



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 344 443**

② Número de solicitud: 200900596

⑤ Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **25.02.2009**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **26.08.2010**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
26.08.2010

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Barcelona
Centro de Patentes de la UB.
Baldiri Reixac, 4
08028 Barcelona, ES**

⑦ Inventor/es: **Gironés Llop, Rosa;
Hundesa Gonfa, Ayalkibet y
Maluquer de Motes Porta, Carlos**

⑦ Agente: **Segura Cámara, Pascual**

⑤ Título: **Secuencias genómicas de cebadores y sonda para la cuantificación de adenovirus porcinos (PAdV).**

⑤ Resumen:

Secuencias genómicas de cebadores y sonda para la cuantificación de adenovirus porcinos (PAdV).

La invención se refiere a un test sensible para la detección de adenovirus porcinos en muestras medioambientales agua y alimentos. La invención presenta una herramienta cuantitativa para el análisis de adenovirus porcinos como indicadores de la presencia de contaminación porcina. La invención se refiere a un kit que comprende dos secuencias de cebadores y una secuencia de sonda capaces de detectar y cuantificar dicho virus por PCR. El test demostró ser de gran especificidad al no mostrar resultados positivos en muestras que contenían adenovirus humanos y bovinos. El ensayo detectó contaminación fecal porcina en muestras que estaban altamente diluidas y que habían sido recogidas a una considerable distancia de la fuente inicial.

ES 2 344 443 A1

DESCRIPCIÓN

Secuencias genómicas de cebadores y sonda para la cuantificación de adenovirus porcinos (PAdV).

5 **Campo de la invención**

La invención describe un método para la detección de PAdV en muestras medioambientales, agua y alimentos.

10 **Estado de la técnica anterior**

10 La contaminación microbiológica del medio ambiente supone un riesgo significativo para la salud humana a través de exposiciones recreacionales o consumo de agua o alimentos contaminados. De acuerdo con los requerimientos de la Directiva Marco para el Agua y la Ley para Aguas Limpias de los Estados Unidos de América, ha existido un cambio en las normativas sobre la calidad de los efluentes desde el enfoque tradicional sobre una fuente puntual hacia un enfoque de captura más amplio (cfr. Stapleton *et al.*, “Microbial Source tracking: a forensic technique for microbial source identification” *J. Environ. Monit.* 2007, vol. 9, pp. 427-39). Dado este nuevo enfoque, existe la necesidad de nueva información en las dinámicas microbianas de las áreas de captación de aguas para un control efectivo de la calidad de las aguas en el punto de uso. Históricamente, se han usado indicadores bacterianos incluyendo *Escherichia coli* y bacterias coliformes fecales para monitorear la calidad y seguridad de las aguas. Sin embargo, estas monitorizaciones no están a menudo correlacionadas con patógenos virales o parásitos protozoos y por lo tanto dejan sin resolver el problema de la detección en tiempo real.

25 La contaminación fecal se puede originar desde fuentes puntuales o no puntuales. Generalmente, las fuentes puntuales de contaminación fecal incluyen fuentes discretas como vertidos procedentes de grandes operaciones de cría de animales, efluentes tratados y no tratados de aguas residuales, agua de tormentas, y alcantarillado combinado. Las fuentes no puntuales son difusas e incluyen fuentes agrícolas y residuos animales aplicados a los campos agrícolas. La identificación de las fuentes de contaminación microbiológica juega un papel muy importante en la obtención de estrategias de manipulación y remediación efectivas, y se conoce como trazabilidad de fuentes de contaminación microbianas (“microbial source tracking”, MST). MST incluye un grupo de metodologías que tienen el fin de identificar, y en algunos casos cuantificar, las fuentes dominantes de contaminación fecal en el ambiente y, más específicamente, en recursos hídricos (cfr. Stoeckel *et al.* “Performance, Design, and Analysis in Microbial Source Tracking Studies” *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, vol. 73, pp. 2405-15). La contaminación medioambiental y de las aguas por residuos generados en granjas porcinas es una fuente de contaminación química y microbiológica. El virus de la hepatitis E es un patógeno viral humano que causa hepatitis aguda y se ha descrito como altamente prevalente en cerdos jóvenes y frecuentemente presente en muestras fecales, así como en aguas residuales y lodos producidos en mataderos que procesan cerdos (cfr. Clemente-Casares *et al.*, “Hepatitis E virus epidemiology in industrialised countries” *Emerging Infectious Diseases* 2003, vol. 9, pp. 448-54). El problema remanente es la identificación positiva de contaminación fecal de origen porcino, que permita localizar con exactitud la fuente de contaminación para procesos de remediación y evaluar el impacto potencial sobre la salud pública de la contaminación fecal en el agua.

40 Se han descrito varios métodos moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección específica de virus como adenovirus humanos (HAdV) y poliomavirus (JCPyV y BKPyV), adenovirus porcinos (PAdV) y poliomavirus bovinos (BPyV) como indicadores de contaminación de origen animal o humano en aguas y en moluscos bivalvos (cfr. Bofill-Mas *et al.*, “Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices” *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, vol. 72, pp. 7894-6; Formiga-Cruz *et al.*, “Evaluation of potential indicators of viral contamination in shellfish with applicability to diverse geographical areas” *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, vol. 69, pp. 1556-63; Hundesa *et al.*, “Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment” *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, vol. 72, pp. 7886-93; Pina *et al.*, “Viral pollution in the environment and shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses” *Appl. Environ. Microbiol.* 1998, vol. 64, pp. 3376-82; Puig *et al.*, “Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested-PCR amplification” *Appl. Environ. Microbiol.* 1994, vol. 60, pp. 2963-70; Maluquer *et al.* “Detection of Bovine and Porcine Adenoviruses for Tracing the Source of Fecal Contamination” *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, vol. 70, pp. 1448-54).

55 Otros estudios se relacionan con métodos similares para enterovirus bovinos y tescovirus (cfr. Jiménez-Clavero *et al.*, “Teschoviruses as indicators of porcine fecal contamination of surface water” *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, vol. 69, pp. 6311-5; and “Survey of bovine enterovirus in biological and environmental samples by a highly sensitive real-time reverse transcription-PCR” *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, vol. 71, pp. 3536-43).

60 La elevada estabilidad de los virus en el medio ambiente, la especificidad de huésped y la elevada prevalencia de algunas infecciones víricas a lo largo del año en la población apoya considerablemente el uso de técnicas de PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) para la identificación y cuantificación de virus específicos que pueden ser usados como herramientas de trazabilidad de la fuente de contaminación. Para la identificación de contaminación fecal de origen porcino, la cuantificación de virus de DNA excretados persistentemente a lo largo del año puede permitir el desarrollo de protocolos de coste efectivo con cuantificaciones de mayor exactitud de las fuentes de contaminación en comparación con virus de RNA; esto se debe a la mayor exactitud de la cuantificación por qPCR y a la menor sensibilidad a inhibidores, puesto que la transcriptasa reversa no es usada cuando se amplifican virus DNA.

