



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 346 028**

② Número de solicitud: 200900347

⑤ Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C07K 14/23 (2006.01)

C07K 14/35 (2006.01)

C07K 7/00 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **28.01.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **07.10.2010**

⑬ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
07.10.2010

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Málaga**
Plaza de El Ejido, s/n
29071 Málaga, ES
Fundación Imabis

⑦ Inventor/es: **Queipo Ortuño, María Isabel;**
Colmenero Castillo, Juan de Dios y
Morata Losa, Pilar

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Conjunto de cebadores, sondas, procedimiento y kit para la detección y diferenciación de secuencias de ADN específicas de *Brucella* spp y *Mycobacterium tuberculosis* complex.**

⑤ Resumen:

Conjunto de cebadores, sondas, procedimiento y kit para la detección y diferenciación de secuencias de ADN específicas de *Brucella* spp y *Mycobacterium tuberculosis* complex.

La presente invención se refiere al diseño de un conjunto de cebadores, sondas, procedimiento y kit de diagnóstico molecular para diferenciar entre *Brucella* spp. y *Mycobacterium tuberculosis* complex; más concretamente para la detección de ADN específico de gérmenes del género *Brucella* y del género *Mycobacterium tuberculosis* en muestras clínicas no sanguíneas, que está basada en la amplificación simultánea de ADN de ambos géneros mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) Múltiple en Tiempo Real. La técnica desarrollada ha mostrado ser mucho más sensible que los métodos bacteriológicos, y más específica que los métodos serológicos habituales, permitiendo su utilización la puesta en práctica de un procedimiento fácil y rápido de diagnóstico molecular diferencial entre tuberculosis extrapulmonar y complicaciones focales producida por *Brucella* spp. en muestras clínicas.

ES 2 346 028 A1

DESCRIPCIÓN

Conjunto de cebadores, sondas, procedimiento y kit para la detección y diferenciación de secuencias de ADN específicas de *Brucella* spp y *Mycobacterium tuberculosis* complex.

Sector de la técnica

La presente invención se refiere a un conjunto de cebadores, sondas, procedimiento y kit de diagnóstico molecular para diferenciar entre *Brucella* spp. y *Mycobacterium tuberculosis* complex; más concretamente para la detección de ADN específico de gérmenes del género *Brucella* y del género *Mycobacterium tuberculosis* en muestras clínicas no sanguíneas, que está basada en la amplificación simultánea de ADN de ambos géneros mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) Múltiple en Tiempo Real (M-RT-PCR).

Estado de la técnica

La tuberculosis y la brucelosis son enfermedades que producen una alta morbilidad y continúan siendo un importante problema socio-sanitario en nuestro medio. La tuberculosis sigue siendo la infección más prevalente del planeta. Se estima que 2.000 millones de personas están infectadas por *Mycobacterium tuberculosis*. Este enorme reservorio genera unos 8 millones de nuevos casos de tuberculosis al año y 2 millones de muertes directamente atribuibles a la enfermedad (Castro KG., 1998, Emerg Infect Dis., 4: 408-9). La prevalencia de infección tuberculosa en nuestro país oscila entorno al 30-35% de la población, y la incidencia de enfermedad tuberculosa es de 37 casos/100.000 habitantes (Work Group of the MPTR. 2000, Med. Clin. (Barc) 114: 530-7). Las localizaciones extrapulmonares suponen entre el 20 y el 40% del total de casos de tuberculosis (Denis-Delpierre N y cols., 1998, Presse Med., 27: 341-346). Las localizaciones genitourinaria, meníngea y osteoarticular totalizan más del 50% de las formas extrapulmonares de la tuberculosis (Alvarez S. McCabe WR. 1984, Medicine (Baltimore), 63: 25-55). Dentro de la localización osteoarticular, la osteomielitis vertebral supone más del 45% de los casos (Davies PD y cols., 1984, Bone Joint Surg 66: 326-330).

El diagnóstico de las formas extrapulmonares de la tuberculosis puede ser: directo, mediante el aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis* en distintas muestras clínicas, o indirecto mediante la demostración de granulomas caseificantes en material histológico o detección de la presencia de BAAR, en el contexto de cuadro clínico compatible. El aislamiento del germen es la única prueba categórica de enfermedad tuberculosa. Sin embargo, la rentabilidad de los cultivos de micobacterias en las diferentes formas extrapulmonares de la tuberculosis es bajo, no superando el 70%. Por otra parte, excepto las tinciones en fluidos de cavidades estériles, todos los métodos convencionales de diagnóstico de la tuberculosis son lentos, oscilando entre 3 y 5 días en el caso de los métodos histológicos, a semanas en el caso de los cultivos de micobacterias (Pertuiset E y cols., 1999, Medicine (Baltimore), 78: 309-20).

La brucelosis es la zoonosis más extendida en el planeta, siendo endémica en la mayoría de los países de la cuenca Mediterránea, Oriente medio, África, Subcontinente Asiático y Latino-americano. A pesar del descenso de la enfermedad en los últimos años, la incidencia de brucelosis en España supera ampliamente la media de los países de nuestro entorno, y se estima que más de la mitad del territorio nacional padece unas tasas de incidencia superiores a 5 casos/100.000 habitantes, lo cual multiplica por 7 las cifras medias de los países de la Unión Europea. Sin embargo, esta incidencia infraestima de forma muy notable la magnitud del problema ya que la infradeclaración es un hecho bien conocido. Según opinión de expertos habría que multiplicar entre 3 y 5 veces las cifras oficialmente comunicadas para acercarse a la cifra real de casos. En 2003 se declararon en España 642 nuevos casos de brucelosis, lo que representa una incidencia de 1,6 casos/100.000 habitantes. Sin embargo la incidencia varía ampliamente de unas Comunidades y regiones a otras. Así, la incidencia en la Comunidad Autónoma de Andalucía es superior a la media nacional y dentro de nuestra Comunidad Autónoma, Málaga es una de las provincias más afectadas ya que su incidencia es muy superior a la media de la Comunidad Autónoma (Anónimo. 2004, Boletín Epidemiológico Semanal. Ministerio de Sanidad y Consumo. Centro Nacional de Epidemiología. España, Vol 12, nº 10).

La brucelosis se transmite por dos mecanismos claramente definidos: contagio directo, mediante contacto, inoculación o inhalación, o por vía indirecta, a través de la ingestión de productos lácteos sin higienizar. El contacto con materiales infectados (abortos, placentas, estiércol, etc.) es probablemente el mecanismo principal en profesionales expuestos. Sin embargo, la ingestión de leche o productos lácteos no higienizados de procedencia casera supone todavía un mecanismo importante de contagio en amplias áreas de nuestro país. Por otra parte, como el periodo de incubación es muy variable, oscilando entre dos semanas y varios meses, la enfermedad puede manifestarse lejos del lugar en el que fue adquirida.

