



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 370 432**

⑫ Número de solicitud: 200901759

⑬ Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

⑭

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑮ Fecha de presentación: **06.08.2009**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **15.12.2011**

⑰ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
15.12.2011

⑱ Solicitante/s: **Universidad de Málaga**
Plaza de El Ejido, s/n
29071 Málaga, ES
IFAPA

⑲ Inventor/es: **López Jimena, Benjamín;**
Alonso Sánchez, María Carmen;
García Rosado, María Esther;
Manchado Campaña, Manuel;
Infante Toscano, Carlos y
Borrego García, Juan José

⑳ Agente: **No consta**

㉑ Título: **Procedimiento, conjunto de cebadores y kit para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en peces asintomáticos.**

㉒ Resumen:

Procedimiento, conjunto de cebadores y kit para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en peces asintomáticos, utilizando la combinación de RT-PCR, RT-PCR anidada e hibridación en dot-blot. Para la RT-PCR se han diseñado cebadores específicos que amplifican un fragmento de 599 pares de bases de la región del precursor de VP2. Para la RT-PCR anidada se han diseñado cebadores internos que amplifican un fragmento de 191 pb. Para la hibridación se ha diseñado una sonda de ADN bicatenario marcada con digoxigenina a partir de los productos purificados de la RT-PCR anidada. Se han establecido condiciones óptimas para los diferentes pasos de amplificación del ARN, así como para la hibridación en dot-blot. La invención permite detectar este virus en tejidos del pez, incluyendo muestras de sangre, de forma rápida, fiable y eficaz. El procedimiento descrito es de aplicación en el sector de la acuicultura.

DESCRIPCIÓN

Procedimiento, conjunto de cebadores y kit para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en peces asintomáticos.

Sector de la técnica

La presente invención se refiere a un conjunto de cebadores, procedimiento y kit para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en peces asintomáticos, más concretamente a la aplicación de un procedimiento no destructivo ni cruento que comprende la combinación de RT-PCR, RT-PCR anidada, e hibridación en dot-blot; a los cebadores empleados en dicho procedimiento; y al kit que permite la realización de dicho procedimiento. La presente invención es de aplicación en el sector de la acuicultura, y más particularmente en el control del estado de salud de peces, tanto de poblaciones naturales como cultivadas.

Estado de la técnica

La enfermedad de la necrosis pancreática infecciosa (IPN) es una patología vírica aguda, altamente contagiosa y de muy amplia distribución geográfica que afecta a peces cultivados y salvajes tanto de agua dulce como de ambientes marinos, así como a especies diádromas. Esta enfermedad, que puede cursar como brotes epizooticos alcanzando alta tasa de morbilidad y mortalidad, ha sido descrita en los cinco continentes, siendo más frecuente en Europa, en el Lejano Oriente, y en América del Norte y Sur (Rodríguez *et al.*, 2003. Adv. Virus Res., 62:113-165).

El agente causal de esta enfermedad se ha denominado IPNV, un virus perteneciente al género *Aquabirnavirus*, familia *Birnaviridae*. Este virus posee un virión icosaédrico desnudo con dos segmentos de ARN bicatenario como material genético. Las principales proteínas de la nucleocápside son la VP2 (proteína mayoritaria) y VP3 (proteína interna de la cápside) (Dobos, 1995. Ann. Rev. Dis., 5:25-54). El uso de técnicas inmunológicas ha demostrado la existencia de diversos serogrupos y serotipos dentro del IPNV, aunque estas técnicas no tipifican aislados de orígenes de peces marinos (Riji John and Richards, 1999. J. Gen. Virol., 80:2061-2065). Por estas razones, recientemente se han aplicado técnicas moleculares para la clasificación de los aquabirnavirus (Blake *et al.*, 2001. Dis. Aquat. Org., 45:89-102). Se han establecido seis genogrupos (I a VI) comprendiendo 10 genotipos (I.1, I.2, II, III.1, II.2, IV.1, IV.2, V.1, V.2 y VI) basándose en los análisis de restricción (RFLP) y secuenciación del gen que codifica la proteína VP2 de la cápside del virus (Cutrin *et al.*, 2004. Appl. Environ. Microbiol., 70:1059-1067). Posteriormente, se ha establecido un séptimo genogrupo (VII) en base a la secuencia de la región de unión entre los genes de VP2 y VP4 (Nishizawa *et al.*, 2005. J. Gen. Virol., 86:1973-1978).

IPNV causa infecciones clínicas en alevines y juveniles de peces salvajes y cultivados, y los supervivientes de la infección pueden convertirse en portadores asintomáticos del virus (Imajoh *et al.*, 2005. Fish Shellfish Immunol., 18:163-177). El método de análisis estándar recomendado por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) en 2003 se basa en los siguientes puntos:

1. Aislamiento del IPNV en cultivo celular a partir de los tejidos de peces enfermos. Identificación del IPNV aislado en cultivo celular, mediante neutralización con anticuerpos específicos o por inmunofluorescencia indirecta o por un ensayo de inmunoenzima.
2. Detección directa del IPNV en tejidos de peces afectados por inmunofluorescencia indirecta, ensayo de inmunoenzima, por coagulación o por inmunohistoquímica.

Como puede observarse, el método recomendado implica una destrucción de tejidos y muerte del pez analizado, y asimismo se requiere mucho tiempo para los análisis. Existe una demanda, por parte de empresas del sector de la Acuicultura, para el desarrollo de sistemas rápidos y eficaces de detección de IPNV y que eviten el sacrificio de peces con el objeto de establecer un plan de saneamiento de portadores inaparentes.

Los sistemas más efectivos de detección de microorganismos por métodos moleculares, que no requieren su cultivo, están basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis y Faloona, 1987. Meth. Enzymol. 155: 335-350). La presente invención se refiere a un protocolo basado en técnicas de PCR para la detección del virus IPNV, así como los cebadores específicos para ello. Además, éste se combina con un protocolo de hibridación en dot-blot, utilizando una sonda de ADN bicatenario (ADNbc), para aumentar la sensibilidad de la técnica y como herramienta de confirmación de los productos de amplificación. Este método, al ser no destructivo, evitaría la consiguiente pérdida valiosa del cultivo de peces, como por ejemplo ejemplares reproductores.