Los protocolos de PCR y PCR anidada (nPCR) se usan típicamente debido a su elevada sensibilidad, pero no son cuantitativos y están sujetos a una alta probabilidad de contaminación cruzada por DNA, que normalmente se soluciona mediante secuenciación de los productos de PCR. La qPCR a tiempo real ha emergido como una técnica valiosa porque reduce exitosamente las probabilidades de contaminación en el laboratorio y las manipulaciones que consumen tiempo, y permite la cuantificación rápida y sensible de pequeñas cantidades de DNA diana en muestras biológicas y medioambientales.

La familia *Adenoviridae* es el único grupo conocido de virus entéricos que presenta genomas DNA de doble cadena. Esto representa una ventaja debido a la conservación y estabilidad de las secuencias. La familia *Polyomaviridae* incluye también virus DNA que producen infecciones persistentes y que son frecuentemente excretados en la orina, y por estos motivos ambos virus han sido propuestos como marcadores de la contaminación fecal. Los adenovirus humanos (HAdVs) son altamente prevalentes en aguas residuales así como en agua de río y moluscos bivalvos con contaminación fecal (cfr. Fong *et al.*, "Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools" *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2005, vol. 69, pp. 357-71; and "Molecular assays for targeting Human and Bovine viruses in coastal water and their application for Library-Independent source tracking" *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, vol. 71, pp. 2070-8) y están distribuidos de forma conservada en diversas áreas geográficas. Además, los adenovirus son más estables que los enterovirus a la radiación UV y a la fluoración. Como un grupo específico dentro de la familia, los adenovirus porcinos (PAdV) pertenecen al género *Mastadenovirus*. están divididos en seis serotipos y se han descrito como abundantes y altamente prevalentes en heces, aguas residuales de matadero y lodos (cfr. Hundesa *et al.*, "Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment" *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, vol. 72, pp. 7886-93). Otra ventaja de los PAdV es que están ampliamente diseminados en la población porcina y no producen enfermedades severas clínicamente. Estos datos focalizan PAdV como indicador de contaminación fecal porcina y muestran claramente su aplicabilidad para la identificación y cuantificación de la contaminación fecal porcina en el medio ambiente, demostrando su validez como herramienta para la trazabilidad de contaminación fecal microbiana.

Explicación de la invención

Se proporciona aquí un método para la cuantificación de contaminación por PAdV en una muestra sospechosa de contener el mismo. La presente invención desarrolla un ensayo de qPCR con un set de cebadores/sonda específicos capaz de detectar y cuantificar PAdV en excreta, lodos porcinos y diferentes tipos de agua.

La presente invención se refiere a un método para la detección y/o cuantificación de adenovirus porcinos (PAdV) en una muestra, que comprende la extracción del ácido nucleico de PAdV de la muestra; la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa del ácido nucleico extraído en presencia de al menos un cebador seleccionado entre SEQ ID NO: 1 o una variante funcional del mismo, SEQ ID NO: 2 o una variante funcional del mismo, y SEQ ID NO: 3 o una variante funcional del mismo, o sus cadenas complementarias; y la detección y/o cuantificación de PAdV evaluando el resultado de la reacción en cadena de la polimerasa.

La qPCR a tiempo real es una técnica molecular que permite la cuantificación de un pequeño número de copias genómicas. Por tanto, en una realización particular de la invención, esta reacción en cadena de la polimerasa es una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). En otra realización, la qPCR se realiza en presencia de una sonda específica para la secuencia del genoma de PAdV, y en una realización más particular, la qPCR se realiza en presencia de una sonda que comprende la secuencia identificada como SEQ ID NO: 3 o una variante funcional de la misma, o su cadena complementaria.

Una sonda de qPCR está constituida por una secuencia de nucleótidos que contiene un grupo fluoróforo en uno de sus extremos y un agente bloqueador en el otro extremo. La llegada de la enzima polimerasa liberará la sonda y separará el agente bloqueador, de forma que cada ciclo de amplificación resulta en la emisión de fluorescencia. Otra realización de la invención es una qPCR realizada en presencia de la sonda SEQ ID NO: 3 o su cadena complementaria, llevando un grupo fluoróforo y un agente bloqueador.

Para el desarrollo del ensayo de qPCR para PAdV, se analizaron los parámetros necesarios para la evaluación de la eficiencia del ensayo. Entre ellos, se ajustaron las concentraciones óptimas de cebadores y sonda para obtener valores aceptables para el coeficiente de correlación, Ct, y la pendiente de la recta de regresión del estándar. La qPCR a tiempo real requiere la comparación automática de la fluorescencia emitida con valores estándar en cada momento. Por lo tanto, otra realización de la invención es la evaluación de la cantidad de virus incluyendo una comparación de la cuantificación del resultado de la reacción en cadena de la polimerasa con al menos una muestra control. En una realización particular de la invención, la muestra control comprende un control positivo tomado de al menos una curva estándar generada por la implicación de la reacción en cadena de la polimerasa en la presencia de los cebadores correspondientes a SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, o sus cadenas complementarias, en una secuencia de 612 pb del gen del hexon de PAdV3 a diferentes concentraciones.

Una reacción en cadena de la polimerasa para la detección de PAdV en muestras en la presencia de los cebadores descritos puede estar comprendida en una reacción en cadena de la polimerasa anidada. También, podría ser posible para la detección de PAdV una PCR semi-anidada usando un set de cebadores incluyendo SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 como primer cebador, y SEQ ID NO: 3 como el otro cebador. De acuerdo con esto, otra realización de la

invención comprende la reacción en cadena de la polimerasa siendo una reacción en cadena de la polimerasa en la presencia de uno de los cebadores identificado como SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o una variante funcional de los mismos, y de la secuencia SEQ ID NO: 3 o una variante funcional de la misma, o sus cadenas complementarias.

5 Está previsto que los oligonucleótidos descritos puedan estar sujetos a modificaciones sin desviarse de la invención aquí proporcionada. Está previsto que se incluyan en la presente invención fragmentos y/o variantes funcionales de los oligonucleótidos aquí proporcionados. Se contempla que fragmentos y/o variantes funcionales de los cebadores y/o la sonda descritos aquí pueden ser usados de acuerdo con las metodologías aquí propuestas para alcanzar los objetivos de la presente invención. Por ejemplo, se incluye en la presente invención un fragmento o una extensión o una variante funcional de un cebador o una sonda que retiene la misma función tal que pudiera ser empleada en la cuantificación de PAdV. Un fragmento puede incluir una secuencia que comprenda cualquier número de nucleótidos menor a los que encontrados en una secuencia del ácido nucleico de interés aquí proporcionada. Una extensión puede incluir una secuencia que comprenda cualquier número de nucleótidos superior a los encontrados en una secuencia del ácido nucleico de interés aquí proporcionada. La especificidad de un oligonucleótido se refiere a la capacidad del producto, es decir de un cebador o una sonda, para hibridar con la región o secuencia diana bajo condiciones adecuadas para llevar a cabo una reacción en cadena de la polimerasa. La variante funcional de cualquiera de los cebadores o la sonda aquí proporcionados se refiere a la capacidad del oligonucleótido para hibridar con la región o secuencia diana bajo condiciones adecuadas para llevar a cabo una reacción en cadena de la polimerasa. Está completamente contemplado que las herramientas y metodologías para la detección de ácidos nucleicos puedan ser adaptadas para el uso de acuerdo con todas las muestras biológicas descritas.

