción obtenido en la etapa a) del procedimiento con la cantidad de ácidos nucleicos de escuticociliados y/o de células de escuticociliados originalmente presentes en la muestra. Así, en una realización particular del procedimiento de la invención, la cuantificación de escuticociliados en la muestra se hace a través de una curva estándar. El término “curva estándar” o curva de calibración, tal como se usa en la presente invención, se refiere a un tipo de gráfico que se utiliza como técnica de investigación cuantitativa. Se

miden y grafican varias muestras con propiedades conocidas, lo que luego permite determinar las mismas propiedades para muestras desconocidas mediante interpolación en el gráfico. Las muestras con propiedades conocidas son los estándares y el gráfico es la curva estándar. La concentración de lo desconocido se puede calcular a partir de la masa en el ensayo. En la presente invención, las muestras conocidas son diluciones seriadas de concentraciones de ADN obtenidas a partir de ciliados en un rango de 1 a 60 ciliados por microlitro. Estas muestras permiten determinar, por ejemplo, el valor Cq del PCR a tiempo real, es decir, el ciclo de la reacción de amplificación a partir del cual el aumento de fluorescencia está suficientemente por encima del ruido para ser detectable. Un ejemplo de cómo determinar la curva estándar se ejemplifica en la sección de ejemplos de la presente descripción.

Oligonucleótidos de la invención

Otro aspecto de la presente invención se relaciona con un oligonucleótido seleccionado de un grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, de ahora en adelante el oligonucleótido de la invención.

Todas las definiciones y realizaciones particulares descritas para otros aspectos de la presente invención son igualmente válidas para el presente aspecto. En una realización particular del oligonucleótido de la invención el oligonucleótido de acuerdo con la SEQ ID NO: 4 comprende un fluoróforo donador en el extremo 5' o el extremo 3' y un fluoróforo aceptor en el extremo opuesto al donador. En otra realización particular el fluoróforo donador se selecciona de un grupo que consiste en: 6-FAM, Cy5, Cy3, HEX, ROX, Texas Red, ATTO®647N, 6-JOE, VIC y TET. En otra realización particular el fluoróforo aceptor se selecciona de un grupo que consiste en: BHQ, BBQ, TAMRA, TQ2 y TQ3. En una realización aún más particular, BHQ se selecciona de BHQ1 y BHQ2. En otra realización más particular BBQ es BBQ650.

Dicho oligonucleótido se puede obtener por prácticas de experimentación rutinarias tales como síntesis de oligonucleótidos (Verma y Eckstein, 1998, Annual Review of Biochemistry Vol. 67:99-134).

En una realización particular el oligonucleótido está aislado. El término "aislado", tal y como se utiliza en la presente descripción, pretende indicar que el componente concreto de interés, es decir, el oligonucleótido, está separado o aislado de los demás componentes hasta tal punto que no hay contaminación detectable por esos otros componentes, según se mide utilizando procedimientos de prueba de pureza estándar.

Kit de la invención

Otro aspecto de la presente invención se relaciona con un kit que comprende una pareja de cebadores de secuencias SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, de ahora en adelante el kit de la invención.

- 5 Todas las definiciones y realizaciones particulares descritas para otros aspectos de la presente invención son igualmente válidas para el presente aspecto.

En el contexto de la presente invención, el término “kit” se entiende como un producto o dispositivo que contiene los diferentes reactivos necesarios para llevar a cabo los procedimientos de la invención embalados para permitir su transporte y almacenamiento.

- 10 Los materiales adecuados para embalar los componentes del kit incluyen cristal, plástico (polietileno, polipropileno, policarbonato y similares), botellas, viales, papel, sobres y similares. Además, los kits de la invención pueden contener instrucciones para el uso simultáneo, secuencial o separado de los diferentes componentes que están en el kit. Dichas instrucciones pueden estar en forma de material impreso o en forma de un soporte
- 15 electrónico capaz de almacenar instrucciones de modo que puedan ser leídas por un sujeto, tal como medios de almacenamiento electrónico (discos magnéticos, cintas y similares), medios ópticos (CD-ROM, DVD) y similares. Adicional o alternativamente, los medios pueden contener direcciones de Internet que proporcionan dichas instrucciones. Los reactivos para uso en los procedimientos de la invención se pueden formular como un “kit
- 20 ” y, por tanto, se pueden combinar con uno o más de otros tipos de elementos o componentes (por ejemplo, otros tipos de reactivos bioquímicos, envases, paquetes tal como embalaje pretendido para venta comercial, sustratos a los que están unidos los reactivos, componentes de hardware electrónicos, etc.).

- En una realización particular, el kit de la invención, además, comprende la sonda de
- 25 oligonucleótidos de secuencia SEQ ID NO: 4. En una realización particular del kit de la invención la sonda de oligonucleótidos de secuencia SEQ ID NO: 4 comprende un fluoróforo donador en el extremo 5' o el extremo 3' y un fluoróforo aceptor en el extremo opuesto al donador.

- En una realización particular del kit de la invención, el fluoróforo donador se selecciona de
- 30 un grupo que consiste en: 6-FAM, Cy5, Cy3, HEX, ROX, Texas Red, ATTO®647N, 6-JOE, VIC y TET. En otra realización particular del kit de la invención el fluoróforo aceptor se selecciona de un grupo que consiste en: BHQ, BBQ, TAMRA, TQ2 y TQ3. En otra

realización más particular BHQ se selecciona de BHQ1 y BHQ2. En otra realización más particular BBQ es BBQ650. En aún otra realización particular el kit de la invención, además, comprende un marcador fluorescente que se selecciona del grupo que consiste en: SYTO 15, SYTO 25, SYTO 13, SYTO 9, N',N'-dimetil-N-[4-[(E)-(3-metil-1,3-benzotiazol-2-ilideno)metil]-1-fenilquinolin-1-ilo-2-il]-N-propilpropano-1,3-diamina (SYBR Green I), SYTO 16, SYTO 17, SYTO 21, SYTO 59, SYTOX, SYTO BC, 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), PicoGreen y cualquier combinación de los mismos.

En una realización particular, el kit de la invención, además, comprende uno o más de los componentes seleccionados del grupo que consiste en tampón de reacción, desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP), cloruro de magnesio y ADN polimerasa.

Usos de la invención

Otro aspecto de la presente invención es el uso del oligonucleótido de la invención o el kit de la invención para detectar escuticociliados en una muestra, de ahora en adelante el uso de la invención.

Todas las definiciones y realizaciones particulares descritas anteriormente para otros aspectos de la presente invención son igualmente válidas para el presente aspecto.

En una realización particular del uso de la invención, la detección de escuticociliados se lleva a cabo mediante el procedimiento de la invención.

La invención se describirá por medio de los siguientes ejemplos que deben considerarse meramente ilustrativos y no limitativos del alcance de la invención.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de las muestras control de ciliados para la evaluación de los ensayos de PCR y PCR en tiempo real (qPCR)

Las muestras control de ciliados para la evaluación de los ensayos qPCR proceden de cultivos axénicos del aislado I1 de *P. dicentrarchi* (Iglesias y cols., 2001, Dis Aquat Organ. 46:47-55). Los ciliados se obtuvieron en condiciones asépticas a partir de líquido peritoneal de rodaballos, *Scophthalmus maximus*, infectados experimentalmente como se ha descrito previamente (Paramá y cols., 2003, Aquaculture 217:73–80). Una vez aislados los ciliados,

se cultivaron axénicamente a 21°C en medio L-15 de Leibovitz estéril, como se ha descrito previamente (Iglesias y cols., 2003, Vet Parasitol. 111:19-30). Los aislados C1, D2, D3 y S1 de *P. dicentrarchi* fueron obtenidos a partir de líquido ascítico procedente de rodaballos infectados naturalmente en diversas piscifactorías de Galicia y cultivados en las mismas condiciones que el aislado I1 (Budiño y cols., 2011, Vet Parasitol. 175:260-272). Los ciliados de la especie *M. avidis* cepa Ma/2 fueron adquiridos en American Type Culture Collection (ATCC, USA) y fueron cultivados en ATCC Medium 1651 (ATCC®50180™) a 25°C. Los ciliados ambientales *Uronema marinum*, *Protocruzia adherens* y *Euplotes minuta* se obtuvieron a partir de muestras de agua procedentes de tanques de cultivo de rodaballo mediante filtración diferencial (ver apartado de procesado de las muestras de agua). Para el aislamiento individual de los ciliados se utilizó la técnica de dilución límite que se llevó a cabo en placas de microtitulación de 96 pocillos. La mezcla concentrada de ciliados presentes en el agua se incluyó en 100 µL de agua de mar estéril conteniendo un 0,1% de medio 1651. A continuación, se procedió a realizar múltiples diluciones 1/2 y aquellos pocillos que contenían un único ciliado, se incubaron durante 72 h. Finalmente, los ciliados aislados se identificaron mediante amplificación del gen que codifica la subunidad 18S del ARNr y comparación de las secuencias obtenidas mediante la herramienta bionfórmica BLAST (Blastn, Centro Nacional de Información Biotecnológica -NCBI-, USA).