Descripción detallada de la invención

El problema técnico planteado es lograr un método rápido y fiable que permita la detección específica de IPNV en muestras de sangre de peces. El procedimiento no destructivo propuesto se basa en la aplicación de dos técnicas moleculares, una RT-PCR anidada y una hibridación dot-blot para la detección del IPNV a partir de sangre de peces portadores inaparentes del virus. Para la RT-PCR se han diseñado cebadores específicos que amplifican un fragmento de 599 pares de bases (pb) de la región del precursor de VP2 (proteína mayoritaria de la cápside vírica) dentro del

gen vírico que codifica la poliproteína. Para la RT-PCR anidada se han diseñado cebadores internos que amplifican un fragmento de 191 pb. Mediante esta técnica hemos conseguido detectar IPNV en menos de un día de trabajo y sin necesidad de realizar cultivos celulares de las muestras. A partir de este producto de amplificación de 191 pb, se ha diseñado una sonda de ADNbc marcada con digoxigenina para hibridar en dot-blot los productos obtenidos mediante las reacciones de RT-PCR y RT-PCR anidada.

De este modo, constituye un objeto de la presente invención un procedimiento para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en peces asintomáticos, incluyendo muestras de sangre, que comprende las siguientes etapas:

- a. Extracción y purificación del ARN total de las muestras.
- b. Amplificación mediante RT-PCR de una secuencia de 599 pb de la región del precursor de la proteína VP2 utilizando un conjunto de cebadores en el cual al menos dos de los cebadores de dicho conjunto presentan secuencias que comprenden SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2. Preferentemente, dicho conjunto está formado por un primer cebador cuya secuencia comprende SEQ ID NO 1 y por un segundo cebador cuya secuencia comprende SEQ ID NO 2. Más preferentemente, la secuencia de nucleótidos del primer cebador es idéntica a SEQ ID NO 1 y la secuencia de nucleótidos del segundo cebador es idéntica a SEQ ID NO 2.
- c. Amplificación de un fragmento de 191 pb de los productos resultantes de la primera amplificación mediante RT-PCR anidada utilizando un conjunto de cebadores en el cual al menos dos de los cebadores de dicho conjunto presentan secuencias que comprenden SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4. Preferentemente, dicho conjunto está formado por un primer cebador cuya secuencia comprende SEQ ID NO 3 y por un segundo cebador cuya secuencia comprende SEQ ID NO 4. Más preferentemente, la secuencia de nucleótidos del primer cebador es idéntica a la SEQ ID NO 3 y la secuencia de nucleótidos del segundo cebador es idéntica a la SEQ ID NO 4.
- d. Obtención de sondas de ADN bicatenario a partir de los productos resultantes de la segunda amplificación (RT-PCR anidada).
- e. Hibridación en dot-blot de los productos resultantes de la segunda amplificación (RT-PCR anidada) usando las sondas de ADN bicatenario obtenidas en la etapa (d).
- f. Detección de los productos hibridados mediante inmunoensayo.

Constituyen otro objeto de la presente invención los conjuntos de cebadores referidos anteriormente y empleados en las amplificaciones mediante RT-PCR y RT-PCR anidada.

Constituye otro objeto de la presente invención un kit para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en peces asintomáticos, incluyendo muestras de sangre, que comprende al menos unos conjuntos de cebadores tal y como los antes referidos.

Preferentemente el kit comprende:

- a. Conjunto de cebadores para la amplificación mediante RT-PCR de una secuencia de 599 pb de la región del precursor de la proteína VP2 en el cual al menos dos de los cebadores de dicho conjunto presentan secuencias que comprenden SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2; preferentemente, dicho conjunto está formado por un primer cebador cuya secuencia comprende SEQ ID NO 1 y por un segundo cebador cuya secuencia comprende SEQ ID NO 2; más preferentemente, la secuencia de nucleótidos del primer cebador es idéntica a la SEQ ID NO 1 y la secuencia de nucleótidos del segundo cebador es idéntica a la SEQ ID NO 2;
- b. Conjunto de cebadores para la amplificación de un fragmento de 191 pb de los productos resultantes de la primera amplificación mediante RT-PCR anidada en el cual al menos dos de los cebadores de dicho conjunto presentan secuencias que comprenden SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4; preferentemente, dicho conjunto está formado por un primer cebador cuya secuencia comprende SEQ ID NO 3 y por un segundo cebador cuya secuencia comprende SEQ ID NO 4; más preferentemente, la secuencia de nucleótidos del primer cebador es idéntica a la SEQ ID NO 3 y la secuencia de nucleótidos del segundo cebador es idéntica a la SEQ ID NO 4; y
- c. una muestra control para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV).

Descripción de los dibujos

Figura 1.- Alineamiento de la secuencia de los productos de la RT-PCR y RT-PCR anidada con secuencias publicadas de aislados de IPNV: IPNV Ab (L40580), IPNV VR-299 (L40584), solevirus (EF493156), IPNV Sp (AF342728). Se indica la localización de los cebadores diseñados para la RT-PCR (SoleSegA-F2 y SoleSegA-R2) y la de los cebadores para la nested RT-PCR (R23 y R24).

ES 2 370 432 A1

Figura 2.- Especificidad de la RT-PCR (A) y RT-PCR anidada (B) para la detección de IPNV. M: marcador molecular de 100 pb XIV (Roche); 1: control negativo, agua-DEPC; 2: VNNV; 3: VHSV; 4: control negativo, ARN de células BF-2 no inoculadas; 5: IPNV Ab; 6: solevirus; 7: IPNV Sp; 8: IPNV VR-299.

Figura 3.- Detección específica de diferentes genotipos de IPNV por la técnica de hibridación en dot-blot a partir de los productos de (A) RT-PCR y (B) RT-PCR anidada. C1 y C2 son controles negativos consistentes en el reactivo de PCR y de ARN extraído de células BF-2 sin inocular, respectivamente.

Figura 4. Porcentajes de detección de IPNV a partir de muestras de sangre de especímenes asintomáticos de urtas y pargos. Las muestras fueron analizadas mediante RT-PCR anidada y combinación de RT-PCR anidada e hibridación en dot-blot.

Modos de realización de la invención

A continuación se describe detalladamente, y sin carácter limitativo, un modo de realización de la invención.

Extracción y purificación del ARN total de las muestras

Para la extracción del ARN total se utilizó un kit comercial (QIAamp® RNA Blood Mini Kit, QIAGEN).