10 El método de la invención es capaz de detectar virus en un amplio espectro de muestras. El estudio de PAdV no patógenos como método para la trazabilidad de fuentes de contaminación fecal humana y animal en muestras medioambientales debería proporcionar datos para la mejora de la manipulación y el control de la calidad del agua. Una realización de la invención aplica el método en una muestra medioambiental. Otra realización de la invención aplica el método en muestras de agua, y en una realización más particular, la muestra de agua es una muestra de agua residual. Se consideran incluidas como muestras de agua residual, agua residual urbana y de granja. En otra realización de la invención la muestra sospechosa de contener PAdV es una muestra de residuos de matadero, que incluye muestras de agua y lodos. El método también se aplica en muestras fecales. La invención es, además, de amplia aplicación en el sector industrial. Otra realización aplica el método de la invención a muestras de alimentos. La invención es también aplicable para la detección de la presencia de virus en artículos comerciales, tales como biosólidos derivados de la industria del compostaje. Otra realización particular de la invención es la aplicación del método en muestras de fertilizantes.

15 Otro aspecto de la presente invención se refiere a los oligonucleótidos identificados por una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, o sus cadenas complementarias. Otro aspecto se refiere al uso de los oligonucleótidos identificados como SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o sus cadenas complementarias como cebadores específicos para el genoma de PAdV, y del oligonucleótido identificado como SEQ ID NO: 3 o su cadena complementaria como sonda específica para la secuencia del genoma de PAdV. Se prefiere como cebador directo un cebador que comprenda SEQ ID NO: 1 o una variante funcional del mismo y como cebador inverso uno que comprenda SEQ ID NO: 2 o una variante funcional del mismo.

20 Otro aspecto de la invención se relaciona con el uso de los cebadores y de la sonda descritos arriba, o una variante funcional de los mismos, para la detección de PAdV usando la reacción en cadena de la polimerasa. En una realización preferida, esta reacción en cadena de la polimerasa es la qPCR.

25 Otro aspecto de la invención se refiere a un kit para realizar el método de la invención que comprende reactivos adecuados para la detección y/o cuantificación de PAdV en una muestra, y una realización particular de la invención es que este kit incluya al menos uno de los cebadores identificados como SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 y/o la sonda identificada como SEQ ID NO: 3, o sus cadenas complementarias.

30 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

55 **Breve descripción de los dibujos**

60 La Fig. 1 muestra los gráficos de amplificación obtenidos con diluciones seriadas 1:10 del ADN viral clonado de PAdV. Los gráficos de amplificación muestran el log de dRn (señal de fluorescencia reportada) en relación con el número de ciclos.

65 La Fig. 2 muestra la curva estándar obtenida con diluciones seriadas 1:10 del ADN viral clonado de PAdV. El log de la cantidad inicial de DNA viral se representa respecto al ciclo umbral (valores Ct), calculado como el número ciclo fraccional en el que un incremento significativo de Rn excede un determinado umbral (línea horizontal).

70 La Fig. 3 muestra la evaluación de la inhibición del ensayo de qPCR para PAdV en muestras medioambientales de acuerdo con el método de extracción de AN usado. La figura muestra los niveles de PAdV añadidos previamente a las extracciones de AN obtenidos con el kit de extracción de ácidos nucleicos NucliSens® de Biomérieux (Bx) y el

método previamente descrito por Boom *et al.* (B), como detectados en las diluciones 1:10 (en gris), 1:100 (en blanco) y no diluida (en negro). Se estudiaron tres tipos diferentes de muestras medioambientales: aguas residuales de matadero (SW), agua residual urbana (US), y lodos porcinos (S).

5 La Fig. 4 muestra los resultados obtenidos en los ensayos de qPCR para HAdV y PAdV.

Ejemplos

10 Obtención de muestras

Se aplicó el procedimiento de qPCR a la cuantificación de adenovirus porcinos en: 38 muestras de heces agrupadas de 18 granjas de cerdos de diversas áreas en el País Vasco (norte de España, Costa del Cantábrico) y Cataluña (noreste de España, costa mediterránea); 8 muestras de agua residual procedente de un matadero que procesa cerdos en Cataluña; 6 muestras de agua de río obtenidas por debajo de una importante área granjera; y 9 muestras de agua residual urbana de Cataluña, que fueron analizadas también para la presencia de HAdV.

Se recogieron treinta y ocho muestras fecales agrupadas de cerdo en diferentes periodos en dieciocho granjas localizadas en dos regiones diferentes en España: Cataluña (9 granjas) y el País Vasco (9 granjas). Las muestras se recogieron de animales de engorde y de cría, y se agruparon de acuerdo con la edad y el objetivo comercial de los individuos. Se concentraron los virus mediante un procedimiento basado en elución y ultracentrifugación de los virus (cfr. Maluquer de Motes *et al.*, *supra Appl. Environ. Microbiol.* 2004). Brevemente, 1 g de cada grupo fue eluido en 3.5 ml de tampón glicina 0.25 N (pH 9.5), mantenido en hielo durante 30 min y luego centrifugado (9,200 x g durante 15 min). Finalmente, se concentró el sobrenadante por ultracentrifugación (110,000 x g durante 1 h a 4°C) y las partículas víricas fueron resuspendidas en 100 µl de PBS y almacenadas a -80°C.

Se recogieron nueve muestras de agua residual urbana en la entrada de una planta de tratamiento de agua residual localizada en Sant Adrià del Besos, (Barcelona, Cataluña), que procesa 670,000 m³ de agua residual al día procedente de una población equivalente aproximadamente a 1.8 millones de habitantes de una área urbana sin ninguna actividad granjera o agrícola. Todas las muestras fueron recogidas en containers estériles de polietileno de 500 ml y mantenidas a 4°C hasta 8 h antes de su análisis y los virus fueron concentrados a partir de alícuotas de 40 ml (cfr. Puig *et al.*, *supra Appl. Environ. Microbiol.* 1994). Brevemente, se ultracentrifugaron 40 ml de agua residual (110,000 x g durante 1 h a 4°C) para sedimentar todas las partículas víricas junto con material en suspensión. Se eluyó el sedimento con 4 ml de tampón glicina 0.25 N (pH 9.5), y los sólidos suspendidos se separaron por centrifugación a 12,000 x g durante 15 min. Los virus se concentraron finalmente por ultracentrifugación (110,000 x g durante 1 h a 4°C), resuspendidos en 100 µl de PBS, y almacenados a -80°C.

Se recogieron ocho muestras de agua residual de un matadero que procesa bovino y en mayor número, porcino de 5 y 6 meses de edad. Se recogieron las muestras en containers estériles de polietileno de 500 ml y se mantuvieron a 4°C hasta 8 h antes de su análisis. Se concentraron los virus de las muestras siguiendo el mismo procedimiento descrito para agua residual urbana.

Se recogieron seis muestras de agua del río Ter por debajo de una importante zona de granjas porcinas en Cataluña con diferentes pueblos que descargan en el río los efluentes resultantes del tratamiento de aguas residuales. Las muestras de agua se recogieron en un periodo de 4 meses, las muestras se concentraron en el punto de recogida y los filtros con los concentrados se mantuvieron a 4°C hasta 8 horas antes de su análisis.