El espectro clínico de la brucelosis es sumamente inespecífico y heterogéneo. Habitualmente la enfermedad se manifiesta como un síndrome febril sin foco aparente, si bien entre el 25 y el 35% de los casos presentarán una o más formas focales a lo largo del curso evolutivo de la enfermedad. Dentro de las formas focales de las brucelosis, las referidas al aparato locomotor son las más frecuentes, y las neurológicas junto con las cardiovasculares, las más graves. Por su curso más prolongado y su peor pronóstico las formas focales se consideran verdaderas complicaciones de la enfermedad (Colmenero, J. D. y cols., 1996 Medicine (Baltimore), 75: 195-211). Además del coste humano, la brucelosis en general y sus complicaciones en particular, generan elevadísimas pérdidas económicas consecuencia del gasto sanitario y de la reducción de la capacidad laboral del paciente por largos periodos de tiempo (Colmenero JD y cols., 1989, Rev Clin Esp, 185: 459-63).

El patrón oro (“*gold standard*”) en el diagnóstico de la brucelosis es el aislamiento del germen, generalmente mediante la realización de hemocultivos. Sin embargo, el rendimiento del hemocultivo en las complicaciones focales no supera del 40 al 50%, y desciende aún más en las muestras no sanguíneas donde raramente supera el 40% (Colmenero, J. D. y cols., 1996 *Medicine* (Baltimore), 75: 195-211; Ariza, J, y cols., 1995 *Clin Infect Dis.*; 20: 1241-9).

5 Por otra parte, aún con la tecnología más avanzada, *Brucella* spp. es un germen exigente que requiere generalmente incubaciones prolongadas, suponiendo además un alto riesgo de infección para el personal de laboratorio que manipula microorganismos vivos (Yagupsky P, y cols., 2000, *Scand J Infect Dis.*; 32: 31-5). Por ello, el diagnóstico de la brucelosis habitualmente se basa en la demostración de anticuerpos específicos frente a diversos antígenos más o menos específicos del género *Brucella* mediante diferentes pruebas serológicas (Young, E.J. 1991, *Rev Infect Dis.*, 13: 359-72). En general, las pruebas serológicas son fáciles de realizar pero su especificidad se reduce notablemente en zonas de alta endemia, en la población profesionalmente expuesta, en los pacientes que han padecido la infección recientemente y en las relativamente frecuentes recidivas de la enfermedad (Ariza, J., y cols., *Clin Infect Dis.* 14: 131-40; Pellicer T, y cols., 1988, *J Infect Dis.*; 157:918-24).

15 Tanto la tuberculosis como la brucelosis son infecciones sistémicas capaces de producir afectación de prácticamente todos los órganos y aparatos. Existen diferentes cuadros clínicos como la meningitis linfocitaria, osteomielitis vertebral y orquiepididimitis subagudas, en las cuales el diagnóstico diferencial siempre debe incluir tanto la brucelosis como la tuberculosis, etiologías imposibles de diferenciar entre sí en base a datos exclusivamente clínicos (Colmenero JD, y cols., 1997, *Ann Rheum Dis.* 56: 709-15).

20 El diagnóstico etiológico precoz de ambas infecciones es *fundamental* para su adecuado tratamiento y reducción de la morbilidad asociada a la demora diagnóstica. Por otra parte, un diagnóstico más preciso evitaría el uso de tratamiento tuberculostático y antibrucelear empíricos, tan frecuentes en la práctica clínica y no exentos de riesgos innecesarios para los pacientes.

25 Para obviar en la medida de lo posible las limitaciones de los métodos diagnósticos convencionales en la brucelosis humana, nuestro grupo ha desarrollado en los últimos años varias técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y PCR-acoplada a un Enzimoimmunoensayo (PCR-ELISA) (ES 2220180), aplicable al diagnóstico de la brucelosis humana. Tras optimizar y ensayar las mismas en diversos supuestos clínicos, hemos podido demostrar, que estas técnicas de diagnóstico molecular superan en eficacia a los métodos habituales no solo en el diagnóstico de la primoinfección, sino también en los casos de recidiva y en las formas focales de la enfermedad (Queipo-Ortuño MI y cols., 1997, *J Clin Microbiol* 35: 2927-30; Morata P, y cols 2001, *J Clin Microbiol*, 39: 3743-6). No obstante, estas nuevas técnicas siguen presentando limitaciones (utilización de productos tóxicos, tiempo necesario para su realización, etc) por lo que recientemente y basándonos en trabajos realizados sobre cultivos puros de *Brucella* (Redkar R, y cols., 2001, *Mol Cell Probes.*, 15: 43-52) hemos desarrollado una nueva técnica de PCR a tiempo real (RT-PCR) empleando la tecnología LightCycler que permite cuantificar la carga bacteriana, y reduce el tiempo del ensayo a unos 45 min (P200801280). El proceso de la PCR cuantitativa a tiempo real permite una mayor automatización, lo cual redundará en una mayor simplicidad de la técnica, reducción del riesgo de contaminación y menor variabilidad inter intra ensayo (Queipo-Ortuño MI, y cols., 2008, *Clin Microbiol Infect.*, 14: 1128-34).

40 En los últimos años también se ha mejorado de forma notable los primitivos métodos moleculares aplicados al diagnóstico de la tuberculosis, los cuales adolecían de una adecuada sensibilidad y presentaban problemas de especificidad. Con este objetivo se han estudiado diferentes secuencias de ADN para la identificación de micobacterias, tanto por PCR convencional como por PCR a tiempo real, empleando el elemento de inserción IS6110/IS986 de *Mycobacterium tuberculosis*, secuencias del gen de la superóxido dismutasa, un segmento del gen *hsp65*, genes del ARNr 16S, la región intergénica *senX3-regX3* específica de *Mycobacterium tuberculosis* complex, etc. Estas técnicas han mostrado valores predictivos positivos y negativos que oscilan entre el 90 y el 100%, valores que varían en función de la técnica y el tipo de muestra utilizada (Ahmed N, y cols., 1998, *J Clin Microbiol.*, 36: 3094-5, Broccolo F, y cols., 2003, *J Clin Microbiol.*, 41: 4565-72, Drosten C, y cols., 2003, *Clin Chem.*; 49:1659-61, Miller N, y cols., 2002, *J Clin Microbiol.*, 40: 4143-7, Sreevatsan S, y cols., 2000, *J Clin Microbiol.*, 38: 2602-10). En la mayoría de los casos, los ensayos de amplificación por PCR han sido designados para amplificar e identificar un único patógeno por tubo de reacción. Sin embargo, la posibilidad de estudiar múltiples dianas en una misma reacción está siendo considerada cada vez más en los últimos años. Esto permitiría el *diagnóstico específico y diferencial* en una sola reacción de amplificación de diferentes patógenos implicados en un mismo síndrome clínico: neumonía, meningitis, gastroenteritis etc. (Corless CE, y cols., 2001, *J Clin Microbiol.* 39: 1553-8, Fujita H, y cols., 2002, *J Gastroenterol.*; 37:509-16).

55 La tecnología PCR a tiempo real diseñada nos ha permitido desarrollar un sistema de PCR múltiple con sondas específicas capaz de identificar de forma rápida y diferenciar *Brucella* spp. de *Mycobacterium tuberculosis* complex en una única reacción, con bajo riesgo de contaminación y una interpretación semiautomática de los resultados.

60 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un conjunto de *cebadores, sondas, procedimiento y kit de diagnóstico molecular rápido y diferencial entre Brucella spp. y Mycobacterium tuberculosis complex*; más concretamente para la detección de ADN específico de gérmenes del género *Brucella* y del genero *Mycobacterium tuberculosis* en muestras clínicas no sanguíneas, basada en la amplificación simultánea de ADN de ambos géneros mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) Múltiple en Tiempo Real (M-RT-PCR).