Descripción detallada del protocolo de PCR

Los cebadores utilizados se diseñaron con la ayuda del programa informático OLIGO 6.7.1. La información de los cebadores aparece resumida en la Tabla 1. Para la detección específica de IPNV se diseñó la pareja de cebadores externos SoleSegA-F2 y SoleSegA-R2, que se encuentran en las posiciones 832 y 1431, respectivamente, de la secuencia del segmento A del IPNV Sp (genotipo III. 1, GenBank n° de acceso AF342728) (Fig. 1). Estos cebadores amplifican un fragmento de 599 pb del gen que codifica la poliproteína, concretamente en la secuencia correspondiente al precursor de la proteína VP2 (pVP2). Los cebadores internos, R23 y R24, se diseñaron atendiendo a la secuencia del segmento A del solevirus (GenBank n° de acceso EF493156), y generan un amplicón de 191 pb.

Las RT-PCR se realiza en un solo paso utilizando el sistema SuperScript™ III One-Step RT-PCR System Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen). La mezcla de reacción (50 µl, volumen final) contiene 25 µl de 2x Reaction Mix [desoxinucleótidos (dNTPs) 0,2 mM, MgSO₄ 1,6 mM], 0,45 pmol/µl de cada cebador, y 2 µl de la enzima SuperScript™ III RT/Platinum Taq Mix. Como molde se emplea 1 µg de ARN del virus. Los controles negativos utilizados fueron ARN total extraído de células BF-2 no inoculadas, y agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).

TABLA 1

Cebadores diseñados para la detección específica de IPNV por la técnica de RT-PCR y RT-PCR anidada

Virus	Técnica	Nombre	Secuencia	Amplicón (pb)
IPNV	RT-PCR	SoleSegA-F2	5'-GTGCTGGCCACAAACGACAAC-3'	599
		(SEQ ID NO 1)		
	RT-PCR anidada	SoleSegA-R2	5'-AATTGGTCTGCCGTTTCCTA-3'	191
		(SEQ ID NO 2)		
	RT-PCR anidada	R23	5'-TCAACCAGCAGACAGCAATCGACAATG-3'	191
		(SEQ ID NO 3)		
	RT-PCR anidada	R24	5'-GTTTGGGATCAGCTCGTAGTTGGACAC-3'	191
		(SEQ ID NO 4)		

Las reacciones de RT-PCR consistieron en un primer paso de síntesis de ADNc a 45°C durante 30 min, seguido de una desnaturalización a 94°C durante 2 min. A continuación se llevaron a cabo 35 ciclos de amplificación consistentes en una desnaturalización a 94°C durante 15 s, anillamiento a 58°C durante 30 s y extensión a 68°C durante 30 s. Finalmente se realizó un ciclo de extensión a 68°C durante 10 min.

Para la realización de reacciones de RT-PCR anidada se utilizaron como molde 2 µl de los productos resultantes de la primera amplificación. Las reacciones se llevaron a cabo en una mezcla de 50 µl (volumen final) que contenía: 5 µl de dNTPs 0,2 mM (Roche); 1x buffer (Tris HCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, pH 8,3 20°C); 0,3 pmol/µl de cada cebador, y 2,5 U de la enzima Taq DNA Polymerase (Roche). Las segundas amplificaciones consistieron en una fase inicial de desnaturalización a 94°C durante 5 min, seguida de 35 ciclos compuestos por una desnaturalización a 94°C durante 30 s, anillamiento a 58°C durante 30 s, y extensión a 72°C durante 30 s. La extensión final se realizó a 72°C durante 5 min.

La visualización de los productos de amplificación se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. Como marcador molecular se utilizó ADN de 100 pb MWXIV (Roche). La confirmación de los productos de amplificación se realizó mediante secuenciación directa de los mismos, utilizando el Analizador Genético ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems) y los cebadores específicos de cada reacción.

Con el fin de evaluar la especificidad de las técnicas desarrolladas para la detección de IPNV se realizaron ampli-ficaciones en las que se utilizaron ARN total extraído de cultivos celulares inoculados con aislados pertenecientes a diferentes genogrupos de IPNV, así como de cultivos celulares inoculados con los virus VHSV (virus de la septicemia hemorrágica viral) y VNNV genotipo SJNNV (virus de la necrosis nerviosa viral). Los resultados se especifican en la Fig. 2.

Para la determinación del límite de sensibilidad se determinó el título de IPNV, para ello se extrajo el ARN total del lisado vírico titulado, y se realizaron baterías de diluciones decimales seriadas que se utilizaron como molde en diversas reacciones de RT-PCR. El límite de sensibilidad de la técnica varía desde 10-100 Unidades Formadoras de Placas (UFP)/ml para RT-PCR y desde 1-10 UFP/ml para la RT-PCR anidada.

Obtención de sondas de ADN específicas

Los productos resultantes de la amplificación mediante RT-PCR anidada del ARN de solevirus, fueron clonados en el vector pCR®4-TOPO® y posteriormente secuenciados. El mareaje de las sondas con digoxigenina (DIG) se llevó a cabo mediante reacciones de PCR usando estos plásmidos como molde en reacciones de amplificación que contenían DIG-11-dUTP (Roche).

Dichas reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 100 µl. La mezcla de reacción está compuesta por 10 µl de la solución PCR DIG Labeling Mix (Roche) (dATP, dCTP, dGTP 0,2 mM; dTTP 0,19 mM; DIG-11-dUTP 0,01 mM), 0,5x Colorless GoTaq® Flexi Buffer, MgCl₂ 4,5 mM, 0,15 pmol/µl de los cebadores internos específicos (Tabla 1), 2,5 U de GoTaq® DNA Polymerase (Promega), y 0,5 µg de ADN plasmídico.

El perfil de amplificación está constituido por un ciclo de desnaturalización a 95°C durante 2 min, seguido de 35 ciclos consistentes en una desnaturalización a 95°C durante 1 min, 1 min de anillamiento a 53°C y 10 min de extensión a 72°C. Finalmente se llevó a cabo una extensión de 10 min a 72°C y las reacciones se mantuvieron durante 5 min a 25°C.

Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio, y fueron utilizados como sondas sin una purificación posterior. Las sondas marcadas se conservaron a -20°C hasta su utilización.