Preparación de las muestras y extracción del ADN

Para la recogida y transporte de las muestras de agua se utilizaron bidones de 10 L de polipropileno autoclavables. Se recogieron 10 L de agua de los diferentes puntos críticos del sistema de cultivo de cría y engorde de rodaballo de una piscifactoría gallega mediante el sifonado del fondo y/o paredes de los tanques donde existía una abundante presencia de materia orgánica y/o biofilm bacteriano. Una vez recogidas las muestras, se enviaron inmediatamente al Laboratorio para su análisis.

Procesado de las muestras en el Laboratorio

- Inmediatamente antes del procesado de las muestras, se agitaron bien los bidones que contenían el agua de mar.
- Se recogieron en una jarra, 2 L de las muestras de agua de mar y se sometieron a un filtrado diferencial a través de filtros de 150, 75, 10 y 0,8 µm.
- Se recogieron los filtros de 10 y 0,8 µm (Cytiva, Whatman™, Alemania), se recortaron en pequeños trozos y se introdujeron en tubos eppendorf de 2 mL

que contenían 100 µL de bolas de circonita de 150 µm de diámetro y 700 µL de tampón TE.

- 5
- Se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente para rehidratar los filtros y, a continuación, se agitaron durante 1 min y en pulsos de 20 seg. a 30000 rpm en un molino de bolas (Retsch MM400, Alemania). Se dejó sedimentar la muestra durante 5 min a 4°C, se recogió el sobrenadante y transfirió a tubos eppendorf de 1,5 mL.

Obtención del ADN genómico

- 10
- Se recogieron 537 µL de sobrenadante y se transfirieron a un tubo eppendorf de 1,5 mL. Se añadieron 30 µL de SDS al 10% y 3 µL de proteinasa K (20 mg/mL en agua). Se mezcló mediante agitación y se incubó durante 1 h a 37°C.
- 15
- Se añadieron 100 µL de NaCl 5M y se agitó. Se añadieron 80 µL de una solución de detergente cetil-trimetilamonio (CTAB) al 10% / NaCl 0,7 M y se incubó durante 10 min a 65 °C.
- Se añadió el mismo volumen (750 µL) de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se mezcló y centrifugó a 10000 x g durante 5 min. Se transfirieron 750 µL del sobrenadante a 2 nuevos tubos eppendorf de 1,5 mL.
- 20
- Se añadió a cada tubo 750 µL de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló por agitación y se centrifugó a 10000 x g durante 5 min. Se transfirieron los sobrenadantes a nuevos tubos eppendorf de 1,5 mL.
- Se añadieron a cada tubo 0,6 volúmenes de isopropanol y se mezcló suavemente. Se centrifugó a 10000 xg durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante y se añadió al precipitado sin resuspender, 1 mL de etanol al
- 25
- Se añadió al precipitado sin resuspender, 1 mL de etanol al 70%.
- Se centrifugó a 10000 xg, se eliminó el sobrenadante y se secó el precipitado brevemente en Speed-Vac. Se rehidrató el precipitado seco en 100 µL de tampón TE.
- 30
- Se cuantificó la concentración y pureza del ADN en un espectrofotómetro (Nanodrop, Thermo Scientific, USA), ajustando la muestra a 50 ng/µL.

Método de PCR convencional y qPCR

Los cebadores y la sonda fueron diseñados en base a la secuencia correspondiente al ADNr formada por la subunidad 18S, el espaciador transcrito interno 1 (ITS-1), la subunidad 5S, el espaciador transcrito interno 2 (ITS-2) y la subunidad 23 S depositada en la base de datos GenBank (NCBI, USA) con el número de acceso MK002746. Los cebadores se denominaron fITS2 (5'-TCC CGC TAA ACT CGA AAA GC -3') (SEQ ID NO: 2) y rITS2 (5'-AGC CGA GAT CAC TTT CTG TG-3') (SEQ ID NO: 3) y la sonda pITS2 (FAM-5'-AAT CGT TCA GTG CCG ACC GAA GT-3'-BBQ650) (SEQ ID NO: 4).

PCR estándar

Se preparó una mezcla de reacción de 25 μ L conteniendo 19,6 μ L de agua MilliQ estéril, 2,5 μ L de tampón de reacción 10X, 0,5 μ L de una solución de 25 mM de $MgCl_2$, 0,5 μ L de dNTPs 0,2 mM, 0,5 de una mezcla de los fITS2 /rITS2 20 μ M, 0,5 μ L, 0,4 μ L de una Taq DNA polimerasa de alta afinidad (NZY Proof DNA polymerase, Nzytech, Portugal) a 2,5 U/ μ L y 1 μ L de ADN molde a 50 ng/ μ L. La reacción de PCR fue realizada bajo las siguientes condiciones de programación en un termociclador T100 Thermal Cycler (BioRad, USA): 95°C durante 5 min, 35 ciclos de 95 °C 30 segundos, 60 °C 45 segundos y 72 °C durante 90 seg. y finalmente una tercera etapa de 72°C durante 10 min. Tras la realización de la PCR, los amplicones fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% conteniendo 1x del colorante RedSafe (Intron Biotechnology, Corea). Las bandas de amplificación obtenidas fueron visualizadas mediante exposición del gel a radiación ultravioleta (312 nm) utilizando un transiluminador de intensidad de luz variable (Spectroline, USA).

qPCR

Se preparó una mezcla de 20 μ L de reacción conteniendo 10 μ L de NZYSpeedy qPCR Probe Master Mix (2x), ROX plus (Nzytech, Portugal), 0,6 μ L de una mezcla de los cebadores fITS2 /rITS2 20 μ M, 0,4 μ L de la sonda pITS2 10 μ M, 0,5 μ L de BSA (10 mg/mL), 7,5 μ L de agua MilliQ estéril y 1 μ L de una dilución de ADN molde a una concentración de 50 ng/mL (o, alternativamente, a las concentraciones que se especifiquen en cada experimento). La PCR se realizó en un equipo Step One Plus (Real-Time PCR System, Applied Biosystems -ThermoFisherScientific, USA) bajo las siguientes condiciones de programación: 95°C durante 5 min, 40 ciclos de 95°C durante 10 seg. y 60°C durante 60 seg. Los resultados obtenidos del análisis de las muestras fueron analizados utilizando el programa informático StepOnePlus Real-Time PCR system versión 2.3 (life technologies,

USA). Para la cuantificación de los ciliados presentes en las muestras, se construyeron curvas estándar basadas en diluciones seriadas $\frac{1}{2}$ de concentraciones de ADN obtenidas a partir de ciliados en un rango de entre 1-60 ciliados/ μ L. Para las demás curvas de calibrado se utilizaron como mínimo 6Log_{10} de las concentraciones de ADN. Los valores de C_q obtenidos se representaron gráficamente frente al logaritmo de las concentraciones de las muestras y la pendiente (m) de las curvas estándar se calculó a partir de una regresión lineal. La eficiencia (E) de la qPCR se calculó según la fórmula: $E = 10^{1/m} - 1$. Para el cálculo del coeficiente de variación (CV) se utilizó la fórmula: $\text{CV} (\%) = \text{media}/\text{desviación estándar} \times 100$.