ES 2 346 028 A1

El procedimiento propuesto comprende: la amplificación mediante tecnología LightCycler (M-RT-PCR) en un mismo tubo de reacción de un fragmento de 207 pb de un gen que codifica la síntesis de una proteína de la superficie celular de 31kDa de *Brucella abortus* (BCSP31) común a todas las variedades de *Brucella*, y de un fragmento de 164 pb correspondiente a la región intergénica (SenX3-RegX3) específica para los miembros de *Mycobacterium tuberculosis* complex. La detección de los productos amplificados resultantes se basa en la transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET). Dicha técnica utiliza dos sondas oligonucleotídicas que se hibridan a secuencias complementarias del ADN diana. Cada sonda está marcada con un fluorocromo diferente, de forma que la interacción de los dos fluorocromos puede ocurrir solamente cuando ambos están unidos a la molécula diana, por lo que la emisión de energía será proporcional a la cantidad de producto amplificado creado en cada ciclo de PCR.

La técnica propuesta en esta invención es significativamente más sensible y específica que los métodos de diagnóstico clínico tradicionales (bacteriológicos, serológicos y de tinción) y presenta las siguientes ventajas:

- La detección en un único tubo de los productos PCR es rápida, fácil y objetiva, permitiendo un fácil y rápido diagnóstico de la infección específica (brucelosis ó tuberculosis);
- No requiere utilizar electroforesis en geles de agarosa, luz ultravioleta, ni el uso de agentes tóxicos como el bromuro de etidio, para la detección de los productos obtenidos;
- Debido a que la M-RT-PCR se realiza en un sistema cerrado que no requiere manipulación de los productos PCR una vez completada la misma, disminuye notablemente el riesgo de contaminación por arrastre;
- Permite la monitorización de la respuesta al tratamiento y la detección precoz de las recidivas.
- Evita el riesgo de manipulación de los microorganismos por el personal de laboratorio;
- Permite el manejo simultáneo de un elevado número de muestras;
- Es susceptible de ser automatizada, lo cual la hace muy atractiva para el uso en cualquier laboratorio clínico.

De este modo, constituye un *primer objeto* de la presente invención un conjunto de cebadores para la detección e identificación de ADN específico de *Brucella* spp. y *Mycobacterium tuberculosis* complex en muestras clínicas, en el cual al menos cuatro de los cebadores de dicho conjunto presentan secuencias que comprenden a las secuencias mostradas en las SEQ ID NO 1; SEQ ID NO 2; SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4. Preferentemente, dicho conjunto está formado por un primer cebador cuya secuencia comprende la secuencia de *i* nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 1, por un segundo cebador cuya secuencia comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 2, por un tercer cebador cuya secuencia comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 3 y por un cuarto cebador cuya secuencia comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 4. Más preferentemente, la secuencia de nucleótidos del primer cebador es idéntica a la SEQ ID NO 1, la secuencia de nucleótidos del segundo cebador es idéntica a la SEQ ID NO 2, la secuencia de nucleótidos del tercer cebador es idéntica a la SEQ ID NO 3 y la secuencia de nucleótidos del cuarto cebador es idéntica a la SEQ ID NO 4.

Constituye un *segundo objeto* de la presente invención cuatro sondas para la detección e identificación del ADN específico de *Brucella* spp. y *Mycobacterium tuberculosis* complex en muestras clínicas, que presentan unas secuencias de nucleótidos que comprenden las secuencias de nucleótidos mostradas en la SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, y SEQ ID NO 8, siendo preferentemente las secuencias de nucleótidos idénticas a la SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, y SEQ ID NO 8. Dichas sondas SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 7 estarán marcadas en el extremo 3' con fluoresceína, la sonda SEQ ID NO 6 marcada en el extremo 5' con el fluoróforo LightCycler Red 640 y la sonda SEQ ID NO 8 marcada en el extremo 5' con el fluoróforo LightCycler Red 705. Estas sondas no podrán ser extendidas durante la reacción de PCR debido a que sus extremos 3' están bloqueados con un grupo fosfato.

Constituye un *tercer objeto* de la presente invención un procedimiento para la detección e identificación de ADN específico de *Brucella* spp. y *Mycobacterium tuberculosis* complex en muestras clínicas que incluye las siguientes etapas:

- a. extracción y purificación del ADN de las muestras clínicas,
- b. amplificación mediante M-RT-PCR en tiempo real de una secuencia de 207 pb del gen que codifica una proteína inmunogénica de la membrana celular de 31 kDa de *Brucella* spp. utilizando el conjunto de cebadores anteriormente referido, preferentemente un primer cebador cuya secuencia es idéntica a SEQ ID NO 1 y un segundo cebador cuya secuencia es idéntica a SEQ ID NO 2; y otra secuencia de 164 pb complementarias de la región intergénica SenX3-RegX3 de *Mycobacterium tuberculosis* complex, utilizando el conjunto de cebadores anteriormente referido, preferentemente un tercer cebador cuya secuencia es idéntica a SEQ ID NO 3 y un cuarto cebador cuya secuencia es idéntica a SEQ ID NO 4, y
- c. simultáneamente con la etapa anterior, hibridación de los dos productos amplificados mediante 2 parejas de sondas, preferentemente, una pareja que presenta una secuencia de nucleótidos idéntica a la SEQ ID NO 5,

ES 2 346 028 A1

5 marcada por fluorescina-6-carboxi en el extremo 3' y SEQ ID NO 6 marcada en el extremo 5' con el fluoróforo LightCycler Red 640 y otra pareja que presenta una secuencia de nucleótidos idéntica a la SEQ ID NO 7, marcada por fluorescina-6-carboxi en el extremo 3' y SEQ ID NO 8 marcada en el extremo 5' con el fluoróforo LightCycler Red 705.

Las muestras clínicas pueden ser muestras de líquido sinovial, orina, líquido cefalorraquídeo, de tejido hepático y de tejido óseo.

10 Constituye un *cuarto objeto* de la presente invención un kit para la detección e identificación de ADN específico de *Brucella* spp. y *Mycobacterium tuberculosis* complex en muestras clínicas que comprende:

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

20 Preferentemente el kit comprende:

- 25 a. cuatro cebadores con secuencias de nucleótidos idénticas a las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4,
- b. dos parejas de sondas, una que presenta una secuencia de nucleótidos idéntica a la SEQ ID NO 5, marcada con fluorescina-6-carboxi en el extremo 3' y SEQ ID NO 6 marcada en el extremo 5' con el fluoróforo LightCycler Red 640 y otra pareja que presenta una secuencia de nucleótidos idéntica a la SEQ ID NO 7, marcada con fluorescina-6-carboxi en el extremo 3' y SEQ ID NO 8 marcada en el extremo 5' con el fluoróforo LightCycler Red 705, y
- 30 c. una muestra control para la determinación de ADN de *Brucella* spp. y *Mycobacterium tuberculosis*.

35 Descripción de los dibujos

Evaluación de la PCR múltiple a tiempo real en muestras clínicas. Un grupo de muestras es simultáneamente analizado para el gen BCSP31 de *Brucella* spp. (A) y la región integélica SenX3-RegX3 de *Mycobacterium tuberculosis* complex (B).