Hibridación en dot-blot

Se desarrolló un método de hibridación en dot-blot utilizando sondas de ADN bicatenario (ADNbc) obtenidas según se ha indicado anteriormente. Esta técnica se ha aplicado en combinación con la RT-PCR o RT-PCR anidada descritas anteriormente con el fin de incrementar la sensibilidad en la detección del genoma viral.

Se analizaron 10 µl de los productos de RT-PCR o RT-PCR anidada previamente desnaturalizados mediante ebullición durante 5 min. Estas muestras se enfriaron rápidamente en hielo y se dispusieron, empleando los equipos MilliBlot-D o MilliBlot-S (Millipore), sobre membranas de nylon (Hybond-N+, Amersham Biosciences). Las membranas fueron previamente humedecidas con agua bidestilada estéril y tampón salino sodio-citrato (SSC) 5x (SSC 1x: NaCl 50 mM; citrato sódico 15 mM; pH 7). La fijación se realizó con luz UV (2 pulsos de 700 µJ/cm²) (Ultraviolet Crosslinker, Amersham Biosciences).

La optimización del protocolo de hibridación en dot-blot incluyó la evaluación de diferentes temperaturas de prehibridación e hibridación (45, 51, 57 y 68°C), así como la necesidad de utilizar formamida al 50% en el tampón de hibridación. Las condiciones óptimas de hibridación fueron 57°C y formamida al 50% en el tampón de hibridación, para garantizar la total eliminación de posibles inespecificidades ocasionadas por la utilización de ARN extraído de

células BF-2 sin inocular como molde de las reacciones basadas en la RT-PCR. La prehibridación se realizó durante 1-6 h con tampón de hibridación (SSC 5x; Sarcosyl 0,1%; SDS 0,02%; Stock Blocking 2% - Roche; formamida 50% - Roche) precalentado a la temperatura de ensayo. La sonda se desnaturalizó mediante ebullición durante 5 min. Una vez enfriada rápidamente en hielo se diluyó en tampón de hibridación precalentado. La hibridación se llevó a cabo a la temperatura ensayada en un horno de hibridación (Amersham Pharmacia, Biotech) durante 16 h en agitación. Una vez finalizada, la sonda diluida se recogió y se guardó a -20°C para posteriores usos.

Posteriormente, se realizaron dos lavados sucesivos en agitación continua con tampones suplementados con diferentes concentraciones de sales (SSC 2x y SSC 1x a temperatura ambiente durante 5 y 15 min, respectivamente, y SSC 0,1x a la temperatura de hibridación durante 15 min).

Detección de los productos hibridados

La detección de los productos hibridados se realizó mediante inmunoensayo siguiendo las instrucciones de los sistemas de mareaje (DIG-11-dUTP, Roche) y de detección con DIG (anti-DIG-AP, Roche) utilizados. El revelado de la actividad fosfatasa alcalina (AP) en la membrana se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia, utilizando CSPD (Roche) como sustrato de la AP, y la película radiográfica Hyperfilm ECL (Amersham, Biosciences). La exposición de la película a la reacción luminiscente se realizó en un casete (Hypercassette™, Amersham Biosciences) durante distintos tiempos de sobreexposición (entre 4 y 30 min).

Para evaluar la especificidad del sistema de hibridación desarrollado la sonda ADNbc diseñada se hibridó con productos de amplificación obtenidos mediante RT-PCR y RT-PCR anidada, utilizando como molde ARN extraído de células BF-2 y SSN-1 inoculadas con VHSV y VNNV (genotipo SJNNV), respectivamente. La especificidad de la sonda diseñada para la detección de IPNV se evaluó utilizando el genogrupo II (IPNV Ab), y genotipos I.2 (IPNV VR-299) y III.1 (IPNV Sp). Los resultados se expresan en la Fig. 3.

La sensibilidad de la técnica se estimó atendiendo al título vírico según la metodología descrita en el apartado de sensibilidad de RT-PCR y RT-PCR anidada. Como muestras se utilizaron los productos de amplificación de reacciones de RT-PCR o RT-PCR anidada. La sensibilidad de la hibridación en dot-blot es similar a los métodos basados en PCR, con un límite de sensibilidad de 10-100 UFP/ml para la hibridación en dot-blot procedente de las reacciones de RT-PCR y de 1-10 UFP/ml para la hibridación en dot-blot procedente de las reacciones de RT-PCR anidada.

Ejemplo 1

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante el siguiente ejemplo de aplicación.

Detección de IPNV a partir de peces asintomáticos

Las técnicas de diagnóstico desarrolladas en la presente invención se han aplicado a la detección de portadores asintomáticos en poblaciones de pargo y urta capturadas del medio natural y estabuladas como pre-reproductores. Con este fin se realizó la extracción de sangre a partir de un número representativo de animales. La sangre fue inmediatamente mezclada con heparina (0,1%, concentración final) y conservada a 4°C hasta su procesamiento (no más de 24 h).

El ARN total de las muestras de sangre se extrajo utilizando el sistema comercial QIAamp® RNA Blood Mini Kit (QIAGEN) a partir de 200 µl de sangre tratada con heparina siguiendo las instrucciones de la casa comercial. El ARN se cuantificó mediante espectrofotometría, a 260 nm, empleando el ND-1000 (NanoDrop), y se conservó a -80°C hasta su análisis mediante la combinación de las técnicas de amplificación e hibridación en dot-blot descritas en la presente invención. El análisis de las muestras de sangre se realizó mediante la combinación de una RT-PCR, RT-PCR anidada e hibridación en dot-blot de los productos de RT-PCR anidada con la sonda desarrollada.

Ninguna de las muestras de sangre analizadas mediante RT-PCR resultó positiva para la detección de IPNV. En la Figura 4 se muestra los porcentajes de individuos portadores de IPNV en función del método de detección utilizado (RT-PCR anidada o combinación de RT-PCR anidada e hibridación en dot-blot de los productos de amplificación de la RT-PCR anidada).

La aplicación de RT-PCR anidada permitió la detección de IPNV en un 53,1% de las urtas analizadas. Los ensayos basados en la combinación de RT-PCR anidada e hibridación en dot-blot de los productos de amplificación han permitido la detección del genoma de IPNV en todas las muestras de urta analizadas (Figura 4). En el caso de la población de pargos, la utilización de la RT-PCR anidada permitió la detección de IPNV en hasta un 77,8% de animales analizados. La combinación de RT-PCR anidada e hibridación permitió la detección de IPNV en un 94,4% de las muestras analizadas.