10 Clonación y secuenciación de la región ITS-2

El producto de PCR conteniendo el fragmento ITS-2 de 78 pares de bases (pb) (SEQ ID NO: 1) fue clonado en el vector pSparkII utilizando el pSparkII cloning kit (Canvax, España), siguiendo las instrucciones de la casa comercial, y transformado en bacterias competentes *Escherichia coli* cepa DH-5 α que se hicieron crecer durante 24 h a 37°C en medio LB/ampicilina/IPTG/X-Gal. Las colonias blancas obtenidas se hicieron crecer durante 24 h a 37 °C en medio líquido LB/ampicilina y los plásmidos fueron purificados utilizando el kit GeneJet Plasmid Miniprep (thermoscientific, USA), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Los insertos clonados fueron secuenciados mediante secuenciación de Sanger por la casa comercial Eurofins Genomics (Alemania). La identidad entre las diferentes secuencias de nucleótidos de los fragmentos ITS-2 de los ciliados ensayados fue determinada mediante alineamiento múltiple empleando la herramienta bioinformática Clustal Omega (Instituto Europeo de Bioinformática, EMBL-EBI). Para determinar el número de copias que posee el genoma de los ciliados, se construyeron curvas estándar a partir de diluciones seriadas 1/10 de concentraciones conocidas de plásmidos con el fragmento clonado en un rango entre 10^{-2} y 10^3 ng/ μ L. El número de copias correspondiente a cada dilución se obtuvo a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ copias} = \text{concentración ADN (ng)} \times 6,022 \times 10^{23} / \text{longitud del plásmido conteniendo el inserto (pb)} \times 10^9 \text{ (factor de conversión a ng)} \times 660 \text{ (masa media de ADN de doble cadena)}.$$

30 EJEMPLO 2: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de la especificidad y sensibilidad del ensayo

Inicialmente, se evaluó la especificidad de los cebadores fITS2 /rITS2 (Tabla 1) mediante una PCR convencional y los resultados obtenidos se muestran en la figura 1. En este experimento, se amplificó un fragmento de 78 pares de bases (pb) situado en la región ITS2 del gen que codifica el ARN ribosómico (ARNr) correspondiente a 5 aislados de *P. dicentrarchi* (aislados I1, C1, D2, D3 y S1), a la cepa Ma/2 de *M. avidus* y a los ciliados ambientales *U. marinum*, *P. adherens* y *E. minuta*. Como se puede observar en la figura 1, la pareja de cebadores diseñados amplifica todos los aislados de *P. dicentrarchi* y a la cepa Ma/2 de *M. avidus*; sin embargo, no amplifica los ciliados ambientales *U. marinum*, *P. adherens* y *E. minuta*.

- 10 **Tabla 1: Tabla de identidades nucleotídicas, expresadas en porcentaje, entre las secuencias del fragmento ITS2 de la especie *P. dicentrarchi* y los ciliados marinos *U. marinum*, *P. adherens*, y *E. minuta* calculada mediante el programa Clustal omega.**

	<i>E. minuta</i>	<i>P. adherens</i>	<i>P. dicentrarchi</i>	<i>U. marinum</i>
<i>E. minuta</i>	100,00	47,06	44,87	36,36
<i>P. adherens</i>		100,00	42,31	40,00
<i>P. dicentrarchi</i>			100,00	74,55
<i>U. marinum</i>				100,00

- 15 El análisis de las secuencias del fragmento ITS2 amplificado por los cebadores fITS2/rITS2 confirma que las secuencias de los aislados de *P. dicentrarchi* y de la cepa Ma/2 de *M. avidus* presentan una identidad del 100% y más baja con *U. marinum* (74,55%), *E. minuta* (44,87%) y *P. adherens* (42,31%) (Tabla 1).

Análisis de las características de la qPCR

- 20 Las características de la PCR se definieron tras la construcción de curvas estándar a partir del ensayo de diferentes concentraciones a una dilución 1/10 de plásmidos clonados con el fragmento ITS2 amplificado con los cebadores fITS2/rITS2, en un rango de Cq entre 14 y 29 ciclos (Figura 2). Las concentraciones más bajas y altas del estándar incluido en la curva de calibración deben de determinarse de acuerdo con un rango dinámico lineal del al menos 6 Log₁₀ (Krallik y Ricchi, 2017, Front. Microbiol. 8: 108).

- 25 La pendiente (*m*) de la curva de calibrado debe calcularse mediante regresión lineal. Para que la *m* sea un indicador de amplificación real (en lugar de una señal de deriva), tiene que

haber un punto de interrupción en la gráfica de amplificación. La pendiente de la recta de regresión lineal idealmente es de -3.3219, que da como resultado una eficiencia (E) de la qPCR de 1. Con esta E , el número de moléculas diana se duplica exactamente en un ciclo de PCR y una m entre -3.1 y -3.6, con una E de entre 90 y 110 son generalmente aceptables (Svec et al., 2015, *Biomol Detect Quantif.* 3:9-16). La m calculada de la recta de regresión correspondiente a la amplificación con los plásmidos clonados con el fragmento ITS2 es de -3,0585 (Fig. 2), mientras que la obtenida para la cuantificación de los ciliados es de -3,3928 (Fig. 3), ambos valores se encuentran dentro del margen $-3,6 \leq m \leq -3,1$ que se consideran óptimos para la qPCR (Raymaekers y cols., 2009, *J Clin Lab Anal.* 23:145-151).

La eficiencia de la amplificación (E) es uno de los parámetros más importantes a la hora de la optimización de la qPCR puesto que afecta decisivamente a los resultados obtenidos, ya que incluso pequeños cambios en la E conducen a diferencias considerables en los datos finales (Rao y cols., 2013, *J Comput Biol.* 20:703-711). La E de la qPCR se define como la fracción de moléculas diana que se copian en un ciclo de PCR de tal forma que un ensayo bien diseñado deberá amplificar el ADN molde con, al menos, un 90% de E (Svec et al., 2015, *Biomol Detect Quantif.* 3:9-16). La E debe estar en el rango de 0-1 (0-100%) de tal forma que cuando $E=1$ el número de amplicones de ADN generados se duplica en cada ciclo; sin embargo, en la práctica este parámetro se sitúa en el rango entre el 90-105% (Johnson y cols., 2013, *Methods Mol. Biol.* 943: 1-16). Este parámetro se suele estimar a partir de la m de la curva de calibración (Krallik y Ricchi, 2017, *Front. Microbiol.* 8: 108). Con respecto a la estimación de la E de la qPCR utilizada, tanto cuando se construye la recta de regresión con los plásmidos clonados, como con el ADN de los ciliados, se obtienen E de entre 1,1 y 0,9 (110-90%), respectivamente (Fig. 2 y 3), valores que se encuentran en el rango de $0,9 < E < 1,1$ que se consideran óptimos para la qPCR (Raymaekers y cols., 2009, *J Clin Lab Anal.* 23:145-151).

Control de calidad interno: Linearidad, límite de detección y cuantificación y precisión del ensayo qPCR

Las curvas estándar también se utilizan, además de para evaluar el rendimiento del ensayo de la qPCR estimando su E , para determinar el rango dinámico del ensayo, el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) (Svec et al., 2015, *Biomol Detect Quantif.* 3:9-16).

Linearidad: El coeficiente de correlación (R^2) obtenido en las curvas estándar es superior a 0,99 (Figs. 2 y 3) lo que indica una elevada linearidad del ensayo qPCR, así como una muy

elevada correlación entre la Cq y la concentración de ADN de la muestra. En los ensayos de qPCR la R^2 obtenida en el análisis debe ser ≥ 0.98 (Broeders y cols., 2014, Trends in Food Science & Technology, 37: 115-126).

Límite de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ): La determinación del LOD del ensayo se realizó mediante una curva estándar construida a partir de las medias de muestras ensayadas por triplicado. Los rangos de concentración de ADN de *P. dicentrarchi* utilizados para la construcción de la curva estándar fueron entre 50 ng/ μ L y 50 pg/ μ L. En el ensayo también se incluyeron controles negativos que no poseen ADN molde (NTC) y muestras de 50 ng/ μ L de ADN procedente de una mezcla de ciliados ambientales aislados de agua de mar (EC). Los valores medios de Cq obtenidos en la qPCR utilizando los controles NTC y EC fueron de 35 y 34,3, respectivamente. Los resultados experimentales mostraron que el LOD del ensayo fue de al menos 120 pg/ μ L que genera una Cq de 30 (Fig. 3). Para determinar el LOQ se construyó una curva patrón obtenida tras el ensayo de muestras de ADN extraídas individualmente de ciliados en un rango de entre 1-64 trofontes. Los resultados experimentales obtenidos tras la amplificación mediante qPCR muestran que es posible detectar con confianza hasta 1 ciliado por reacción, por lo que este valor supone el LOQ del ensayo (Fig. 4).