El protocolo usado para el procesamiento de las muestras de río fue una combinación del método EPA (EPA 600/4-84/013 (N14)), con modificaciones menores, y el método basado en ultracentrifugación y elución en tampón glicina 0.25 N (pH 9.5) (cfr. Albinana-Gimenez *et al.*, "Distribution of polyomaviruses, adenoviruses and hepatitis E virus in the environmental and in a Drinking-Water treatment plant" *Environ. Sci. Techno.* 2006, vol. 40, pp. 7416-22). Se filtraron cien litros de agua de río a través de filtros electropositivos Zeta Plus MK a 1 l/min usando una bomba peristáltica Millipore. Se eluyeron los virus retenidos en 900 ml de tampón glicina 0.25 N (pH 9.5) y extracto de carne 1% (Becton, Dickinson & Co., Sparks MD, USA) mediante flujo reverso usando una bomba peristáltica Millipore a 0.4 l/min durante 45 min. Para la floculación se añadió extracto de carne al 3%, se ajustó el pH a 3.5 usando HCl 5M y se agitó magnéticamente la suspensión resultante durante 30 min, finalmente se centrifugó a 12,800 x g durante 25 min a 4°C. Tras este paso, la muestra se trató usando el protocolo previamente aplicado para la recuperación de virus a partir de agua residual urbana.

60 Diseño del set de cebadores/sonda para el ensayo de qPCR para PAdV

El procedimiento de qPCR se basa en un ensayo TaqMan y usa dos cebadores y una sonda fluorogénica que reconoce un fragmento de 68 bp en el gen del hexon del genoma de PAdV. Los cebadores y la sonda fueron diseñados específicamente para la amplificación de PAdV. Se alinearon secuencias de PAdV DNA del GenBank usando el programa ClustalW (European Bioinformatics Institute, UK) y se seleccionó un fragmento conservado de 68 bp mediante el software Primer Express (Applied Biosystems). La homología de todos los oligonucleótidos fue finalmente verificada usando Blast Search. Se marcó la sonda con FAM (6-carboxifluoresceína) como grupo fluoróforo en el extremo 5' y BHQ-1 (Black-Hole Quencher 1) como agente bloqueador en el extremo 3'. La secuencia del cebador directo se

ES 2 344 443 A1

corresponde con SEQ ID NO: 1, la secuencia del cebador inverso corresponde a SEQ ID NO: 2, y la secuencia de la sonda, a SEQ ID NO: 3. Su localización en el genoma usando como referencia la cepa PAdV serotipo 3 (número de acceso AJ237815 GenBank) es como sigue:

5 Cebador directo Q-PAdV-F: entre el par de bases (pb) 20701 y 20718.

Cebador inverso Q-PAdV-R: entre pb 20768 y 20751.

Sonda Q-PAdV-P: entre pb 20722 y 20737.

10

Construcción de los estándares de qPCR para PAdV

15 Se generaron curvas estándar mediante transformación de células *E. coli* JM109 (Promega) con el plásmido pGEM-T Easy (Promega) que contenía una secuencia de 612 pb del hexon de PAdV-3. La transformación se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Las colonias llevando el plásmido deseado se analizaron por PCR para obtener el DNA diana, que fue obtenido con el kit QIAGEN Plasmid Midi kit (QIAGEN, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez obtenidos y analizados por Genequant Pro (Amersham Biosciences), de acuerdo con el peso molecular del plásmido, se linearizó 10 μ g de DNA con EcoRI, purificado con el QUIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Inc.) y posteriormente cuantificado de nuevo, antes de obtener diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^9 moléculas de DNA viral por 10 μ l en tampón TE. Las diluciones del estándar se separaron en alícuotas y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

25 *Extracción de ácidos nucleicos*

Los ácidos nucleicos (AN) de los concentrados virales se extrajeron usando un procedimiento basado en el método Boom et al. (1990) que usa isotiocianato de guanidino para desnaturalizar las cápsides víricas y partículas de sílice para unir los ácidos nucleicos hasta su elución final en tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4) y posterior almacenamiento a -80°C . También se usó, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, el kit de extracción de ácidos nucleicos NucliSens[®] (Biomérieux), basado en los mismos principios y que contiene bolas magnéticas cubiertas de sílice.

35 *Ensayo de qPCR para PAdV*

Para todos los experimentos la mezcla de PCR se preparó y se dispensó en un área de trabajo dedicada la preparación de reactivos de PCR; las muestras se cargaron en un laboratorio pre-PCR y, finalmente, la placa se transfirió a un laboratorio separado para la adición de los estándares de qPCR. Las amplificaciones se realizaron en una mezcla de reacción de 25- μ l que contenía 10 μ l de DNA y 15 μ l de TaqMan[®] Universal PCR Master Mix, 0.9 μ M de cada cebador (Q-PAdV-F y Q-PAdV-R) y 0.225 μ M de sonda fluorogénica (Q-PAdV-P). La TaqMan[®] Universal PCR Master Mix se suministra en una concentración 2x y contiene AmpliTaq Gold[®] DNA polymerase, dNTPs con dUTP, referencia pasiva, componentes tamponadores optimizados y AmpErase[®] uracil-N-Glicosilasa. Tras la activación de la uracil-N-Glicosilasa (2 min, 50°C) y la activación de la AmpliTaq Gold durante 10 min a 95°C , se realizaron 45 ciclos (15 s a 95°C , 20 s a 55°C y 20 s a 60°C) en un sistema de detección MX3000P (Stratagene).

Se analizaron dos diluciones 1:10 (1:10 y 1:100) del DNA extraído en duplicado (4 análisis/muestra) para el análisis de muestras medioambientales, mientras que se analizaron diluciones seriadas 1:10 del estándar de qPCR por triplicado cuando se cuantificaron copias del genoma viral (ge). En todas las qPCR llevadas a cabo la cantidad de DNA se definió como media de los datos obtenidos. Se añadió en cada ensayo un control sin molde. La inhibición enzimática de las muestras se analizó por análisis de diversas diluciones de las muestras así como por adición de cantidades conocidas de DNA diana a las muestras medioambientales.

55 *Ensayo de nPCR para PAdV*

Se realizaron ensayos de PCR anidada para la amplificación de PAdV. Se analizaron 10 μ L de ácidos nucleicos extraídos y su dilución 1:10 en una mezcla de reacción de 40 μ L que contenía 1xPCR Buffer, MgCl_2 a 1.5 mM, 0.025 mM de cada dNTP, 25 pmol de cebadores y 2 unidades de Taq DNA polymerase (Bioron GmbH, Germany). Las condiciones de reacción fueron: 94°C durante 4 min, 30 ciclos de 92°C durante 60 s, 60 s a la temperatura de hibridación correspondiente y extensión a 72°C durante 75 s. Se completó la amplificación con 7 min de extensión a 72°C . Tras la primera PCR, se añadió 1 μ L del producto de la primera PCR a 49 μ L de mezcla de nPCR que contenía los mismos componentes que la mezcla de la primera PCR pero con 0.16 mM de cada cebador anidado. Se llevó a cabo una segunda amplificación de 30 ciclos idéntica a la anterior.