REIVINDICACIONES

1. Conjunto de cebadores para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en peces asintomáticos **caracterizado** por que al menos dos de los cebadores de dicho conjunto presentan secuencias idénticas a SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2.

2. Conjunto de cebadores para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en peces asintomáticos según la reivindicación anterior **caracterizado** por que dicho conjunto está formado por un primer cebador cuya secuencia es idéntica a SEQ ID NO 1 y por un segundo cebador cuya secuencia es idéntica a SEQ ID NO 2.

3. Conjunto de cebadores para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en peces asintomáticos **caracterizado** por que al menos dos de los cebadores de dicho conjunto presentan secuencias idénticas a SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4.

4. Conjunto de cebadores para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en peces asintomáticos según la reivindicación anterior **caracterizado** por que dicho conjunto está formado por un primer cebador cuya secuencia es idéntica a SEQ ID NO 3 y por un segundo cebador cuya secuencia es idéntica a SEQ ID NO 4.

5. Procedimiento para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en peces asintomáticos que comprende:

- a. Extracción y purificación del ARN total de las muestras,
- b. Amplificación mediante RT-PCR de una secuencia de 599 pb de la región del precursor de la proteína VP2 utilizando un conjunto de cebadores según la reivindicación 1 ó 2.
- c. Amplificación de un fragmento de 191 pb de los productos resultantes de la primera amplificación mediante RT-PCR anidada utilizando un conjunto de cebadores según la reivindicación 3 ó 4.
- d. Obtención de sondas de ADN bicatenario a partir de los productos resultantes de la segunda amplificación (RT-PCR anidada).
- e. Hibridación en dot-blot de los productos resultantes de la segunda amplificación (RT-PCR anidada) usando las sondas de ADN bicatenario obtenidas en la etapa (d).
- f. Detección de los productos hibridados mediante inmunoensayo.

6. Procedimiento para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en peces asintomáticos según la reivindicación anterior **caracterizado** por que la reacción de RT-PCR (b) se lleva a cabo en las condiciones de: 30 minutos a 45°C, 2 minutos a 94°C, 35 ciclos de 15 segundos a 94°C - 30 segundos a 58°C - 30 segundos a 68°C, y 10 minutos a 68°C.

7. Procedimiento para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en peces asintomáticos según la reivindicación 5 ó 6 **caracterizado** por que la reacción de RT-PCR anidada (c) se lleva a cabo en las condiciones de: 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C - 30 segundos a 58°C - 30 segundos a 72°C, y 5 minutos a 72°C.

8. Procedimiento para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en peces asintomáticos según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 **caracterizado** por que las sondas obtenidas son marcadas con digoxigenina (DIG).

9. Procedimiento para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en peces asintomáticos según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8 **caracterizado** por que la hibridación en dot-blot comprende:

- a. Desnaturalización de los productos de amplificación;
- b. Filtración de los productos desnaturalizados a través de membranas de nylon;
- c. Fijación con luz ultravioleta;
- d. Incubación a 57°C de 1-6 horas en tampón de hibridación con 50% de formamida; e
- e. Hibridación a 57°C durante 16 horas con la sonda de ADNbc desnaturalizada y marcada con digoxigenina.

ES 2 370 432 A1

10. Procedimiento para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en peces asintomáticos según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 **caracterizado** por que la detección de los productos hibridados mediante inmunoensayo comprende:

- 5 a. Lavados sucesivos en tampones con 2xSSC a temperatura ambiente (5 minutos), y repetir el proceso con 1xSSC durante 15 minutos a temperatura ambiente;
- b. Lavados a 57°C 15 minutos con 0,1xSSC;
- 10 c. Detección mediante inmunoensayo, utilizando un anticuerpo anti-DIG-AP; y
- d. Revelado de actividad AP mediante quimioluminiscencia con el sustrato CSPD.

15 11. Procedimiento para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en peces asintomáticos según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10 **caracterizado** por que las muestras son muestras de sangre.

20 12. Kit para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en peces asintomáticos mediante el procedimiento definido en cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11 que comprende:

- a. Conjunto de cebadores según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2,
- b. Conjunto de cebadores según cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4, y
- 25 c. Muestra control.