Precisión del ensayo: De forma general, la precisión de métodos de qPCR se analiza calculando los coeficientes de variación (CV) que miden la variación alrededor de la media y son una herramienta útil para evaluar el grado de inconsistencia de los datos (Taylor y cols., 2019, Trends Biotechnol. Jul;37(7):761-774). La precisión se define como el grado de concordancia de las mediciones en condiciones específicas; sin embargo, para la determinación práctica de la precisión se introdujeron dos condiciones denominadas: repetitividad y reproducibilidad (Kralik y Ricchi, 2017, Front. Microbiol. 8: 108) que permiten describir la variabilidad de los resultados obtenidos y que pueden ser determinadas a través de dos variables diferentes: la variabilidad intra- ensayo (variabilidad en las réplicas realizadas en el mismo experimento) y la variabilidad inter- ensayo (variabilidad entre diferentes ensayos realizados en diferentes días). En la qPCR hemos analizado 10 muestras en cada ensayo donde evaluamos la variación intraespecífica e interespecífica obtenida. Concretamente, hemos ensayado la variabilidad en las Cq obtenidas a partir de muestras positivas y muestras negativas y cuyos resultados se muestran en la tabla 2. Como se puede observar, los CVs calculados varían entre un 0,55 y un 2,05% en el inter- ensayo y entre un 0,27 y un 7,57 en el inter- ensayo, valores todos ellos mucho más bajos que el 25% que es el límite de variabilidad considerado para que un ensayo qPCR presente una adecuada repetitividad y reproducibilidad.

Tabla 2: Determinación del grado de precisión tras el análisis de los coeficientes de variación intra- e inter- ensayo de los Cq obtenidos en la qPCR.

	Variación intraensayo		Variación interensayo	
	Cq (media±SD)	CV (%)	Cq (media±SD)	CV (%)
NTC	36,10±0,74	2,05	35,42±0,95	0,27
CN	35,07±0,20	0,55	34,69±0,55	1,58
CP	15,87±0,12	0,78	15,22±1,15	7,57
CPC	22,04±0,12	0,55	22,33±0,41	1,86
CC	35,07±0,20	0,57	35,15±1,16	3,31
S	27,29±0,31	1,13	27,67±0,53	1,93

5 **NTC:** Control negativo sin molde (agua MilliQ); **CN:** Control negativo (agua de mar tratada en autoclave durante 15 min a 121°C y sometida a las mismas condiciones de procesado y extracción de ADN que las muestras); **CP:** Control positivo (molde: 50 ng/mL de ADN extraído a partir de ciliados cultivados in vitro); **CPC:** Control positivo contaminado (molde: agua de mar tratada en autoclave durante 15 min a 121°C y contaminada con $1,5 \times 10^3$ ciliados/mL); **CC:** Control mezcla de ciliados ambientales; **S:** Muestra experimental positiva (presencia de *P. dicentrarchi*) de agua obtenida en la piscifactoría; **SD:** desviación estándar; **CV:** Coeficiente de variación (en porcentaje). $CV = SD/mediana \times 100$. $n=10$ muestras

Evaluación del protocolo de obtención y procesamiento de las muestras

Finalmente, se realizaron experimentos para determinar la eficiencia y rendimiento de la obtención y recuperación de ciliados en muestras de agua de mar. Para el aislamiento de los ciliados, se siguió un método de concentración utilizando un sistema de filtración a vacío secuencial. Previamente, también se estableció experimentalmente el volumen de muestra a analizar que fue de 2L totales. Una vez establecidas las condiciones de aislamiento, también se utilizó un método de aislamiento y purificación de ADN a partir de los ciliados concentrados mediante el sistema de filtración. El rendimiento del procedimiento completo se evaluó en una muestra de agua de 2L obtenida en un tanque de cultivo de rodaballos que previamente se había comprobado que era positiva para la presencia de ciliados y que, posteriormente, se contaminó con una cantidad conocida de 4×10^3 ciliados obtenidos de un

cultivo *in vitro* en el laboratorio. Para este ensayo, las muestras extraídas se sometieron a la qPCR y la cuantificación de los ciliados se realizó por extrapolación de las Cq obtenidas a una recta de calibrado construida con diferentes cantidades de ADN de ciliados, concretamente de un número conocido de trofontes de *P.dicentrarchi* cepa I1 (Fig. 3). Como se puede observar en la tabla 3, la cuantificación final de los ciliados en la muestra contaminada fue prácticamente igual al número de ciliados con la que se contaminó (sumándose el número de ciliados originales que poseía la propia muestra con los ciliados añadidos), obteniéndose una recuperación del 100% de los ciliados.

Tabla 3: Rendimiento del método de extracción de ciliados del agua de mar (% recuperación).

Muestra	Numero Ciliados/2L \pm SD
Sin contaminar	341 \pm 28
Contaminada	4571 \pm 411
% recuperación	106 \pm 8

Conclusiones

El método de qPCR diseñado es muy específico permitiendo determinar y cuantificar la presencia de trofontes de escuticociliados (específicamente de las especies *P. dicentrarchi* y *M. avidus*), posee una elevada eficiencia y sensibilidad, siendo capaz de detectar hasta 1 ciliado/muestra. Asimismo, la qPCR tiene una elevada precisión, como lo indican los bajos porcentajes de variación intra- e inter-ensayos y el protocolo de aislamiento para la cuantificación de los ciliados en el agua presenta un rendimiento de prácticamente el 100%.

El término “*Artificial Sequence*” del listado de secuencias se traduce como “Secuencia artificial”

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la detección de escuticociliados en una muestra que comprende:
 - a) someter los ácidos nucleicos obtenidos de dicha muestra a una reacción de
5 amplificación de una región diana del genoma del escuticociliado que tiene al
 menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 1 o de un fragmento de la misma en
 presencia de un cebador directo y un cebador reverso específicos para dicha
 región capaces de amplificar dicha región o fragmento, y
 - b) detectar el producto de amplificación producido en la etapa a)
10 donde la detección de un producto de amplificación es indicativa de la presencia
 de escuticociliados en la muestra.

2. El procedimiento según la reivindicación 1, donde los escuticociliados son
15 seleccionados de un grupo que consiste en *Philasterides dicentrarchi*, *Miamiensis*
 avidus y combinaciones de los mismos.

3. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde la muestra
 es una muestra de agua salada.

- 20 4. El procedimiento según la reivindicación 3, donde la muestra de agua es de agua
 obtenida de estuarios, lagos de agua salada, marismas, mares, océanos, rías,
 acuicultura en instalaciones en tierra o en jaulas en mar abierto, piscifactorías
 marinas o acuarios de animales marinos de agua caliente o fría.

- 25 5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, donde la muestra
 de agua se procesa previamente según un procedimiento para aislar ácidos
 nucleicos que comprende:
 - (i) Concentración de microorganismos, obteniendo una primera solución;
 - (ii) Lisis de la primera solución, obteniendo una segunda solución;
 - 30 (iii) Neutralización y remoción de polisacáridos de la solución obtenida en la
 etapa (ii), obteniendo una tercera solución;
 - (iv) Remoción de proteínas de la solución obtenida en la etapa (iii) obteniendo
 una cuarta solución; y
 - (v) Purificación del material genético en la solución obtenida en la etapa (iv),
35 obteniendo una solución final que contiene los ácidos nucleicos.

6. El procedimiento según la reivindicación 5, donde la concentración de microorganismos de la muestra de agua se realiza mediante un sistema de filtración a vacío secuencial.
- 5 7. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, donde el volumen de la muestra de agua es de al menos 1 litro, preferiblemente de al menos 2 litros.
8. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la región diana del genoma del escuticociliado tiene al menos un 85% de identidad con SEQ
10 ID NO: 1.
9. El procedimiento según la reivindicación 8, donde la región diana del genoma del escuticociliado tiene al menos un 92% de identidad con SEQ ID NO: 1.
- 15 10. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la región diana del genoma del escuticociliado consiste en la secuencia SEQ ID NO: 1.
11. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde los cebadores comprenden entre 18 a 30 nucleótidos.
20
12. El procedimiento según la reivindicación 11, donde los cebadores comprenden entre 20 a 26 nucleótidos.
13. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde los
25 cebadores consisten en 20 nucleótidos.
14. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde el cebador directo comprende una secuencia que tiene al menos un 80% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 2.
30
15. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde el cebador directo consiste en la secuencia SEQ ID NO: 2.
16. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, donde el
35 cebador reverso comprende una secuencia que tiene al menos un 80% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 3.

17. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, donde el cebador reverso consiste en la secuencia SEQ ID NO: 3.
- 5 18. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, donde la reacción de amplificación se lleva a cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real.
- 10 19. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, donde la reacción de amplificación se realiza en presencia de tampón de reacción, desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP), iones de magnesio y ADN polimerasa.
- 15 20. El procedimiento según la reivindicación 19, donde los iones de magnesio se obtienen de cloruro de magnesio ($MgCl_2$) presente a una concentración de 2 a 3 mM en la mezcla de reacción.
- 20 21. El procedimiento según la reivindicación 20, donde los iones de magnesio se obtienen de cloruro de magnesio ($MgCl_2$) presente a una concentración de 2,5 mM en la mezcla de reacción.
- 25 22. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, donde la reacción de amplificación se realiza en presencia de una sonda de oligonucleótidos o en presencia de un marcador fluorescente, en donde la sonda de oligonucleótidos comprende una secuencia complementaria a un fragmento de la región diana.
- 30 23. El procedimiento según la reivindicación 22, en donde la sonda de oligonucleótidos hibrida con una secuencia situada en la región de la SEQ ID NO: 1 comprendida entre los nucleótidos 22 y 57 de SEQ ID NO: 1.
- 35 24. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 o 23, donde la sonda de oligonucleótidos comprende una secuencia que tiene al menos un 80% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 4.
25. El procedimiento según la reivindicación 24, donde la sonda de oligonucleótidos consiste en la secuencia SEQ ID NO: 4.

26. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, donde la sonda de oligonucleótidos comprende un fluoróforo donador en el extremo 5' o el extremo 3' y un fluoróforo aceptor en el extremo opuesto al donador.

5 27. El procedimiento según la reivindicación 26, donde el fluoróforo donador se selecciona de un grupo que consiste en:

- Ácido 3',6'-dihidroxi-1-oxoespiro[2-benzofurano-3,9'-xanteno]-5-carboxílico (6-FAM);
- Cianina 3, 5: cloruro de (2Z)-2-[(3,6-dimetil-2-fenilpirimidin-3-ilo-4-il)metilideno]-1-etilquinolina (Cy3 o Cy5);
- 10 - 2,2-dimetilpropanoato de [2',4,4',5',7,7'-hexacloro-6-[6-[2-cianoetoxi-[di(propano-2-il)amino]fosfanil]oxihexilcarbamoil]-6'-(2,2-dimetilpropanoiloxi)-3-oxoespiro[2-benzofuran-1,9'-xanteno]-3'-ilo] (HEX);
- 3R,4S,5S,6R,7R,9R,11S,12R,13S,14R)-6-[(2S,3R,4S,6R)-4-(dimetilamino)-
- 15 3-hidroxi-6-metiloxano-2-il]oxi-14-etil-7,12,13-trihidroxi-4-[(2R,4R,5S,6S)-5-hidroxi-4-metoxi-4,6-dimetiloxan-2-il]oxi-10-(2-metoxietoximetoxiamino)-3,5,7,9,11,13-hexametil-oxacicotetradecano-2-ona (ROX);
- 5-clorosulfonil-2-(3-oxa-23-aza-9-azoniaheptaciclo[17.7.1.1^{5,9}.0^{2,17}.0^{4,15}.0^{23,27}.0^{13,28}]octacosa-
- 20 1(27),2(17),4,9(28),13,15,18-heptaen-16-il)bencenosulfonato (Texas Red);
- 2-(7-etil-3,3,8,8,10-pentametil-7-aza-21-azoniahexaciclo[15.7.1.0^{2,15}.0^{4,13}.0^{6,11}.0^{21,25}]pentacosa-
- 1,4(13),5,11,14,16,18,21(25)-octaen-14-il)-N-metil-N-(4-oxopentil)benzamida (ATTO[®] 647N);
- 25 - 4',5'-dicloro-3',6'-dihidroxi-2',7'-dimetoxi-1-oxoespiro[2-benzofuran-3,9'-xanteno]-5-carboxilato de (2,5-dioxopirrolidin-1-ilo) (6-JOE);
- (2S,4R)-N-[(1S)-2-metil-1-[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-metilsulfaniloxan-2-il]propil]-4-propilpiperidin-2-carboxamida (VIC); y
- 4,5,6,7-tetracloro-3',6'-dihidroxi-1-oxoespiro[2-benzofuran-3,9'-xanteno]-1-ona
- 30 (TET).

28. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 26 o 27, donde el fluoróforo aceptor se selecciona de un grupo que consiste en:

- 2,5-Bis(2-metil-2-propanil)-1,4-bencenodiol (BHQ1, BHQ2);
- 35 - N-[2-[(E)-3-[1-[(2R,4S,5R)-5-[[bis(4-metoxifenil)-fenilmetoxi]metil]-4-[2-cianoetoxi-[di(propano-2-il)amino]fosfanil]oxioxolan-2-il]-2,4-dioxopirimidin-5-il]prop-2-enoil]amino]etil]-6-[[7-[[2,5-dimetoxi-4-[(4-

nitrofenil) diazenil]fenil] diazenil]-1-azatriciclo[7.3.1.0^{5,13}]trideca-5(13),6,8-trien-6-il]oxi]hexanamida (BBQ650);

- 2-[3-(dimetilamino)-6-dimetilazanioidenexanten-9-il]benzoato (TAMRA);
- Ácido (2S)-2-[4-(3,4-dimetilfenil)-2-metilquinolin-3-il]-2-[(2-metilpropan-2-il)oxi]acético (TQ2); y
- 5-fenilsulfanilquinazolin-2,4-diamina (TQ3).

5

29. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, donde el marcador fluorescente se selecciona de un grupo que consiste en: SYTO 15, SYTO 25, SYTO 13, SYTO 9, N',N'-dimetil-N-[4-[(E)-(3-metil-1,3-benzotiazol-2-ilideno)metil]-1-fenilquinolin-1-ilo-2-il]-N-propilpropano-1,3-diamina (SYBR Green I), SYTO 16, SYTO 17, SYTO 21, SYTO 59, SYTOX, SYTO BC, 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), PicoGreen y cualquier combinación de los mismos.

10

30. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, donde las condiciones de la reacción de amplificación comprenden:

15

- (i) Una etapa de desnaturalización inicial a una temperatura comprendida entre 90°C y 98°C durante un tiempo comprendido entre 3 min y 10 min;
- (ii) Una etapa de desnaturalización a una temperatura comprendida entre 90°C y 98°C durante un tiempo comprendido entre 15 s y 60 s;
- (iii) Una etapa de hibridación a una temperatura comprendida entre 50°C y 68°C durante un tiempo comprendido entre 15 s y 45 s;
- (iv) Una etapa de extensión a una temperatura comprendida entre 68°C y 72°C durante un tiempo comprendido entre 45 s y 90 s; y
- (v) Una etapa de extensión final a una temperatura comprendida entre 68°C y 72°C durante un tiempo comprendido entre 5 min y 15 min,

20

25

donde las etapas (ii), (iii) y (iv) se repiten al menos 20 veces antes de llevar a cabo la etapa (v).

31. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, donde las condiciones de la reacción de amplificación comprenden:

30

- (i) Una etapa de desnaturalización inicial a una temperatura comprendida entre 90°C y 98°C durante un tiempo comprendido entre 3 min y 10 min;
- (ii) Una etapa de desnaturalización a una temperatura comprendida entre 90°C y 98°C durante un tiempo comprendido entre 5 s y 15 s; y
- (iii) Una etapa de hibridación a una temperatura comprendida entre 58°C y 62°C durante un tiempo comprendido entre 30 s y 90 s;

35

donde las etapas (ii) y (iii) se repiten al menos 10 veces.

32. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, donde la detección del producto de amplificación se lleva a cabo por electroforesis en gel y/o secuenciación de ADN.