65

Secuenciación de PAdV

Los amplicones obtenidos tras nPCR se purificaron mediante QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Inc.). El DNA purificado se secuenció directamente con el ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit versión 3.1 con Ampli Taq® DNA polymerase FS (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las condiciones para los 25 ciclos de secuenciación fueron: desnaturalización a 96°C durante 10 s, hibridación durante 5 s a 50°C y extensión a 60°C durante 4 min. Los cebadores anidados se usaron para la secuenciación a concentración de 0.05 μM. Los resultados se analizaron usando el secuenciador automático ABI PRISM 377 (Perkin-Elmer, Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas se compararon con las del GenBank y EMBL (European Molecular Biology Library) usando el programa básico BLAST del NCBI (The National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Los alineamientos de las secuencias se llevaron a cabo por medio del programa ClustalW del EBI (European Bioinformatics Institute of the EMBL, <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

15 *Ensayo de qPCR para HAdV*

La cuantificación de HAdV en las muestras se llevó a cabo mediante un protocolo basado en TaqMan®, usando el cebador directo SEQ ID NO: 4, el cebador inverso SEQ ID NO: 5 y la sonda SEQ ID NO: 6, en donde “w” puede ser “a” o “t”, “k” puede ser “g” o “t”, “s” puede ser “g” o “c”, “r” puede ser “a” o “g”, y “y” puede ser “c” o “t”. Este ensayo detecta los 51 serotipos descritos de adenovirus humanos. Las cuantificaciones se realizaron en una mezcla de reacción de 25-μl que contenía 10 μl de DNA y 15 μl de TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) que contenía 0.9 μM de cada cebador y 0.225 μM de sonda fluorogénica. Se usó un plásmido pBR322 que contenía la secuencia del hexon de HAdV41 para construir el estándar de 10¹ a 10⁷ copias de DNA por 10 μl añadidos a la reacción de PCR. Cada dilución del estándar de DNA se analizó por triplicado.

Tras la activación de la uracil-N-Glicosilasa (2 min, 50°C) y activación de la AmpliTaq Gold durante 10 min a 95°C, se realizaron 45 ciclos (15 s a 95°C y 1 min a 60°C) en un sistema de detección MX3000P (Stratagene). Se analizaron dos diluciones 1:10 (1:10 y 1:100) del DNA extraído en duplicado (4 análisis/muestra) para el análisis de muestras medioambientales, mientras que se analizaron diluciones seriadas 1:10 del estándar de qPCR por triplicado cuando se cuantificaron copias del genoma viral (ge). En todos los qPCR llevadas a cabo la cantidad de DNA se definió como media de los datos obtenidos. Se añadió un control sin molde en cada ensayo.

35 *Muestras de control positivo*

Cuando el ensayo fue llevado a cabo, ninguna cepa de PAdV estaba disponible para uso como control positivo. Consecuentemente, se optimizaron los ensayos usando el fragmento obtenido tanto de muestras medioambientales como heces porcinas que había dado amplificación positiva por PCR anidada y que había sido posteriormente secuenciado y usado en análisis filogenéticos. Se clonó en un vector pGEM-T Easy un fragmento de 612 bp correspondiente a un fragmento interno del gen que codifica para el hexon que fue usado como control de validación para los experimentos de nPCR y como estándar en los ensayos cuantitativos de qPCR.

45 *Diseño de cebadores/sonda y optimización del ensayo de qPCR*

Para optimizar la especificidad y sensibilidad, se diseñó un set de cebadores/sonda que amplificaba un amplicón pequeño. La concentración de los cebadores y la sonda se optimizó mediante el análisis de concentraciones de cebadores que oscilaban entre 0.4 y 0.9 μM y de sonda, entre 0.225 y 0.9 μM, para cada reacción. Las temperaturas de hibridación se optimizaron también.

Usando las condiciones descritas para la qPCR, el ensayo identificó entre 1 y 10 moléculas de DNA viral (estándar de PAdV) como límite de detección por tubo de reacción. Un ensayo representativo de los llevados a cabo se muestra en la Fig. 1. En todos los ensayos el valor medio de R-cuadrado fue 0.996±0.003, los valores de pendiente oscilaron entre -3.461 y -3.492 (valor medio -3.481), y la eficiencia estimada de ellos fue del 94.5%.

60 *Especificidad del ensayo*

La especificidad de los oligonucleótidos se verificó usando la herramienta Blast Search. Además, el set de cebadores/sonda fue ensayado con muestras de suero o cultivo celular de diversas especies de HAdV. Se analizaron los serotipos 2, 5, 7, 35, 40 y 42 en concentraciones que oscilaban entre 10² y 10⁸ partículas víricas/ml y no se detectó señal fluorogénica. De la misma manera, se analizaron muestras fecales bovinas en las que se habían detectado BAdV y que contenían los serotipos 4 y 7 y cepas con 82% de homología con el BAdV 2 en concentraciones que oscilaban entre 10¹ y 10⁴ gc/g de heces. No se detectaron falsos positivos causados por reacciones cruzadas entre DNA de los virus que infectaban los diversos huéspedes estudiados.

Sensibilidad del ensayo

El ensayo fue capaz de detectar de 1 a 10 copias genómicas por tubo de reacción. De acuerdo con los volúmenes iniciales de agua y las cantidades de materia fecal analizada, las cuantificaciones correspondían a 4.2 ml de agua residual, 1 l de agua del río Ter, y 0.1 g de heces. La sensibilidad fue estable incluso cuando se añadían grandes cantidades de DNA vírico heterólogo pero relacionado a los tubos de reacción: la adición de 10^8 copias de HAdV tipo 40 no afectó la detección del DNA de PAdV.

Cuando se analizaron muestras medioambientales, se asumió la presencia de sustancias inhibitorias de PCR en las reacciones puesto que la mayoría de muestras no diluidas no mostró señal fluorogénica. Para proporcionar una preparación de ácidos nucleicos limpia, se compararon el Nucleospin[®] NA extraction kit y el método casero de extracción de ácidos nucleicos basado en partículas de sílice y isotiocianato de guanidino mediante el análisis de lodos porcinos y aguas residuales urbanas y de matadero en las que se habían añadido cantidades conocidas de DNA viral (PAdV estándar). Cuando se usó el método casero de extracción, no se identificó DNA de PAdV en la muestra no diluida y las cantidades añadidas de DNA se detectaron tan solo en las diluciones 1:10 e incluso 1:100. (Fig. 2). Contrariamente, el kit Nucleospin[®] detectó cantidades mayores de DNA en la muestra no diluida de lodos porcinos y de agua residual de matadero y en la dilución 1:10 de agua residual urbana.

Las muestras analizadas por qPCR se analizaron también por nPCR y los resultados confirmaron que la especificidad y la sensibilidad de ambas técnicas eran equivalentes.