30

35

40

45

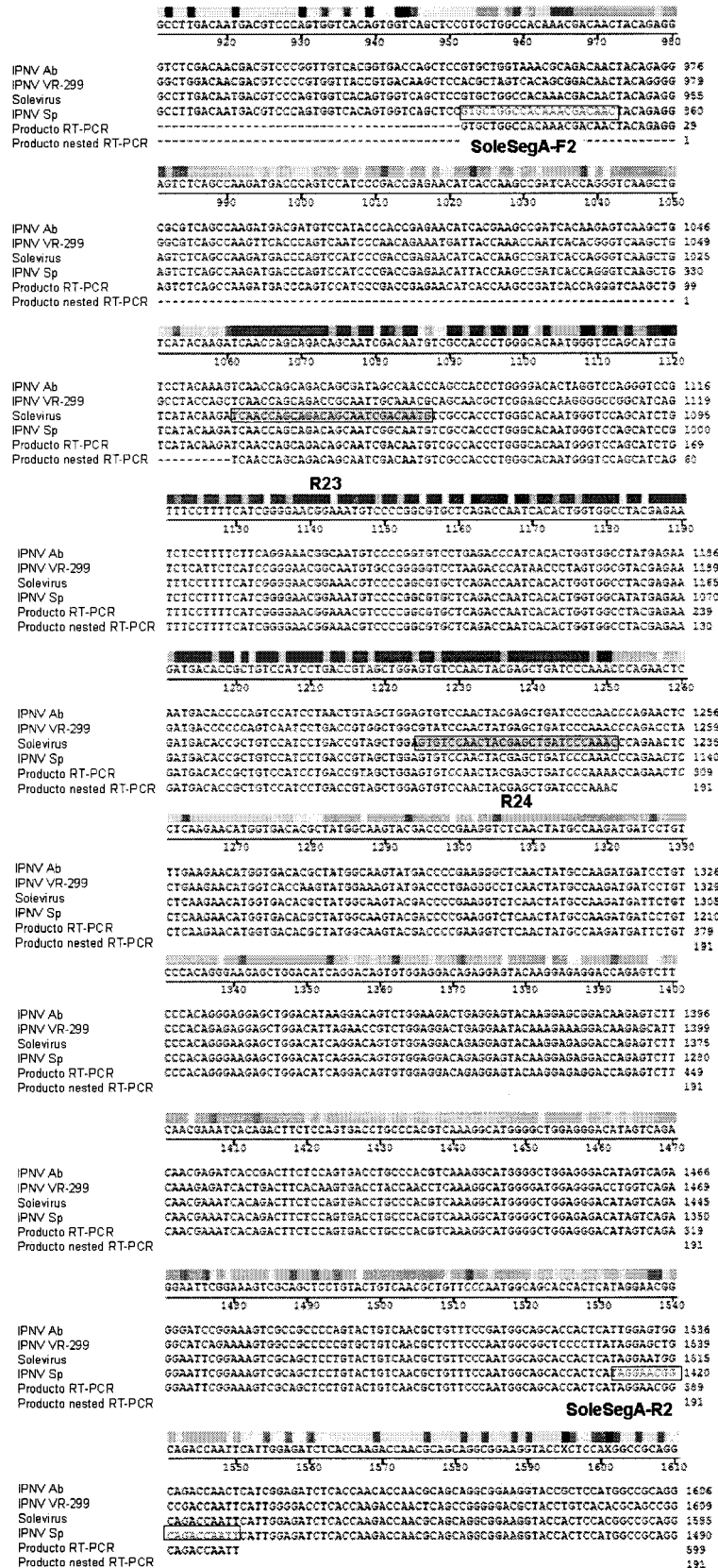
50

55

60

65

ES 2 370 432 A1



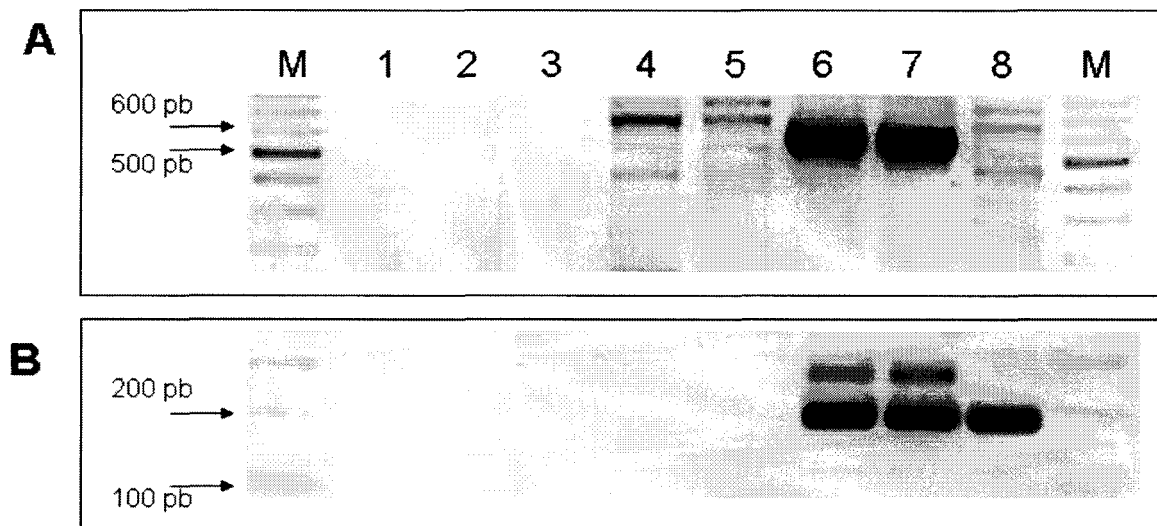


Figura 2

ES 2 370 432 A1

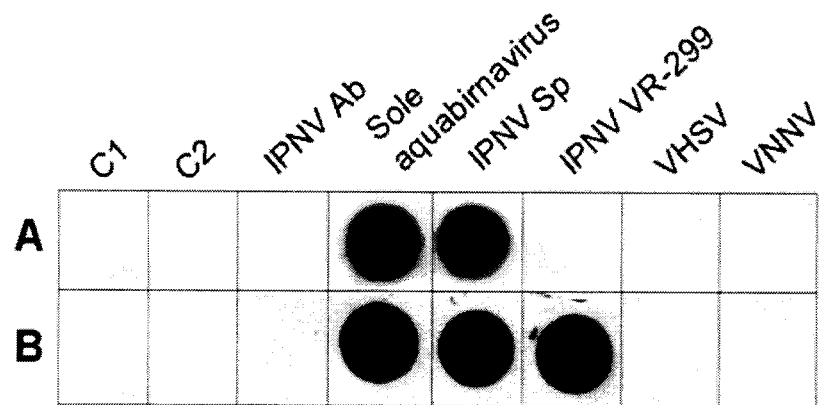


Figura 3

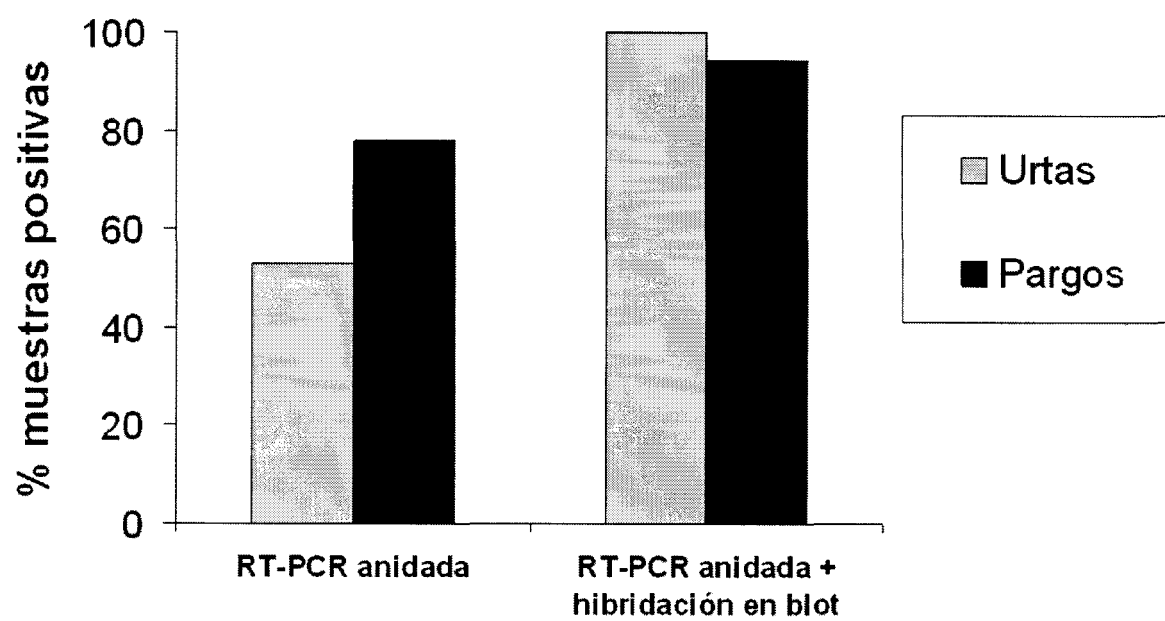


Figura 4

ES 2 370 432 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Málaga, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera

5 <120> Procedimiento, conjunto de cebadores y kit para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en peces asintomáticos

<130> SOLICITUD_UMA_IFAPA

10

<160> 4

<210> 1

15 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <223> SoleSegA-F2

<400> 1

25 **gtgctggcca caaacgacaa c** 21

<210> 2

<211> 19

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> SoleSegA-R2

35

<400> 2

aattgggtctg ccgttccta 19

40 <210> 3

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45

<223> R23

<400> 3

50 **tcaaccagca gacagcaatc gacaatg** 27

<210> 4

<211> 27

55 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> R24

60

<400> 4

gtttgggatc agctcgtagt tggacac 27

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200901759

②② Fecha de presentación de la solicitud: 06.08.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	GARCÍA-ROSADO, E., CANO, I., MARTÍN-ANTONIO, B. et al. Co-occurrence of viral and bacterial pathogens in disease outbreaks affecting newly cultured sparid fish. International Microbiology. Septiembre 2007, Vol. 10, Nº 3, páginas 193-199. ISSN 1139-6709. <Doi: 10.2436/20.1501.01.27>	1-4,12
Y		5-11
Y	CANO, I., FERRO, P., ALONSO, M. C. et al. Development of molecular techniques for detection of lymphocystis disease virus in different marine fish species. Journal of Applied Microbiology. Enero 2007, Vol. 102, Nº 1, páginas 32-40. ISSN 1364-5072. <Doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03066.x>	5-11
X	RODRÍGUEZ, S., ALONSO, M., PÉREZ-PRIETO, S. I. Detection of infections pancreatic necrosis virus (IPNV) from leukocytes of carrier rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i> . Fish Pathology. Septiembre 2001, Vol. 36, Nº 3, páginas 139-146. ISSN 0388-788X.	1-4,12
Y		5-11
Y	PHROMJAI, J., BOONSAENG, V., WITHYACHUMNARNKUL, B. et al. Detection of hepatopancreatic parvovirus in Thai shrimp <i>Penaeus monodon</i> by <i>in situ</i> hybridization, dot blot hybridization and PCR amplification. Diseases of Aquatic Organisms. Octubre 2002, Vol. 51, Nº 3, páginas 227-232. ISSN 0177-5103.	5-11
X	LOPEZ-LASTRA, M., GONZÁLEZ, M., JASHES, M. et al. A detection method for infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) based on reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR). Journal of Fish Diseases. 1994, Vol. 17, Nº 3, páginas 269-282. ISSN 0140-7775.	1-4,12
Y		5-11
Y	WONGTEERASUPAYA, C., TONGCHUEA, W., BOONGSAENG, V. et al. Detection of yellow-head virus (YHV) of <i>Penaeus monodon</i> by RT-PCR amplification. Diseases of Aquatic Organisms. Diciembre 1997, Vol. 31, Nº 3, páginas 181-186. ISSN 0177-5103.	5-11