40 Panel A: Las muestras 1, 2, 3 corresponden a fluido pleural, tejido hepático y orina de tres pacientes con brucelosis. Muestra 7 corresponde al análisis de líquido cefalorraquídeo de un paciente con meningitis por *Streptococo pneumoniae*; Las muestras 4 y 5 se corresponden con controles positivos para *Brucella* y *Mycobacterium tuberculosis* respectivamente. Finalmente la muestra 6 se corresponde con el control negativo de la reacción.

45 Panel B: Las muestras 1, 2, 3 corresponden a nódulos linfáticos, tejido pericárdico y absceso de psoas de tres pacientes con tuberculosis. Muestra 7 corresponde al análisis de tejido vertebral de un paciente con osteomielitis vertebral piogénica por *Streptococo agalatae*. Las muestras 4 y 5 se corresponden con controles positivos para *Mycobacterium tuberculosis* y *Brucella* respectivamente. Finalmente la muestra 6 se corresponde con el control negativo de la reacción.

50 Paneles C y D: Curvas de fusión (*Melting*) de los productos de amplificación generados mediante PCR múltiple a tiempo real (M-RT-PCR). Las señales específicas correspondientes a los productos de amplificación de los pacientes con brucelosis y los controles positivos presentan temperaturas de fusión de $71.51 \pm 0.18^\circ\text{C}$ y de $71.12 \pm 0.13^\circ\text{C}$ para los pacientes con tuberculosis y sus respectivos controles positivos.

55 Modos de realización de la invención

A continuación, se describe detalladamente, y sin carácter limitativo, un modo de realización de la invención, particularmente desarrollado para muestras clínicas, optimizado para la tecnología *LightCycler* (Roche Applied Science), y comprendiendo el uso de dos parejas de sondas FRET (Roche Applied Science).

Extracción y purificación del ADN

65 El ADN total se extrae a partir de una muestras de orina, líquido cefalorraquídeo, y tejido hepático y óseo, las cuales se almacenan a -20°C . En esta alícuota se encuentra el ADN genómico leucocitario y el bacteriano, este último en baja concentración. Para la realización de la prueba, el ADN total es extraído utilizando el kit *UltraClean Tissue DNA Isolation Kit* (Mo Bio Laboratories) a partir de muestras de $300 \mu\text{L}$ según las instrucciones del fabricante. El

ADN precipitado resultante del protocolo comercial es resuspendido en 50 μL de agua estéril y se almacena a 4°C hasta su utilización. Para el análisis por PCR se utilizan alícuotas de 5 μL de la suspensión obtenida.

Amplificación

Para la identificación de *Brucella* spp. se amplificó una región de ADN de 207 pb del gen que codifica una proteína de la superficie celular de *Brucella abortus* de 31 kDa (Mayfield J.E. *et al.*, 1988, Gene, 63: 1-9), común a todas las biovariedades de *Brucella*. Como iniciadores de la reacción de amplificación de la secuencia diana, se emplean los cebadores identificados en las SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2. La sonda FRET empleada se corresponden a las secuencias identificadas como SEQ ID NO 5, marcada con fluorescina-6-carboxi en el extremo 3' y SEQ ID NO 6 marcada en el extremo 5' con el fluoróforo LightCycler Red 640.

Para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* se amplificó una región de ADN de 164 pb complementarias de la región intergénica SenX3-RegX3 de *Mycobacterium tuberculosis* complex. Como iniciadores de la reacción de amplificación de la secuencia diana, se emplean los cebadores identificados en las SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4. La sonda FRET empleada se corresponden a las secuencias identificadas como SEQ ID NO 7, marcada con fluorescina-6-carboxi en el extremo 3' y SEQ ID NO 8 marcada en el extremo 5' con el fluoróforo LightCycler Red 705.

Análisis de los productos de amplificación de la M-RT-PCR en tiempo real

La mezcla de reacción se realiza en un volumen final de 20 μL , conteniendo 4 μL de *LightCycler FastStart DNA MasterPLUS HybProbe* (Roche Diagnostic), 0,6 $\mu\text{mol/L}$ de cada cebador iniciador de reacción, 200 nmol/L de sondas FRET y 5 μL del ADN molde. La reacción se lleva a cabo en un termociclador *LightCycler* (Roche Applied Science). Los capilares son sellados, centrifugados a 500 g durante 5 segundos, y amplificados en el termociclador. La activación de la polimerasa se realiza a 95°C durante 10 minutos y se llevan a cabo 45 ciclos compuestos de 10 segundos a 95°C, 20 segundos a 60°C y 10 segundos a 72°C. La temperatura de transición se fija a 20°C/segundo durante todos los pasos. Tras concluir la amplificación se realiza una etapa de fusión (*melting*) calentando a 95°C durante 0 segundos a 20°C/segundo manteniendo a 41°C durante 20 segundos a 20°C/segundo y finalmente calentando lentamente a 0.1°C/segundo hasta 85°C. Finalmente se realiza una etapa de enfriamiento a 40°C durante 15 segundos. Cada producto de amplificación es analizado utilizando diferentes canales del termociclador. La señal generada por el producto de amplificación BCSP31 es medida a 640 nm, mientras que la señal del producto de la región intergénica SenX3-RegX3 es medida a 705 nm. Las curvas de fluorescencia son analizadas utilizando el paquete informático *LightCycler*, versión 4.0. Para minimizar la variabilidad experimental y determina el ciclo umbral (Cp) utilizamos el método automático de la segunda derivada máxima. En todos los ensayos realizados se incluyen un control negativo y controles positivos correspondientes a diluciones seriadas de *Brucella abortus* B-19 y *Mycobacterium tuberculosis*. Para garantizar la reproducibilidad de los resultados todas las muestras son procesadas por duplicado. Para prevenir la contaminación de las muestras se realizan medidas estándares y flujos unidireccionales en la extracción y amplificación del ADN. Un ensayo se considera negativo para ADN de *Brucella* spp. y *Mycobacterium tuberculosis* si el valor Cp supera los 37 ciclos. Los resultados obtenidos, resumidos en la figura 1, evidencian la fiabilidad del procedimiento propuesto en la presente invención.

Bibliografía

1. Castro KG. Global tuberculosis challenges. *Emerg Infect Dis* 1998; 4: 408-9.
2. Incidence of tuberculosis in Spain: results of the Multicenter Project of Tuberculosis Research (MPTR). Work Group of the MPTR] *Med Clin (Barc)* 2000; 114(14): 530-7.
3. Denis-Delpierre N, Merrien D, Billaud E, *et al.* Extrapulmonary tuberculosis in the central western region. Retrospective study of 217 cases (Gerico 1991-1993). *Presse Med.* 1998; 27: 341-346.
4. Alvarez S., McCabe WR. Extrapulmonary tuberculosis revisited: A review of experience at Boston city and other hospitals. *Medicine (Baltimore)* 1984; 63: 25-55.
5. Davies PD, Humphries MJ, Byfield SP *et al* Bone and joint tuberculosis. A survey of notification in England and Wales. *J Bone Joint Surg (Br)* 1984; 66: 326-330.
6. Pertuiset E, Beaudreuil J, Lioté F *et al.* Spinal tuberculosis in adults. A study of 103 cases in a developed country 1980-1994. *Medicine (Baltimore)* 1999; 78: 309-20.
7. Anónimo. Boletín Epidemiológico Semanal. Ministerio de Sanidad y Consumo. Centro Nacional de Epidemiología. España, Vol 12, nº 10, 2004.
8. Colmenero, J. D., J. M. Reguera, F. Martos, D. Sanchez-Mora, M. Delgado, M Causse, A. Matín-Farfán, y C. Juárez. Complications associated with *Brucella melitensis* infection: A study of 530 cases. *Medicine (Baltimore)*. 1996; 75: 195-211.