PAdV en heces porcinas

Los datos cuantitativos de PAdV obtenidos de heces porcinas y muestras medioambientales se muestran en la Tabla 2. Diecisiete de las veintiuna muestras agrupadas de heces porcinas recogidas en el País Vasco fueron positivas por qPCR. No se observaron diferencias significativas entre animales de engorde y de cría o en función de la edad de los animales. Se detectó PAdV en muestras fecales porcinas en altas concentraciones y alta prevalencia: 76.4% muestras agrupadas positivas, concentración media de 5.58×10^5 gc/g. Los resultados observados se confirmaron aplicando nPCR. Se observaron discrepancias entre los 2 métodos en tan solo 2 muestras que mostraban bajas concentraciones de PAdV usando qPCR y que fueron negativas por nPCR. Sin embargo, estos resultados son esperables cuando se analizan muestras con bajas concentraciones de virus en repetidos experimentos. Se secuenciaron los amplicones de PAdV obtenidos por nPCR de una muestra positiva procedente de cada una de las 9 granjas estudiada. Las secuencias de nucleótidos observadas para todas las muestras presentaron una similitud al PAdV-3 que oscilaba entre el 93 y el 98%.

El ensayo de qPCR se usó también para cuantificar PAdV en diecisiete muestras agrupadas de heces porcinas recogidas en 9 granjas de Cataluña que habían sido analizadas previamente por nPCR así como secuenciadas mostrando una alta similitud con cepas de PAdV-3 (cfr. Maluquer de Motes *et al.*, *supra Appl. Environ. Microbiol.* 2004). Todas las muestras fueron también positivas por qPCR, mostrando una concentración media de PAdV de 7.25×10^5 gc/g, un valor equivalente a los resultados observados en muestras fecales recogidas en el País Vasco (5.58×10^5 gc/g).

PAdV en agua residual urbana

La planta de tratamiento de agua residual seleccionada para el estudio trata agua residual urbana procedente de una gran población y no se han descrito actividades agrícolas o granjeras en la zona. Consistentemente con ello, no se detectaron PAdV en las muestras analizadas mientras que se identificaron HAdV en todas las muestras con valores medios de 2.7×10^3 gc/ml.

PAdV en aguas de río

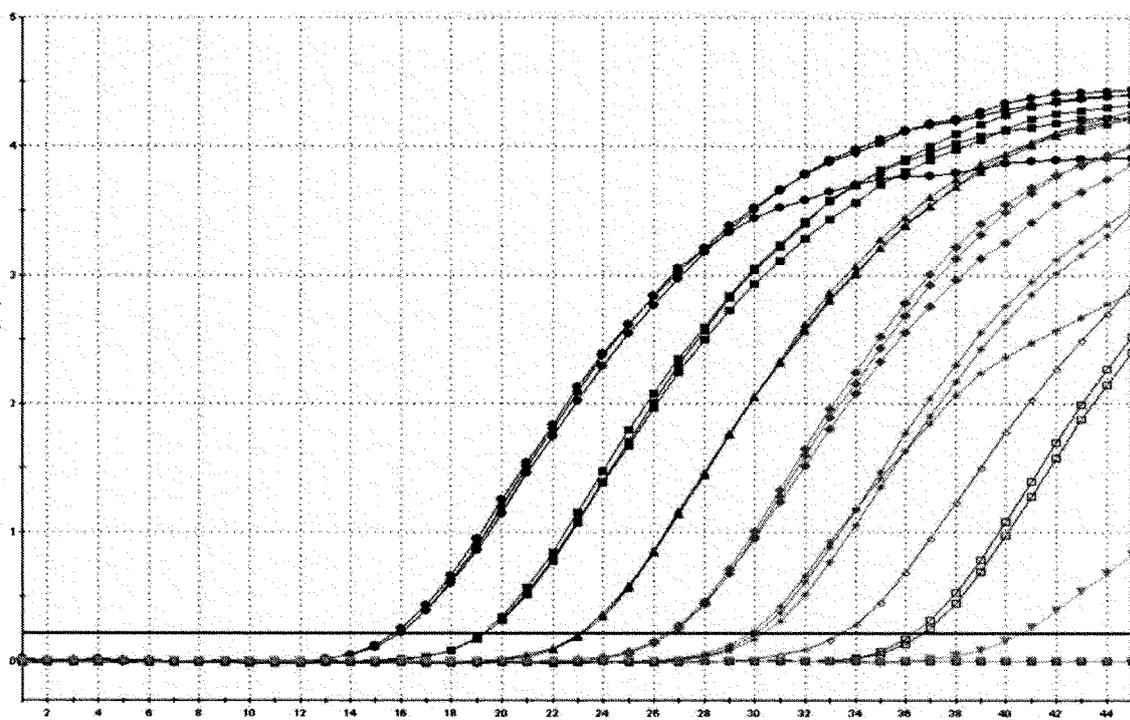
En todas las aguas del río Ter existió contaminación fecal de origen humano y porcino, con mayores valores para HAdV (10^2 gc/l) que para PAdV, el cual estuvo presente en una concentración aproximada de 10^1 gc/l de agua.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la detección y/o cuantificación de adenovirus porcinos (PAdV) en una muestra, dicho método comprendiendo:
- a) la extracción del ácido nucleico de PAdV de la muestra;
 - 10 b) la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa del ácido nucleico extraído en presencia de al menos un cebador seleccionado entre SEQ ID NO: 1 o una variante funcional del mismo, SEQ ID NO: 2 o una variante funcional del mismo, y SEQ ID NO: 3 o una variante funcional del mismo, o sus cadenas complementarias; y
 - 15 c) la detección y/o cuantificación de PAdV evaluando el resultado de la reacción en cadena de la polimerasa.
2. Método según la reivindicación 1, donde la reacción en cadena de la polimerasa es una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).
- 20 3. Método según la reivindicación 2, donde la qPCR es en presencia de una sonda específica para la secuencia del genoma de PAdV.
4. Método según la reivindicación 3, donde la sonda comprende la secuencia identificada como SEQ ID NO: 3 o una variante funcional de la misma, o su secuencia complementaria.
- 25 5. Método según la reivindicación 4, donde la SEQ ID NO: 3 o su cadena complementaria lleva un grupo fluoróforo y un agente bloqueador.
6. Método según la reivindicación 1, donde la evaluación comprende una comparación de la cuantificación del resultado de la reacción en cadena de polimerasa con al menos una muestra control.
- 30 7. Método según la reivindicación 6, donde la muestra control comprende un control positivo tomado de al menos una curva estándar generada por una reacción en cadena de la polimerasa en presencia de los cebadores correspondientes a SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, o sus secuencias complementarias, en una secuencia de 612 pb del gen del hexon de PAdV-3 a diferentes concentraciones.
- 35 8. Método según la reivindicación 1, donde la reacción en cadena de la polimerasa es una reacción en cadena de la polimerasa semi-anidada en presencia de uno de los cebadores identificados como SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o una variante funcional de los mismos, y de la secuencia SEQ ID NO: 3 o una variante funcional de la misma, o sus secuencias complementarias.
- 40 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la muestra es una muestra medioambiental.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la muestra es una muestra de agua.
- 45 11. Método según la reivindicación 10, donde la muestra es una muestra de agua residual.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la muestra es una muestra de residuos de matadero.
- 50 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la muestra es una muestra de alimentos.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la muestra una muestra de fertilizante.
- 55 15. Oligonucleótidos identificados por una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo consistente en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, y sus secuencias complementarias.
16. Uso de los oligonucleótidos identificados como SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o sus secuencias complementarias como cebadores específicos para el genoma de PAdV, y del oligonucleótido identificado como SEQ ID NO: 3 o su secuencia complementaria como sonda específica para la secuencia del genoma de PAdV.
- 60 17. Uso de los cebadores y la sonda según la reivindicación 16, o una variante funcional de los mismos, para la detección de PAdV usando la reacción en cadena de la polimerasa.
- 65 18. Kit para la realización del método definido en la reivindicación 1, que comprende al menos uno de los cebadores identificados como SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 y/o la sonda identificada como SEQ ID NO: 3, o sus secuencias complementarias.