A	CUTRÍN, J. M., LÓPEZ-VÁZQUEZ, C., OLVEIRA, J. G. et al. Isolation in cell culture and detection by PCR-based technology of IPNV-like virus from leukocytes of carrier turbot, <i>Scophthalmus maximus</i> (L.). Journal of Fish Diseases. Diciembre 2005, Vol. 28, Nº 12, páginas 713-722. ISSN 0140-7775.	5,8-11

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
14.11.2011

Examinador
E. Relaño Reyes

Página
1/6

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

C12Q

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

INVENES, EPODOC, WPI, EMBLall, REGISTRY, HCAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, NPL, COMPNDX, INSPEC, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 14.11.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 3-12	SI
	Reivindicaciones 1, 2	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-12	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	GARCÍA-ROSADO, E. et al. International Microbiology. Septiembre 2007, Vol. 10, Nº 3, páginas 193-199.	09.2007
D02	CANO, I. et al. Journal of Applied Microbiology. Enero 2007, Vol. 102, Nº 1, páginas 32-40.	01.2007
D03	RODRÍGUEZ, S. et al. Fish Pathology. Septiembre 2001, Vol. 36, Nº 3, páginas 139-146.	09.2001
D04	PHROMJAI, J. et al. Diseases of Aquatic Organisms. Octubre 2002, Vol. 51, Nº 3, páginas 227-232.	04.10.2002
D05	LOPEZ-LASTRA, M. et al. Journal of Fish Diseases. 1994, Vol. 17, Nº 3, páginas 269-282.	1994
D06	WONGTEERASUPAYA, C. et al. Diseases of Aquatic Organisms. Diciembre 1997, Vol. 31, Nº 3, páginas 181-186.	30.12.1997
D07	CUTRÍN, J. M. et al. Journal of Fish Diseases. Diciembre 2005, Vol. 28, Nº 12, páginas 713-722.	12.2005

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

El objeto de la presente solicitud, es un procedimiento para la detección del virus de la necrosis pancreática (IPNV) que comprende: a) la extracción y purificación del ARN a partir de muestras de sangre; b) la amplificación de la secuencia de 599 pb comprendida entre las posiciones 831 y 1431 de VP2, mediante una RT-PCR con los cebadores de secuencias SEQ ID NO 1 y 2; c) la amplificación mediante RT-PCR anidada del producto anterior, utilizando los cebadores de secuencias SEQ ID NO 3 y 4; d) la obtención de sondas marcadas con digoxigenina a partir del producto resultante de la RT-PCR anidada; e) la hibridación mediante "dot blot" de los productos de la segunda amplificación, usando las sondas obtenidas en la etapa d); y f) la detección de los hibridados mediante inmunoensayo (reivindicaciones de la 5 a la 11). Además, también se incluyen las parejas de cebadores de secuencias SEQ ID NO 1 y 2 (reivindicaciones 1 y 2), y SEQ ID NO 3 y 4 (reivindicaciones 3 y 4), así como el kit que comprende estos cuatro cebadores junto con una muestra control (reivindicación 12).