9. **Colmenero JD, Cabrera FP, Hernández S, Reguera JM, Pinedo A, Castillo AM.** Repercusión Socioeconómica de la Brucelosis Humana. *Rev Clin Esp* 1989; 185: 459-63.
10. **Ariza, J, J. Corredoira, R. Pallares, P. Fernandez-Viladrich, G. Rufi, M. Pujol, y F. Gudiol.** Characteristics of and risk factors for relapse of brucellosis in humans. *Clin Infect Dis.* 1995; 20: 1241-9.
11. **Yagupsky P, Peled N, Riesenberk K, Banai M.** Exposure of hospital personnel to *Brucella melitensis* and occurrence of laboratory-acquired disease in an endemic area. *Scand J Infect Dis.* 2000; 32: 31-5.
12. **Young, E.J.** Serologic diagnosis of human brucellosis: Analysis of 214 cases by agglutination tests and review of the literatura. *Rev Infect Dis.* 1991; 13: 359-72.
13. **Ariza, J., T. Pellicer, R. Pallares, A. Foz, y F. Gudiol.** 1992. Specific antibody profile in human brucellosis. *Clin Infect Dis.* 14: 131-40.
14. **Pellicer T, Ariza J, Foz A, Pallares R, Gudiol F.** Specific antibodies detected during relapses of human brucellosis. *J Infect Dis* 1988; 157: 918-24.
15. **Colmenero JD, Jimenez-Mejias ME, Sanchez-Lora FJ et al.** Pyogenic, tuberculous, and brucellar vertebral osteomyelitis: a descriptive and comparative study of 219 cases. *Ann Rheum Dis.* 1997; 56: 709-15.
16. **Queipo-Ortuño MI, Morata P, Ocón P, Colmenero JD.** Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral blood PCR assay. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2927-30.
17. **Morata P, Queipo-Ortuño MI, Reguera JM^a, López González JJ, Colmenero JD.** Diagnostic Yield of a PCR-assay in Focal Complications of Brucellosis. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 3743-6.
18. **Redkar R, Rose S, Bricker B, Delvechio V.** Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Mol Cell Probes.* 2001; 15: 43-52.
19. **Queipo-Ortuño MI, Colmenero JD, Bravo MJ, García-Ordoñez MA, Morata P.** Usefulness of a quantitative real-time PCR assay in serum samples to discriminate between past and active human brucellosis. *Clin Microbiol Infect.* 2008 Dec; 14(12): 1128-34.
20. **Ahmed N, Mohanty AK, Mukhopadhyay U, Batish VK, Grover S.** PCR-based rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in blood from immunocompetent patients with pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 1998; (36): 3094-5.
21. **Broccolo F, Scarpellini P, Locatelli G, Zingale A, Brambilla AM, Cichero P, Sechi LA, Lazzarin A, Lusso P, Malnati MS.** Rapid diagnosis of mycobacterial infections and quantitation of *Mycobacterium tuberculosis* load by two real-time calibrated PCR assays. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4565-72.
22. **Drosten C, Panning M, Kramme S.** Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by real-time PCR using pan-mycobacterial primers and a pair of fluorescence resonance energy transfer probes specific for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Clin Chem.* 2003; 49: 1659-61.
23. **Miller N, Cleary T, Kraus G, Young AK, Spruill G, Hnatyszyn HJ.** Rapid and specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast bacillus smear-positive respiratory specimens and BacT/ALERT MP culture bottles by using fluorogenic probes and real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(11): 4143-7.
24. **Sreevatsan S, Bookout JB, Ringpis F, Perumaalla VS, Ficht TA, Adams LG, Hagius SD, Elzer PH, Bricker BJ, Kumar GK, Rajasekhar M, Isloor S, Barathur RR.** A multiplex approach to molecular detection of *Brucella abortus* and/or *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 2602-10.
25. **Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarski EB.** Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 1553-8.
26. **Fujita H, Eishi Y, Ishige I, Saitoh K, Takizawa T, Arima T, Koike M.** Quantitative analysis of bacterial DNA from *Mycobacteria spp.*, *Bacteroides vulgatus*, and *Escherichia coli* in tissue samples from patients with inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol.* 2002; 37: 509-16.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Conjunto de cebadores para la detección e identificación de ADN específico de *Brucella* spp. y *Mycobacterium tuberculosis* complex en muestras clínicas, **caracterizado** porque al menos cuatro de los cebadores de dicho conjunto presentan secuencias que comprenden a las secuencias mostradas en las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4.
- 10 2. Conjunto de cebadores para la detección e identificación de ADN específico de *Brucella* spp. y *Mycobacterium tuberculosis* complex en muestras clínicas según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho conjunto está formado por un primer cebador cuya secuencia comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 1, por un segundo cebador cuya secuencia comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 2, un tercer cebador cuya secuencia comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 3 y un cuarto cebador cuya secuencia comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 4.
- 15 3. Conjunto de cebadores para la detección e identificación de ADN específico de *Brucella* spp. y *Mycobacterium tuberculosis* complex en muestras clínicas según la reivindicación 2, **caracterizado** porque la secuencia de nucleótidos del primer cebador es idéntica a la SEQ ID NO 1, la secuencia de nucleótidos del segundo cebador es idéntica a la SEQ ID NO 2, la secuencia de nucleótidos del tercer cebador es idéntica a la SEQ ID NO 3 y la secuencia de nucleótidos del cuarto cebador es idéntica a la SEQ ID NO 4.
- 20 4. Sondas de hibridación para la detección e identificación de ADN específico de *Brucella* spp. y *Mycobacterium tuberculosis* complex en muestras clínicas, **caracterizadas** porque presentan una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencias de nucleótidos mostradas en la SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7 y SEQ ID NO 8.
- 25 5. Sondas para la para la detección e identificación de ADN específico de *Brucella* spp. y *Mycobacterium tuberculosis* complex en muestras clínicas según la reivindicación 4, **caracterizada** porque presenta unas secuencias de nucleótidos idénticas a la SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7 y SEQ ID NO 8.
- 30 6. Sondas para la detección e identificación de ADN específico de *Brucella* spp. y *Mycobacterium tuberculosis* complex en muestras clínicas según las reivindicaciones 4 y 5, **caracterizado** porque dichas sondas SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 7 se marcan con fluorescina-6-carboxi en el extremo 3' y SEQ ID NO 6 y SEQ ID NO 8 se marcan en el extremo 5' con el fluoróforo LightCycler Red 640 y fluoróforo LightCycler Red 705 respectivamente.
- 35 7. Procedimiento para la detección e identificación de ADN específico de *Brucella* spp. y *Mycobacterium tuberculosis* complex en muestras clínicas **caracterizado** porque incluye las siguientes etapas:
- 40 a. extracción y purificación del ADN de las muestras clínicas,
 - b. amplificación mediante PCR múltiple en tiempo real de una secuencia de amplificación de 207 pb del gen que codifica una proteína inmunogénica de la membrana celular de 31 kDa de *Brucella* spp, utilizando el conjunto de cebadores según las reivindicaciones 1-3, preferentemente un primer cebador cuya secuencia es idéntica a SEQ ID NO 1 y un segundo cebador cuya secuencia es idéntica a SEQ ID NO 2; y otra secuencia de 164 pb complementarias de la región intergénica SenX3-RegX3 de *Mycobacterium tuberculosis* complex, utilizando el conjunto de cebadores según las reivindicaciones 1-3, preferentemente un tercer cebador cuya secuencia es idéntica a SEQ ID NO 3 y un cuarto cebador cuya secuencia es idéntica a SEQ ID NO 4, y
 - 45 c. simultáneamente con la etapa anterior, hibridación del producto amplificado mediante dos parejas de sondas según las reivindicaciones 4, 5 y 6, preferentemente una pareja que presenta una secuencia de nucleótidos idéntica a la SEQ ID NO 5, marcada con fluorescina-6-carboxi en el extremo 3' y SEQ ID NO 6 marcada en el extremo 5' con el fluoróforo LightCycler Red 640 y preferentemente otra pareja de sondas que presenta una secuencia de nucleótidos idéntica a la SEQ ID NO 7, marcada por fluorescina-6-carboxi en el extremo 3' y SEQ ID NO 8 marcada en el extremo 5' con el fluoróforo LightCycler Red 705.
- 50 8. Procedimiento para la detección e identificación de ADN específico de *Brucella* spp. y *Mycobacterium tuberculosis* complex en muestras clínicas según la reivindicación 7, **caracterizado** porque las muestras clínicas son de líquido sinovial.
- 60 9. Procedimiento para la detección e identificación de ADN específico de *Brucella* spp. y *Mycobacterium tuberculosis* complex en muestras clínicas según la reivindicación 7, **caracterizado** porque las muestras clínicas son muestras de orina.
- 65 10. Procedimiento para la detección e identificación de ADN específico de *Brucella* spp. y *Mycobacterium tuberculosis* complex en muestras clínicas según la reivindicación 7, **caracterizado** porque las muestras clínicas son muestras de líquido cefalorraquídeo.