5

33. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32, donde el procedimiento comprende además una etapa para cuantificar la concentración de escuticociliados en la muestra.

10 34. El procedimiento según la reivindicación 33, donde la cuantificación se hace a través de una curva estándar.

35. Un oligonucleótido seleccionado de un grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

15

36. El oligonucleótido de la reivindicación 35, en donde el oligonucleótido de acuerdo con la SEQ ID NO: 4 comprende un fluoróforo donador en el extremo 5' o el extremo 3' y un fluoróforo aceptor en el extremo opuesto al donador.

20 37. El oligonucleótido de la reivindicación 36, en donde el fluoróforo donador se selecciona de un grupo que consiste en:

- Ácido 3',6'-dihidroxi-1-oxoespiro[2-benzofurano-3,9'-xanteno]-5-carboxílico (6-FAM);
- Cianina 3, 5: cloruro de (2Z)-2-[(3,6-dimetil-2-fenilpirimidin-3-ilo-4-il)metilideno]-1-etilquinolina (Cy3 o Cy5);
- 2,2-dimetilpropanoato de [2',4,4',5',7,7'-hexafluoro-6-[6-[2-cianoetoxi-[di(propano-2-il)amino]fosfanil]oxihexilcarbamoil]-6'-(2,2-dimetilpropanoiloxi)-3-oxoespiro[2-benzofuran-1,9'-xanteno]-3'-ilo] (HEX);
- 3R,4S,5S,6R,7R,9R,11S,12R,13S,14R)-6-[(2S,3R,4S,6R)-4-(dimetilamino)-3-hidroxi-6-metiloxano-2-il]oxi-14-etil-7,12,13-trihidroxi-4-[(2R,4R,5S,6S)-5-hidroxi-4-metoxi-4,6-dimetiloxan-2-il]oxi-10-(2-metoxietoximetoxiamino)-3,5,7,9,11,13-hexametil-oxaciclotetradecano-2-ona (ROX);
- 5-clorosulfonil-2-(3-oxa-23-aza-9-azoniaheptaciclo[17.7.1.1^{5,9}.0^{2,17}.0^{4,15}.0^{23,27}.0^{13,28}]octacosa-1(27),2(17),4,9(28),13,15,18-heptaen-16-il)bencenosulfonato (Texas Red);

35

- 2-(7-etil-3,3,8,8,10-pentametil-7-aza-21-azoniahexaciclo[15.7.1.0^{2,15}.0^{4,13}.0^{6,11}.0^{21,25}]pentacosa-1,4(13),5,11,14,16,18,21(25)-octaen-14-il)-N-metil-N-(4-oxopentil)benzamida (ATTO[®] 647N);
 - 5 - 4',5'-dicloro-3',6'-dihidroxi-2',7'-dimetoxi-1-oxoespiro[2-benzofuran-3,9'-xanteno]-5-carboxilato de (2,5-dioxopirrolidin-1-ilo) (6-JOE);
 - (2S,4R)-N-[(1S)-2-metil-1-[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-metilsulfaniloxan-2-il]propil]-4-propilpiperidin-2-carboxamida (VIC); y
 - 10 (TET).
38. El oligonucleótido según la reivindicación 36 o 37, en donde el fluoróforo aceptor se selecciona de un grupo que consiste en:
- 2,5-Bis(2-metil-2-propanil)-1,4-bencenodiol (BHQ1, BHQ2);
 - 15 - N-[2-[[*(E)*-3-[1-[(2R,4S,5R)-5-[[bis(4-metoxifenil)-fenilmetoxi]metil]-4-[2-cianoetoxi-[di(propano-2-il)amino]fosfanil]oxioxolan-2-il]-2,4-dioxopirimidin-5-il]prop-2-enoil]amino]etil]-6-[[7-[[2,5-dimetoxi-4-[(4-nitrofenil)diazetil]fenil]diazetil]-1-azatriciclo[7.3.1.0^{5,13}]trideca-5(13),6,8-trien-6-il]oxi]hexanamida (BBQ650);
 - 20 - 2-[3-(dimetilamino)-6-dimetilazanioidenexanten-9-il]benzoato (TAMRA);
 - Ácido (2S)-2-[4-(3,4-dimetilfenil)-2-metilquinolin-3-il]-2-[(2-metilpropan-2-il)oxi]acético (TQ2); y
 - 5-fenilsulfanilquinazolin-2,4-diamina (TQ3).
- 25 39. Un kit que comprende una pareja de cebadores de secuencias SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3.
40. El kit según la reivindicación 39, que además comprende la sonda de oligonucleótidos de secuencia SEQ ID NO: 4.
- 30 41. El kit según la reivindicación 40, donde la sonda de oligonucleótidos de secuencia SEQ ID NO: 4 comprende un fluoróforo donador en el extremo 5' o el extremo 3' y un fluoróforo aceptor en el extremo opuesto al donador.
- 35 42. El kit según la reivindicación 41, donde el fluoróforo donador se selecciona de un grupo que consiste en:

- Ácido 3',6'-dihidroxi-1-oxoespiro[2-benzofurano-3,9'-xanteno]-5-carboxílico (6-FAM);
 - Cianina 3, 5: cloruro de (2Z)-2-[(3,6-dimetil-2-fenilpirimidin-3-io-4-il)metilideno]-1-etilquinolina (Cy3 o Cy5);
 - 5 - 2,2-dimetilpropanoato de [2',4,4',5',7,7'-hexafluoro-6-[6-[2-cianoetoxi-[di(propano-2-il)amino]fosfanil]oxihexilcarbamoil]-6'-(2,2-dimetilpropanoiloxi)-3-oxoespiro[2-benzofuran-1,9'-xanteno]-3'-ilo] (HEX);
 - 3R,4S,5S,6R,7R,9R,11S,12R,13S,14R)-6-[(2S,3R,4S,6R)-4-(dimetilamino)-3-hidroxi-6-metiloxano-2-il]oxi-14-etil-7,12,13-trihidroxi-4-[(2R,4R,5S,6S)-5-
 - 10 - hidroxi-4-metoxi-4,6-dimetiloxan-2-il]oxi-10-(2-metoxietoximetoxiamino)-3,5,7,9,11,13-hexametil-oxacicotetradecano-2-ona (ROX);
 - 5-clorosulfonil-2-(3-oxa-23-aza-9-azoniaheptaciclo[17.7.1.1^{5,9}.0^{2,17}.0^{4,15}.0^{23,27}.0^{13,28}]octacosa-1(27),2(17),4,9(28),13,15,18-heptaen-16-il)benzenosulfonato (Texas Red);
 - 15 - 2-(7-etil-3,3,8,8,10-pentametil-7-aza-21-azoniahexaciclo[15.7.1.0^{2,15}.0^{4,13}.0^{6,11}.0^{21,25}]pentacosa-1,4(13),5,11,14,16,18,21(25)-octaen-14-il)-N-metil-N-(4-oxopentil)benzamida (ATTO[®] 647N);
 - 4',5'-dicloro-3',6'-dihidroxi-2',7'-dimetoxi-1-oxoespiro[2-benzofuran-3,9'-xanteno]-5-carboxilato de (2,5-dioxopirrolidin-1-ilo) (6-JOE);
 - 20 - (2S,4R)-N-[(1S)-2-metil-1-[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-metilsulfaniloxan-2-il]propil]-4-propilpiperidin-2-carboxamida (VIC); y
 - 4,5,6,7-tetracloro-3',6'-dihidroxi-1-oxoespiro[2-benzofuran-3,9'-xanteno]-1-ona (TET).
 - 25
43. El kit según cualquiera de las reivindicaciones 41 o 42, donde el fluoróforo aceptor se selecciona de un grupo que consiste en:
- 2,5-Bis(2-metil-2-propanil)-1,4-bencenodiol (BHQ1, BHQ2);
 - N-[2-[(E)-3-[1-[(2R,4S,5R)-5-[[bis(4-metoxifenil)-fenilmetoxi]metil]-4-[2-
 - 30 - cianoetoxi-[di(propano-2-il)amino]fosfanil]oxioxolan-2-il]-2,4-dioxopirimidin-5-il]prop-2-enoil]amino]etil]-6-[[7-[[2,5-dimetoxi-4-[(4-nitrofenil)diazenil]fenil]diazetil]-1-azatriciclo[7.3.1.0^{5,13}]trideca-5(13),6,8-trien-6-il]oxi]hexanamida (BBQ650);
 - 2-[3-(dimetilamino)-6-dimetilazaniolidenexanten-9-il]benzoato (TAMRA);
 - 35 - Ácido (2S)-2-[4-(3,4-dimetilfenil)-2-metilquinolin-3-il]-2-[(2-metilpropan-2-il)oxi]acético (TQ2); y
 - 5-fenilsulfanilquinazolin-2,4-diamina (TQ3).

44. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39 a 43, que además comprende un marcador fluorescente que se selecciona del grupo que consiste en: SYTO 15, SYTO 25, SYTO 13, SYTO 9, N',N'-dimetil-N-[4-[(E)-(3-metil-1,3-benzotiazol-2-ilideno)metil]-1-fenilquinolin-1-ilo-2-il]-N-propilpropano-1,3-diamina (SYBR Green I), SYTO 16, SYTO 17, SYTO 21, SYTO 59, SYTOX, SYTO BC, 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), PicoGreen y cualquier combinación de los mismos.
- 5
45. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39 a 44, que además comprende uno o más de los componentes seleccionados del grupo que consiste en tampón de reacción, desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP), iones de magnesio y ADN polimerasa.
- 10
46. El uso del oligonucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 35-38 o el kit según cualquiera de las reivindicaciones 39 a 45 para detectar escuticociliados en una muestra.
- 15
47. El uso de la reivindicación 46, donde la detección de escuticociliados se lleva a cabo mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 34.

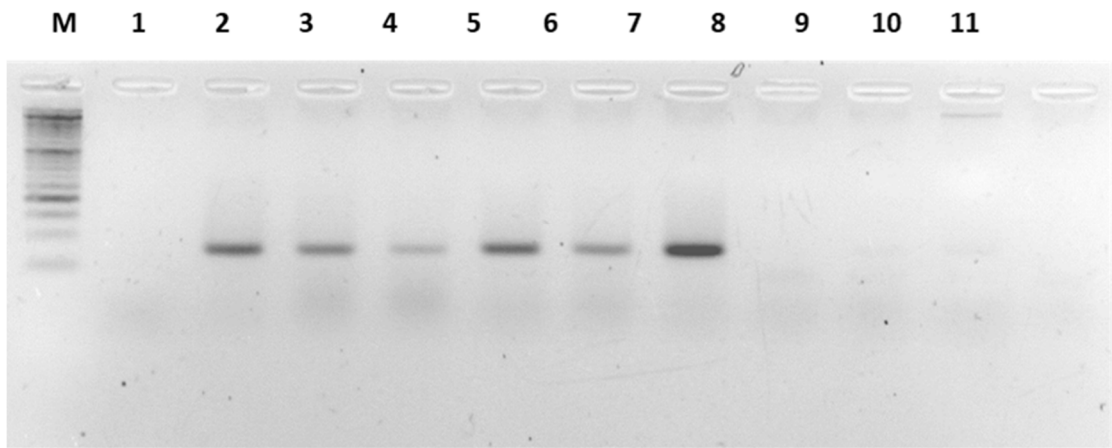


Fig. 1

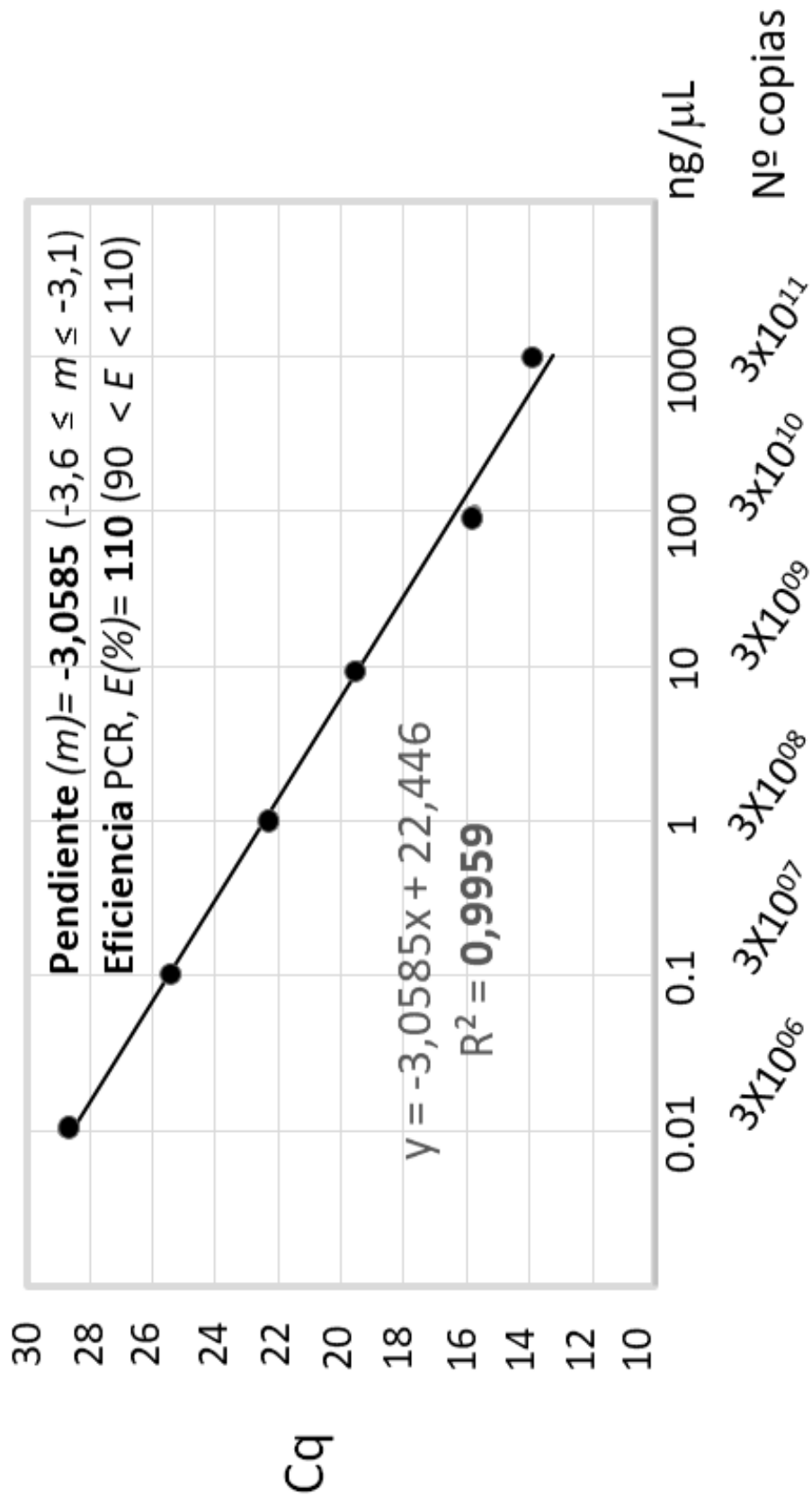


Fig. 2

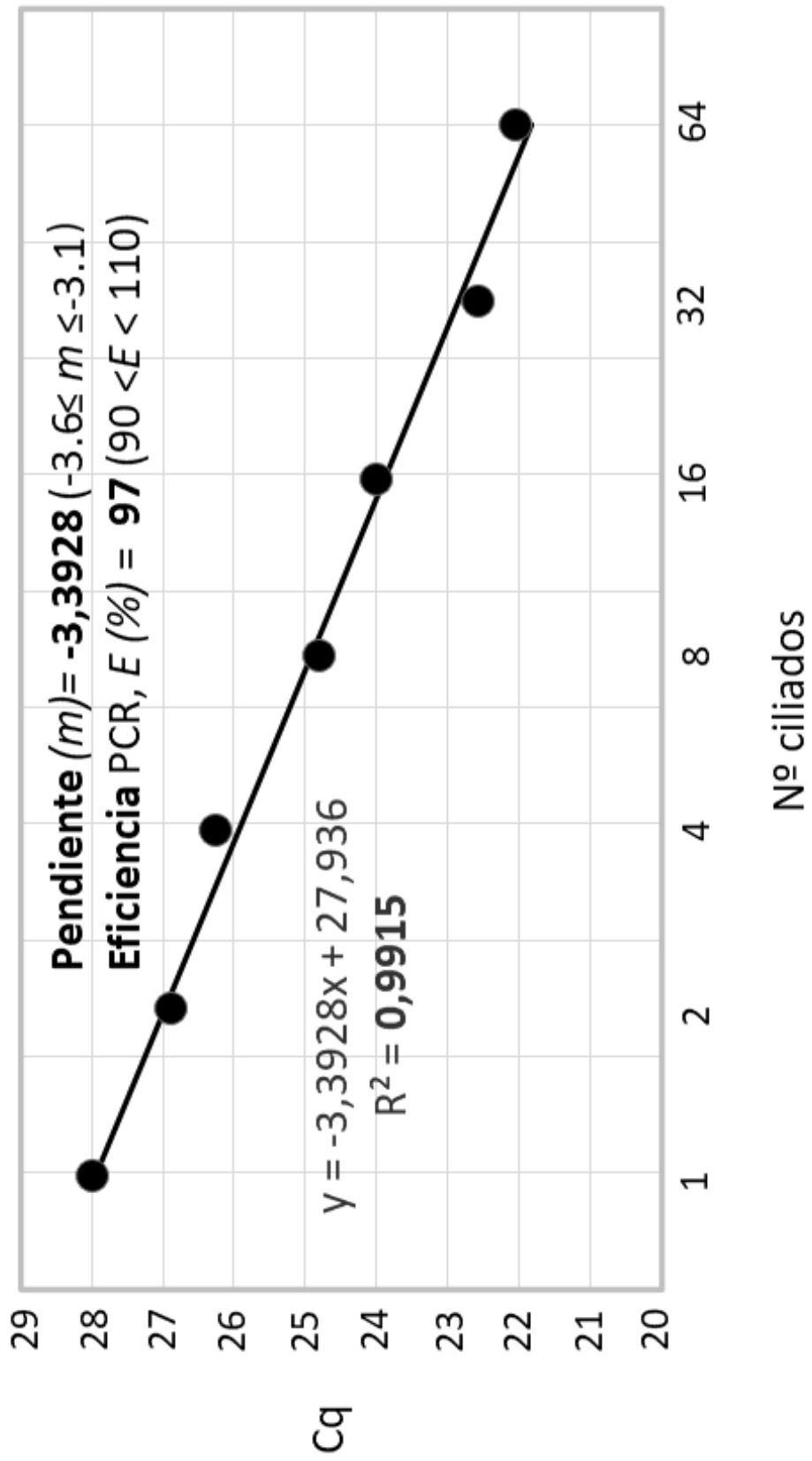


Fig. 3

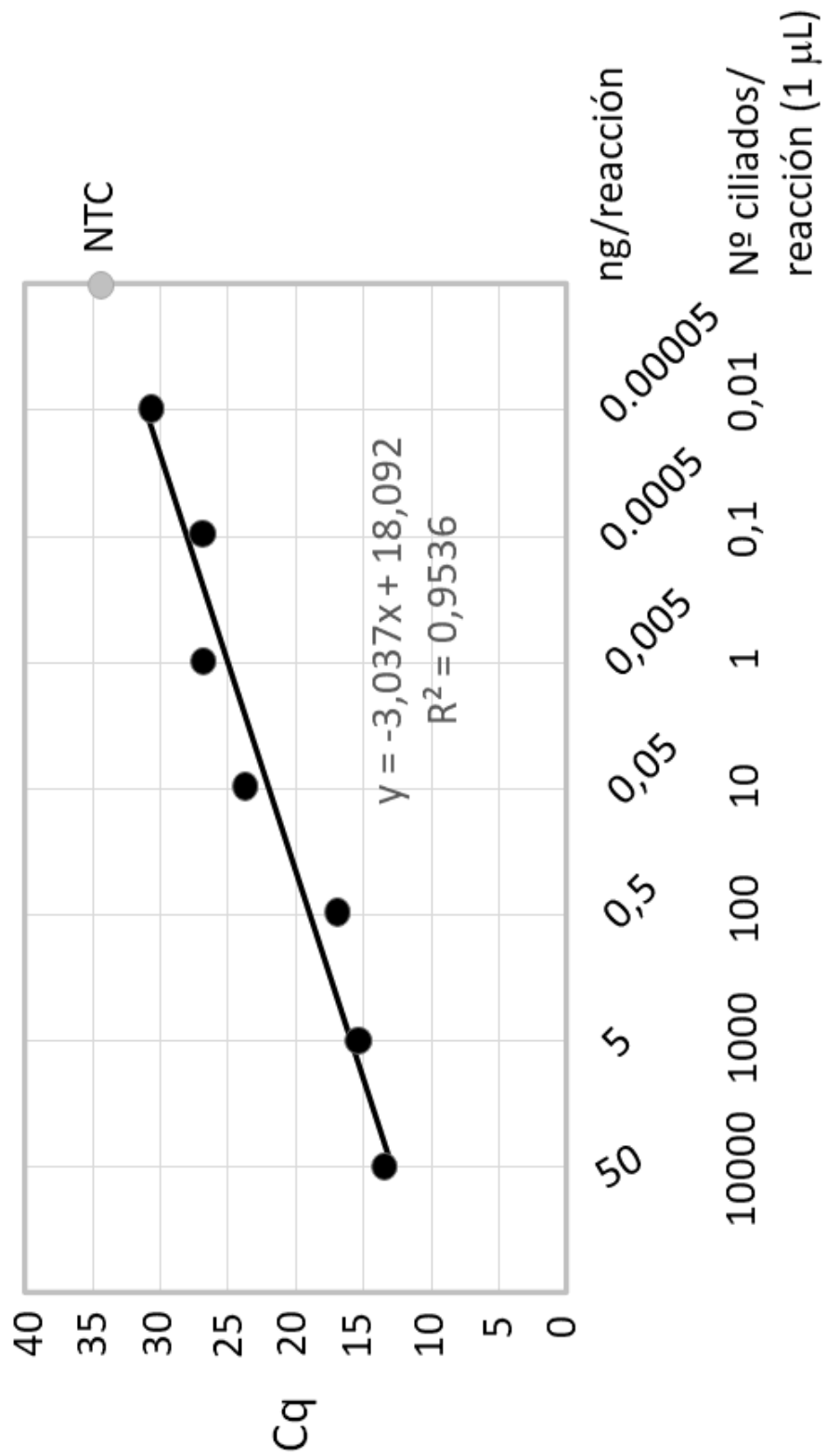


Fig. 4



- ②¹ N.º solicitud: 202131113
 ②² Fecha de presentación de la solicitud: 30.11.2021
 ③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. ci.: **C12Q1/04** (2006.01)