FIG. 1

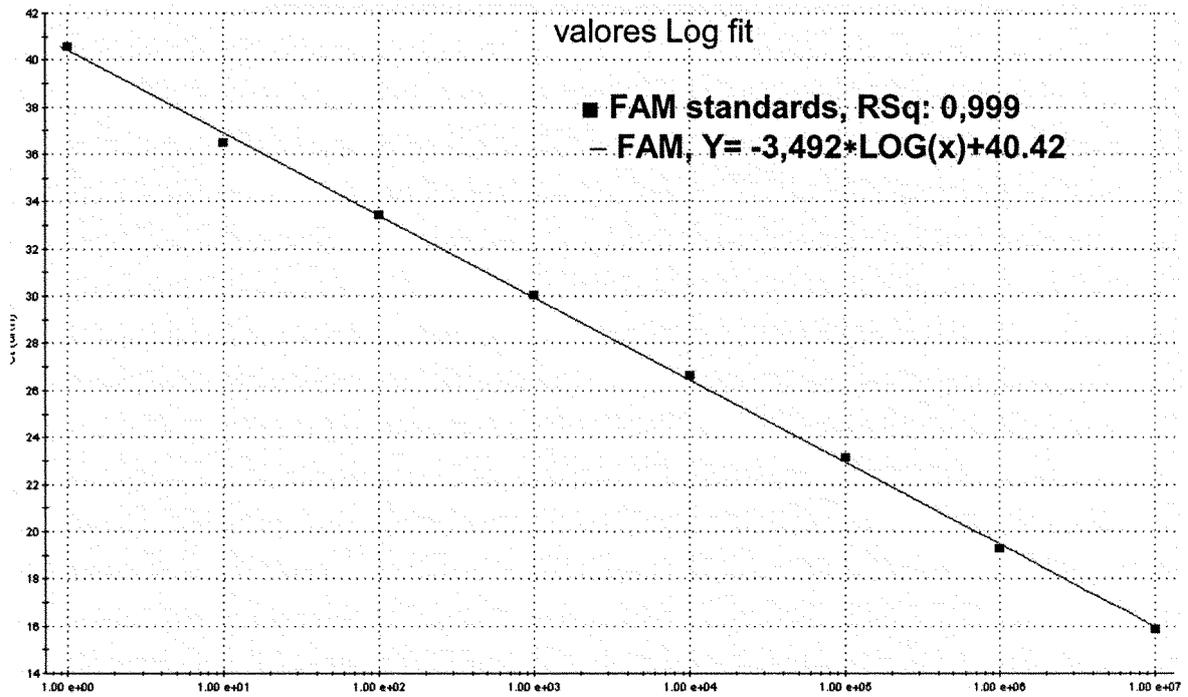
Fluorescencia (dRn)



Ciclos

FIG. 2

Ciclo umbral (Ct)



Cantidad inicial (copias)

FIG. 3

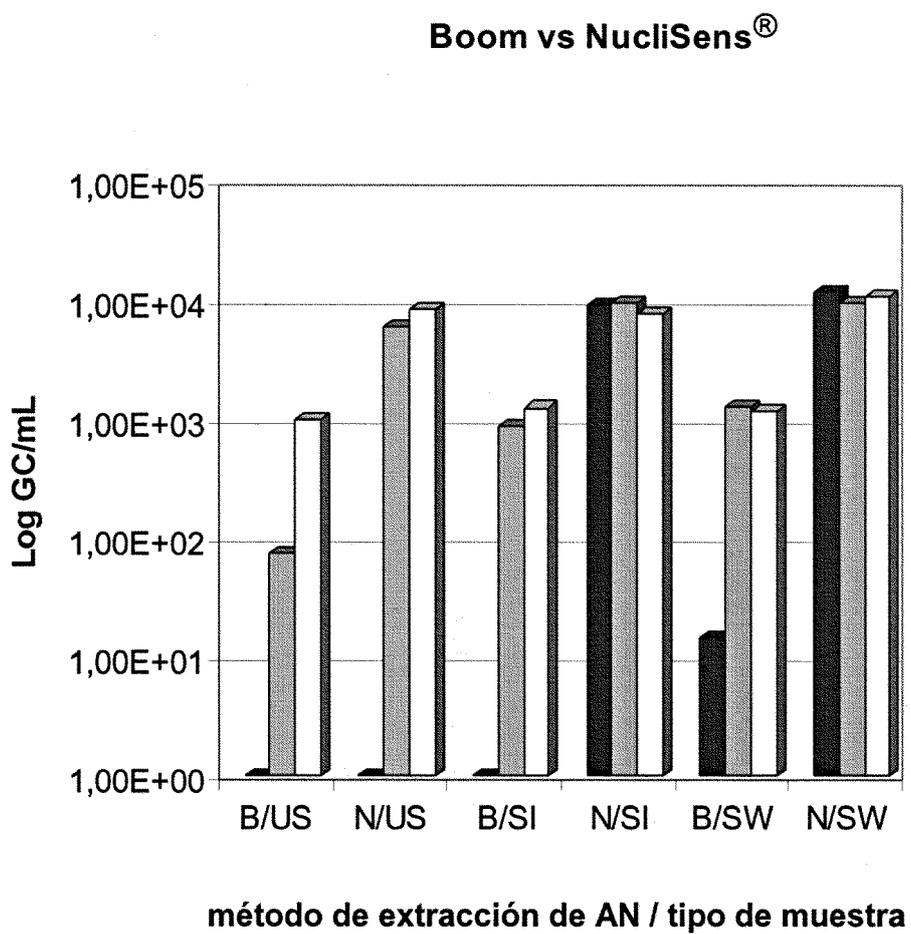


FIG. 4

Tipo de muestra	Localización	No. de muestras	concentración de HAdV y PAdV en las muestras analizadas			
			HAdV	PAdV	% Positivo	Promedio
Heces porcinas agrupadas (gc/g)	Cataluña	17	NT	NT	100*	7.25x10 ⁵
Heces porcinas agrupadas (gc/g)	País Vasco	21	NT	NT	76.4	5.58x10 ⁵
Agua residual de matadero (gc/ml)	Cataluña	8	0	0	100	1.56x10 ³
Agua del río Ter (gc/l)	Cataluña	6	100	4.45x10 ²	100	8.3810 ⁰
Agua residual urbana (S. Adriá) (gc/ml)	Cataluña	9	100	2.74x10 ³	0	0