ES 2 346 028 A1

11. Procedimiento para la detección e identificación de ADN específico de *Brucella* spp. y *Mycobacterium tuberculosis* complex en muestras clínicas según la reivindicación 7, **caracterizado** porque las muestras clínicas son muestras de tejido hepático.

5 12. Procedimiento para la detección e identificación de ADN específico de *Brucella* spp. y *Mycobacterium tuberculosis* complex en muestras clínicas según la reivindicación 7, **caracterizado** porque las muestras clínicas son muestras de tejido óseo.

10 13. Kit para la detección e identificación de ADN específico de *Brucella* spp. y *Mycobacterium tuberculosis* complex en muestras clínicas **caracterizado** porque comprende:

- a. un conjunto de cebadores según las reivindicaciones 1, 2 y 3.
- b. un conjunto de sondas según las reivindicaciones 4, 5 y 6, y
- 15 c. una muestra control para la determinación de ADN de *Brucella* spp. y *Mycobacterium tuberculosis*.

20 14. Kit para la detección e identificación de ADN específico de *Brucella* spp. y *Mycobacterium tuberculosis* complex en muestras clínicas según la reivindicación 13, **caracterizado** porque comprende:

- a. cuatro cebadores con secuencias de nucleótidos idénticas a las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4,
- 25 b. dos parejas de sondas que presentan una secuencia de nucleótidos idéntica a la SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7 y SEQ ID NO 8, y
- c. una muestra control para la determinación de ADN de *Brucella* spp. y *Mycobacterium tuberculosis*.

30 15. Kit para la detección e identificación de ADN específico de *Brucella* spp. y *Mycobacterium tuberculosis* complex en muestras clínicas según la reivindicación 14, **caracterizado** porque la sonda SEQ ID NO 5 está marcada con fluorescina-6-carboxi en el extremo 3', la SEQ ID NO 6 está marcada en el extremo 5' con el fluoróforo LightCycler Red 640, la SEQ ID NO 7 marcada por fluorescina-6-carboxi en el extremo 3' y SEQ ID NO 8 marcada en el extremo 5' con el fluoróforo LightCycler Red 705.

35

40

45

50

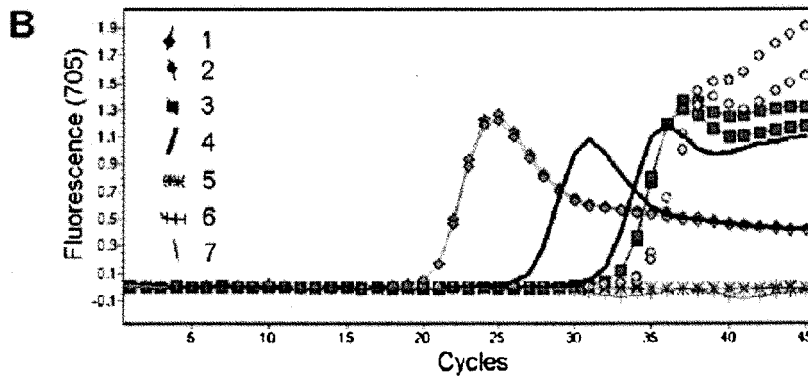
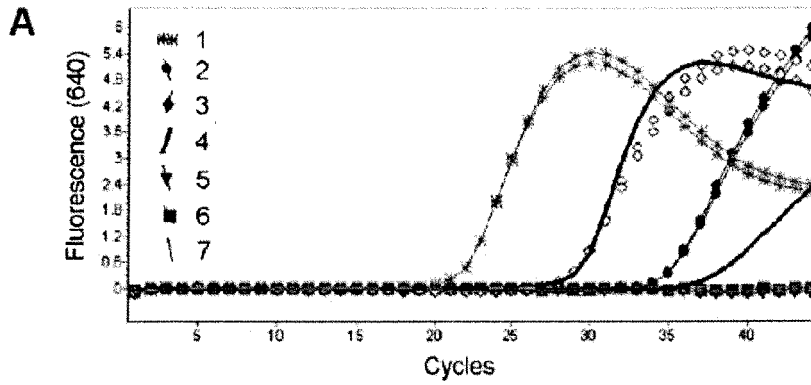
55