C12Q1/686 (2018.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	KR 20130095593 A (JEJU NAT UNIV IND ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 28/08/2013, todo el documento.	1-47
A	SUNG-JU JUNG et al. "Sequence conservation in the internal transcribed spacers and 5.8S ribosomal RNA of parasitic scuticociliates(Ciliophora, Scuticociliatia)". Parasitology International, 20110219 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL. Blair David; Nawa Yukifumi; Takahashi Yuzo; Maekawa Yoichi; Uga Syoji; Culleton Richard; Hasegawa Hideo; Kato Kentaro, 19/02/2011, Vol. 60, Nº 2, Páginas 216 - 219 [en línea] [recuperado el 05/09/2022], ISSN 1383-5769, <DOI: doi:10.1016/j.parint.2011.02.004>. todo el documento.	1-47
A	FENG GAO et al. "Insights into the phylogenetic and taxonomy of philasterid ciliates (Protozoa, Ciliophora, Scuticociliatia) based on analyses of multiple molecular markers". MOLECULAR PHYLOGENETICS AND EVOLUTION, 20120406 ORLANDO, FL, US. Schierwater Bernd; Stadler Peter; DeSalle Robert; Podsiadlowski Lars, 06/04/2012, Vol. 64, Nº 2, Páginas 308 - 317 [en línea] [recuperado el 05/09/2022], ISSN 1055-7903, <DOI: doi:10.1016/j.ympcv.2012.04.008>. todo el documento.	1-47

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
07.09.2022

Examinador
M. d. García Coca

Página
1/2

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/NLM, EMBASE/Elsevier, XPESP, EMBL-EBI, y Bases de Datos TXT