* Las muestras de heces porcinas analizadas en Cataluña fueron seleccionadas a partir de muestras previamente identificadas como positivas por PCR anidada

ES 2 344 443 A1

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Universidad de Barcelona	
5	<120> Secuencias genómicas de cebadores y sonda para la cuantificación de adenovirus porcinos (PAdV)	
	<130> AVCRI0 66	
10	<160> 6	
	<170> PatentIn versión 3.5	
15	<210> 1	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> cebador	
25	<400> 1	
	aacggccgct actgcaag	18
30	<210> 2	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> cebador	
40	<400> 2	
	agcagcaggc tcttgagg	18
45	<210> 3	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
50	<223> sonda	
	<400> 3	
55	cacatccagg tgccgc	16
	<210> 4	
	<211> 19	
60	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
65	<223> cebador	

ES 2 344 443 A1

<400> 4

cwtacatgca catckcsgg

19

5

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

10 <213> Artificial

<220>

<223> cebador

15 <400> 5

crcgggcraa ytgaccag

19

20 <210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

25

<220>

<223> sonda

30 <400> 6

ccgggctcag gtactccgag gcgtcct

27

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 344 443

② Nº de solicitud: 200900596

③ Fecha de presentación de la solicitud: 25.02.2009

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	HUNDESA A., et al. "Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment." Applied and Environmental Microbiology (2006) Vol. 72, páginas 7889-7893. Resumen, páginas 7887-7888 y tabla 1.	1-18
A	MALUQUER DE MOTES C., et al. "Detection of bovine and porcine adenoviruses for tracing the source of fecal contamination." Applied and Environmental Microbiology. (2004) Vol. 70, páginas 1448-1454. Resumen, páginas 1448-1449 y tabla 1.	1-18
A	MARTELLINI A., et al. "Use of eukaryotic mitochondrial DNA to differentiate human, bovine, porcine and ovine sources in fecally contaminated surface water." Water Research (2005) páginas 541-548. Resumen, páginas 543-544 y tabla 1.	1-18

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

19.07.2010

Examinador

M. Jesús García Bueno

Página

1/5

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

C12Q, C12N

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

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

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 19.07.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-18	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-18	SÍ
	Reivindicaciones	NO

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

Base de la Opinión:

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

1. Documentos considerados:

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	HUNDESA A., et al. "Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment." <i>Applied and Environmental Microbiology</i> (2006) Vol. 72, pages 7889-7893.	2006
D02	MALUQUER DE MOTES C., et al. "Detection of bovine and porcine adenoviruses for tracing the source of fecal contamination." <i>Applied and Environmental Microbiology</i> . (2004) Vol. 70, pages 1448-1454.	2004
D03	MARTELLINI A., et al. "Use of eukaryotic mitochondrial DNA to differentiate human, bovine, porcine and ovine sources in fecally contaminated surface water." <i>Water Research</i> (2005) páginas 541-548.	2005

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

La presente solicitud de invención consiste en un método para la detección y/o cuantificación de adenovirus porcinos (PAdVs) en una muestra medioambiental, de agua o alimentos, que comprende la extracción del ácido nucleico de la muestra, la amplificación mediante PCR en tiempo real (qPCR) o PCR anidada (nPCR) en presencia de al menos un cebador seleccionado entre la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, y la detección y/o cuantificación de PAdVs mediante fluorescencia, donde la sonda comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 3, con un grupo fluoróforo y un agente bloqueador (reivindicaciones 1-14).

La presente solicitud de invención también reivindica los oligonucleótidos identificados como SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 (reivindicación 15), sus usos como cebadores y sondas en la PCR (reivindicaciones 16-17), y el kit para la realización del método anteriormente mencionado (reivindicaciones 18).

El documento D01 divulga análisis moleculares basados en PCR que detectan adenovirus humanos (HAdV) y adenovirus porcinos (PAdV), adenovirus bovinos (BAdV), y poliomavirus bovinos (BPyV), en muestras ambientales incluyendo las aguas residuales, matadero y muestras de agua urbanas y de río (ver resumen).

La detección de HAdVs mediante una prueba específica del PCR anidada también se ha propuesto como índice molecular de la contaminación viral humana en el ambiente y también se han diseñado para la detección de adenovirus porcinos (PAdV) y de adenovirus bovinos (BAdV), en análisis de las muestras urbanas de aguas fecales residuales humanas y del animal, y se consideran indicadores ambientales para detectar fuentes porcinas y bovinas de contaminación viral (ver páginas 7887-7888 y tabla 1).

El documento D02 divulga un procedimiento molecular para la detección de adenovirus de origen animal que evalúa el nivel de excreción de estos virus por cerdos y ganado. Dos conjuntos de oligonucleótidos son diseñados, uno para detectar adenovirus porcinos y el otro para detectar adenovirus bovinos y ovinos. La especificidad de los análisis fue evaluada en 31 muestras fecales y 12 muestras de las aguas residuales que fueron recogidas mensualmente durante un período de 1 año. Los datos también proporcionaron información en el predominio ambiental de los adenovirus animales (ver resumen).

En el actual estudio de PCR anidada, dos sistemas de oligonucleótidos fueron diseñados, uno para la detección específica de adenovirus bovinos y de adenovirus ovinos, y el otro para la detección específica de adenovirus porcinos, para evaluar el nivel de excreción de adenovirus por los animales de granja y para diseñar una prueba para localizar la fuente específica de contaminación viral en el ambiente (ver página 1448-1449 y tabla 1).

El documento D03 divulga un método molecular basado en la detección de DNA mitocondrial de diversas especies animales, desarrollado para seguir el origen de las contaminaciones de agua superficial, y para diferenciar entre fuentes humanas y animales.

Hoja adicional

Las secuencias mitocondriales de la DNA fueron utilizadas para diseñar cebadores para el análisis mediante PCR anidada, entre otros, de DNA humano, bovino, ovino y porcino. Los cebadores fueron utilizados con DNA extraído de aguas residuales domésticas sin tratar, muestras agrícolas, efluentes de granjas de cerdos y muestras de agua de ríos (ver resumen, páginas 543-544 y tabla 1).

1.- NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6 y 8 LP).

El objeto técnico de la presente solicitud es un método para la detección y/o cuantificación de adenovirus porcinos (PAdVs) mediante PCR en tiempo real (qPCR) o PCR anidada (nPCR) en presencia de al menos un cebador seleccionado entre la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, y la detección y/o cuantificación de PAdVs mediante fluorescencia, donde la sonda comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 3, con un grupo fluoróforo y un agente bloqueador; así como los cebadores y sondas mencionadas anteriormente, y el kit para la realización de dicho método.

1.1.- REIVINDICACIONES 1-18.

El método para la detección y/o cuantificación de adenovirus porcinos (PAdVs) mediante PCR en tiempo real (qPCR) o PCR anidada (nPCR) es conocido en el Estado de la Técnica, encontrándose en numerosos documentos. La detección de este adenovirus por técnicas de PCR, empleando cebadores y sondas específicos es anticipada en los documentos D01-D03, sin embargo estos cebadores y/o sondas no coinciden con los reivindicados.

Por tanto, las reivindicaciones 1-18 cumplen el requisito de novedad y actividad inventiva (Art. 6 y 8 LP).