60

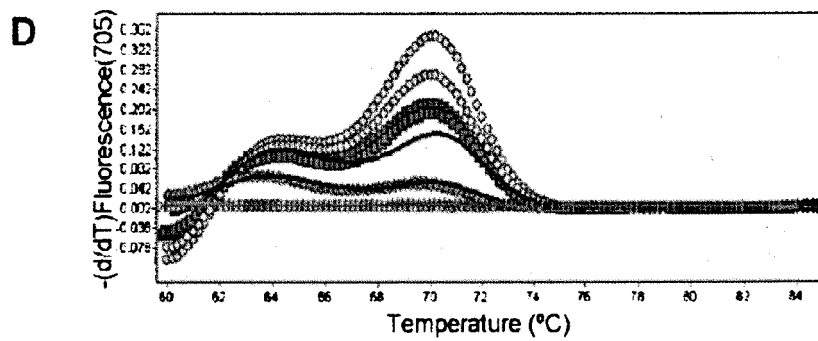
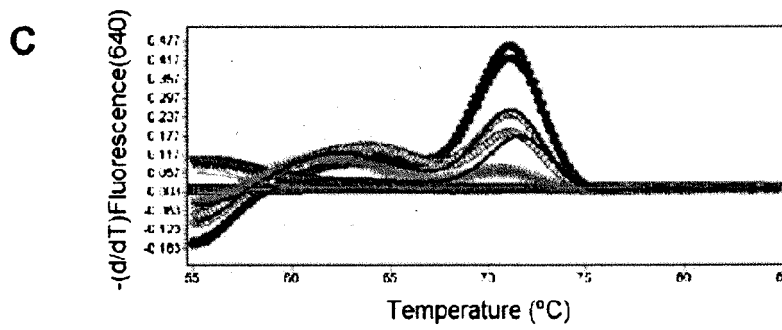
65

Figure 2

Amplification Curves



Melting Peaks



ES 2 346 028 A1

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Universidad de Málaga
Fundación IMABIS
- 5
- <120> Conjunto de cebadores, sondas, procedimiento y kit para la detección y diferenciación de secuencias de ADN específicas de *Brucella* spp y *Mycobacterium tuberculosis* complex
- 10 <130> SOLICITUD_IMABIS_UMA_2009
- <160> 8
- 15 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
<211> 21
- 20 <212> DNA
<213> Artificial
- <220>
- 25 <223> Cebador. Oligonucleótido Directo para la amplificación de una región de ADN de 207 pb, del gen que codifica una proteína de la superficie celular de *Brucella abortus* de 31 kDa
- <400> 1
- 30 ggetcgggtg ccaatatcaa t 21
- <210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
- 35
- <220>
- 40 <223> Cebador. Oligonucleótido Reverso para la amplificación de una región de ADN de 207 pb, del gen que codifica una proteína de la superficie celular de *Brucella abortus* de 31 kDa
- 45 <400> 2
- gtctcgcacc gattgatgt 20
- <210> 3
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial
- 50
- <220>
- 55 <223> Cebador. Oligonucleótido Directo para la amplificación de un fragmento de 164 pb correspondiente a una región intergénica específica de *Mycobacterium tuberculosis* complex
- 60 <400> 3
- cggctaataca cgacggcac 19
- 65 <210> 4
<211> 24

ES 2 346 028 A1

<212> DNA
<213> Artificial

5 <220>
<223> Cebador. Oligonucleótido Reverso para la amplificación de un fragmento de 164 pb correspondiente a una región intergénica específica de *Mycobacterium tuberculosis* complex

10 <400> 4
ctcttctct cgttgacc tggt 24

15 <210> 5
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

20 <220>
<223> Sonda. Oligonucleótido Directo para la hibridación y detección de una región de ADN de 207 pb, del gen que codifica una proteína de la superficie celular de *Brucella abortus* de 31 kDa

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)

30 <223> 5,6-carboxifluoresceína
<400> 5
aggcaacgctc tgactgcgta aagccn 26

35 <210> 6
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

40 <220>
<223> Sonda. Oligonucleótido Directo para la hibridación y detección de una región de ADN de 207 pb, del gen que codifica una proteína de la superficie celular de *Brucella abortus* de 31 kDa

45 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> LightCycler Red 640

50 <220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> Phosphate group

55 <400> 6
nactccagag cgcccgactt gatcgn 26

60 <210> 7
<211> 24

ES 2 346 028 A1

<212> DNA

<213> Artificial

5 <220>

<223> Sonda. Oligonucleótido Directo para la hibridación y detección de una región de 164 pb correspondiente a una región intergénica específica de *Mycobacterium tuberculosis* complex

10 <220>

<221> misc_feature

<222> (24)..(24)

<223> 5,6-carboxifluoresceína

15

<400> 7

 tggctcttc ggcgttgatc gagn

24

20

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

25

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda. Oligonucleótido Directo para la hibridación y detección de una región de 164 pb correspondiente a una región intergénica específica de *Mycobacterium tuberculosis* complex

30

<220>

<221> misc_feature

35

<222> (1)..(1)

<223> LightCycler Red 705

<220>

40

<221> misc_feature

<222> (27)..(27)

<223> Phosphate group

45

<400> 8

 ncctatcacg acgacgagcg acccgan

27

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 346 028

② Nº de solicitud: 200900347

③ Fecha de presentación de la solicitud: 28.01.2009

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	SRINAND SREEVATSAN et al. "A multiplex approach to molecular detection of Brucella abortus and/ or Mycobacterium bovis infection in cattle" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. Vol. 38, no. 7, 2000, páginas 2602-2610. Páginas 2603-2604,2606.	1-15
X	DEEPTI PARASHAR et al. "Applications of real-time PCR technology to mycobacterial research" INDIAN J MED RES, Vol. 124, 2006, páginas 385-398. Páginas 386-389.	1-15
X	FRANCESCO BROCCOLO et al. "Rapid diagnosis of mycobacterial infections and quantitation of mycobacterium tuberculosis load by two real-time calibrated PCR assays" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Vol. 41, no. 10, 2003, páginas 4565-4572. Páginas 4565,4566.	1-15
X	MARIA ISABEL QUEIPO-ORTUÑO et al. "Comparison between ligtcycler real-time polymerase chain reaction (PCR) assay with serum and PCR-enzyme-linked immunosorbent assay with whole blood samples for the diagnosis of human brucellosis" CLINICAL INFECTIOUS DISEASES, Vol. 40, 2005, páginas 260-264. Páginas 260-261,263.	1-15
X	ES 2220180 A1 (UNIVERSIDAD DE MALAGA) 01.12.2004, página 4, líneas 45-68.	1-15

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

13.09.2010

Examinador

S. González Peñalba

Página

1/6

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q 1/68 (2006.01)

C07K 14/23 (2006.01)

C07K 14/35 (2006.01)

C07K 7/00 (2006.01)

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

C12Q, C07K

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, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 13.09.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-15	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-15	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	A multiplex approach to molecular detection of Brucella abortus and/ or Mycobacterium bovis infection in cattle	2000
D02	Applications of real-time PCR technology to mycobacterial research	2006
D03	Rapid diagnosis of mycobacterial infections and quantitation of mycobacterium tuberculosis load by two real-time calibrated PCR assays	2003
D04	Comparison between ligcycler real-time polymerase chain reaction (PCR) assay with serum and PCR-enzyme-linked immunosorbent assay with whole blood samples for the diagnosis of human brucellosis	2005
D05	ES 2220180 A1	2004

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 patente tal y como ha sido redactada se refiere a un conjunto de cebadores para la detección e identificación de ADN específico de Brucella spp. y Mycobacterium tuberculosis complex en muestras clínicas, al menos cuatro de los cebadores de dicho conjunto presentan secuencias como SEQ ID NO1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4 (reivindicaciones 1-3). Dicha solicitud hace referencia también a las sondas de hibridación que presentan una secuencia de nucleótidos que comprende las secuencias SEQ ID NO5, SEQ ID NO6, SEQ ID NO 7 y SEQ ID NO 8 (reivindicaciones 1-6). Reivindica también un procedimiento de detección e identificación de ADN específico de Brucella spp. y Mycobacterium tuberculosis complex (reivindicación 7) así como las muestras utilizadas en dicho procedimiento (reivindicaciones 8-12). Y por último un kit para la detección e identificación específica de dichos patógenos (reivindicaciones 13-15).

El documento D01 describe una amplificación y detección múltiple para el diagnóstico de Mycobacterium bovis y Brucella abortus. El procedimiento denominado BPDA-PCR (bovine pathogen detection assay-PCR) consiste en la doble amplificación del gen BCSP31K de B. abortus y del gen hsp65 de M. bovis utilizando para ello cebadores y sondas de hibridación específicas (véase páginas 2603-2604). Se describe, por lo tanto, un ensayo de amplificación doble que puede identificar tanto uno como ambos organismos en una única reacción. El ensayo llevado a cabo utilizó muestras de leche, pero puede realizarse en otro tipo de muestras (véase página 2603 y 2606).

El documento D02 trata sobre aplicaciones de la tecnología PCR a tiempo real para la investigación de mycobacterias (página 386-389). Entre otras aplicaciones se ha utilizado esta tecnología de PCR a tiempo real para la detección de Mycobacterium tuberculosis complex. Recoge también que la combinación de PCR a tiempo real con sondas fluorogénicas de secuencias específicas tiene un gran potencial para detectar DNA o RNA de Mycobacterium a partir de muestras clínicas tales como esputo, fluido de lavado broncoalveolar, fluido cerebro espinal, fluido pleural y muestras de tejido.

El documento D03 hace referencia a ensayos para un diagnóstico rápido de infecciones producidas por Mycobacterium tuberculosis mediante PCR a tiempo real. Estos ensayos amplifican dos regiones distintas del genoma de Mycobacterium tuberculosis, una un fragmento de IS6110 y otra la región intergénica senX3-regX3 (véase página 4565). Para el ensayo de amplificación de la región intergénica senX3-regX3 se han utilizado cebadores TAQregT2 y TAQreg2L y una sonda de un oligonucleótido de 22 pares de bases marcada con fluorescina-6-carboxi en el extremo 5' y 6-carboxitetrametiltoanina en el extremo 3' (véase página 4566). Para llevar a cabo los ensayos se tomaron 121 muestras de clínicas de esputo, orina, fluido cerebro espinal, fluido de lavado nasogástrico y fluido de lavado broncoalveolar (véase página 4566).

Hoja adicional

El documento D04 divulga la comparación entre dos diferentes ensayos de PCR para brucelosis humana, uno el ensayo PCR a tiempo real basado en light cycler y el otro ensayo PCR-ELISA. En ambos ensayos se produce la amplificación de una secuencia de 223 pares de bases de un gen que codifica para la síntesis de una proteína de membrana inmunogenética específica del género *Brucella* (BCSP31) (véase páginas 260-261). Los resultados indican que el uso de PCR a tiempo real es más eficiente que PCR-ELISA (véase página 263).

El documento D05 describe la detección de *Brucella* por PCR acoplada a ELISA. Como oligonucleótido cebador utiliza SEQ ID NO 1 (página 1 de la lista de secuencias) que es prácticamente idéntico al SEQ DI NO1 utilizado en la presente solicitud de patente.

NOVEDAD ART. 6 DE LA LP

Las reivindicaciones 1-6 serían nuevas porque no se ha encontrado el mismo conjunto de cebadores y de sondas de hibridación para la detección e identificación de ADN específico de *Brucella* spp y *Mycobacterium tuberculosis* complex.

Las reivindicaciones 7-12 son nuevas porque el procedimiento para la detección e identificación mediante PCR a tiempo real utilizando dicho conjunto de cebadores y sondas de hibridación tampoco se ha encontrado recogido en el estado de la técnica.

Y lo mismo podría decirse para las reivindicaciones 13-15.

En conclusión, las reivindicaciones 1-15 satisfacen el requisito de novedad en el sentido del artículo 6 de la LP

ACTIVIDAD INVENTIVA ART.8 DE LA LP

Sin embargo las reivindicaciones 1-15 no se puede considerar que tengan actividad inventiva según el artículo 8 de la LP, por los siguientes motivos:

El documento D01 es el documento más cercano encontrado en el estado de la técnica que describe un método de amplificación e identificación simultánea de *Mycobacterium* y *Brucella* por medio de PCR (BPDA-PCR), amplificando una región del gen BCSP31K de *Brucella* y una región del gen hsp65 de *Mycobacterium*. La diferencia entre el documento más cercano y la solicitud de patente radica en que en ésta última la PCR empleada es a tiempo real y la región amplificada para *Mycobacterium* es la región intergénica SenX3-RegX3. En cuanto a la utilización de la técnica PCR a tiempo real es evidente para un experto en la materia, en relación con el estado de la técnica en su conjunto, que es más eficaz y rápida que una PCR estándar, así como la PCR a tiempo real múltiple lo es frente a una PCR a tiempo real individual. Por lo que el uso de PCR múltiple a tiempo real para la detección e identificación de ambas bacterias carecería de actividad inventiva. (reivindicaciones 7-15). Se han encontrado documentos que utilizan PCR a tiempo real para *Mycobacterium tuberculosis* (véase documento D02) y para *Brucella* (documento D04).

Por ello, el problema que trata de resolver la solicitud en cuanto a una más efectiva y rápida detección e identificación de *Mycobacterium tuberculosis* y *Brucella* vendría resultado por el empleo de un conjunto de cebadores y sondas de hibridación específicos en PCR a tiempo real. Pero esta solución (reivindicaciones 1-6) no tendría actividad inventiva por ser las secuencia de BCSP31 de *Brucella* (véase documentos D01, D04 y D05) y de la región intergénica SenX3-RegX3 (véase documentos D02 y D03) ya conocidas. Y también, por ser conocidas las herramientas para el diseño de cebadores, en el momento de la realización de la invención; la secuenciación de un nuevo cebador cae dentro del ámbito de diseño y optimización experimental rutinario. Por lo tanto, un experto en la materia que pretendiese diseñar una secuencia alternativa para el método del documento D01 no requeriría un esfuerzo inventivo para llegar a la solución propuesta. Además, algunos de los documentos del estado de la técnica, relacionados con PCR a tiempo real para *Mycobacterium tuberculosis* y *Brucella* divulgan que estas regiones son una adecuada diana para amplificación.

Por otro lado, el conjunto de cebadores y sondas de hibridación no parecen producir un efecto sorprendente e inesperado que les pueda conceder una actividad inventiva.

El kit de la invención (reivindicaciones 13-15) carecería también de actividad inventiva por todo lo anteriormente expuesto.

En cuanto al procedimiento (reivindicación 7) son evidentes para un experto en la materia las etapas contempladas en él así como los marcadores utilizados (flucescina-6-carboxi y fluoróforo light cycler Red 640) que son marcadores comúnmente utilizados en técnica PCR a tiempo real.

Hoja adicional

En relación con las muestras utilizadas en la invención (reivindicación 8-12) se encuentran también contempladas en el estado de la técnica.

En conclusión, las reivindicaciones 1-15 no cumplen el requisito de actividad inventiva en el sentido del artículo 8 de la LP.