En D01 se investigan los posibles causantes de infecciones microbiológicas en pargos, hurtas y sargos. Para ello se desarrollan diversos métodos de detección de distintas bacterias y virus, entre ellos el IPNV. Con el fin de detectar la presencia del IPNV, se diseñó una PCR anidada, en la que la primera pareja de cebadores (F2 y R2) presenta un 100% de identidad con los cebadores de SEQ ID NO 1 y 2 de la solicitud.

D02 demuestra que la combinación de la técnica de PCR con la hibridación en membrana, aumenta la sensibilidad de la misma. Con tal fin, realizó un estudio sobre la detección del virus LCDV mediante PCR y "dot blot" (también denominado "slot blot"). La sonda fue la propia secuencia amplificada, marcada con digoxigenina.

En D03 se anticipa un método de detección del IPNV mediante RT-PCR anidada. La primera PCR amplifica la región del nucleótido 162 al 1321 de VP2, y la segunda de la posición 568 a la 1181. Con este método, utilizando sangre como muestra, se detecta la presencia de IPNV en peces asintomáticos.

D04 desarrolla un método de detección del virus HPV mediante PCR y posterior hibridación. La hibridación mediante "southern blot" con el propio ADN amplificado y marcado con digoxigenina, disminuye el límite de detección de la técnica cien veces.

En D05 se divulgan cinco PCRs anidadas de VP2, con el fin de detectar la presencia del IPNV, siendo los cinco pares de cebadores capaces de detectar el IPNV y específicos de dicho virus. En este documento, se destaca que las PCRs anidadas aumentan la sensibilidad respecto a las PCRs. Aunque se realizan "southern blots" de las PCRs, éstos se utilizan para comprobar la especificidad de las mismas, y no para aumentar su sensibilidad.

D06 pone a punto un procedimiento de detección del YHV mediante RT-PCR y posterior "southern blot". Este último paso, hace que se incremente la sensibilidad del método cien veces.

En D07 se estudia la posibilidad de la detección del IPNV a partir de muestras de sangre en peces asintomáticos. Para ello, se realizó una RT-PCR de VP1, mejorándose la sensibilidad de la técnica, tanto mediante "southern blot" con sonda marcada con digoxigenina, como mediante una RT-PCR anidada.

1. NOVEDAD (Art. 6.1 LP 11/1986)

1.1. REIVINDICACIONES 1 Y 2

El objeto de las reivindicaciones 1 y 2, es el conjunto de cebadores para la detección del IPNV de secuencias SEQ. ID. NO. 1 y 2.

D01 divulga un método de detección del IPNV en peces mediante una RT-PCR anidada, en la que los cebadores F2 y R2 presentan un 100% de identidad respectivamente con las SEQ. ID. NO. 1 y 2.

En consecuencia, el objeto de las reivindicaciones 1 y 2, ha sido divulgado de manera inequívoca en D01, por lo que estas reivindicaciones no cumplen el requisito de novedad (Art. 6.1 LP 11/1986).

1.2. REIVINDICACIONES DE LA 3 A LA 12

Las reivindicaciones de la 3 a la 12 son nuevas (Art. 6.1 LP 11/1986).

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP 11/1986)

2.1. REIVINDICACIONES DE LA 5 A LA 11

La presente solicitud tiene por objeto, según las reivindicaciones 5 y 8, un procedimiento para la detección del IPNV en peces asintomáticos, que comprende:

- a) Extracción y purificación del ARN
- b) RT-PCR de VP2 con los cebadores de secuencias SEQ ID NO 1 y 2
- c) RT-PCR anidada con los cebadores de secuencias SEQ ID NO 3 y 4
- d) Obtención de sondas de ADN marcadas con digoxigenina a partir de los productos obtenidos en la RT-PCR anidada
- e) Hibridación en "dot blot" de los productos obtenidos en la RT-PCR anidada con las sondas de la etapa d)
- f) Detección de los hibridados mediante inmunoensayo.

D01, D03 y D05, divulgan diversos procedimientos de detección del IPNV en peces, mediante RT-PCRs anidadas de distintas zonas de VP2.

En el caso de D01, en la primera PCR se amplifica la misma región que en la RT-PCR del apartado b) y se utilizan los mismos cebadores (F2 presenta un 100% de identidad con SEQ ID NO 1 y R2 un 100% de identidad con SEQ. ID. NO. 2), amplificándose en la PCR anidada una región solapante con la de la solicitud (del nucleótido 941 al 1130 en la solicitud, y del 1061 al 1177 en D01).

En D03, la región amplificada en la RT-PCR es de la posición 162 a la 1321, y en la PCR anidada de la 568 a la 1181. Por lo tanto, la secuencia de la PCR anidada incluye toda la región amplificada en la etapa c) de la solicitud (nucleótidos del 941 al 1130).

Por último, en D05 se divulgan cinco RT-PCR anidadas de distintas zonas de VP2, entre las cuales, hay dos RT-PCRs que amplifican secuencias solapantes con la RT-PCR de la solicitud (las regiones 419-1076 y 571-1012).

A la vista de estos documentos, se considera que son conocidos en el estado de la técnica, distintos métodos de detección del IPNV en los que se amplifican mediante RT-PCRs anidadas, diversas regiones de VP2. Por lo tanto, y dado que la región amplificada en la solicitud no presenta un efecto técnico sorprendente, la elección para la amplificación de una u otra zona de este gen no se considera relevante, sino una de las alternativas que tendría en cuenta un experto en la materia a la hora de desarrollar dicho procedimiento. Además, en general, no se considera de especial dificultad técnica el diseño de los cebadores una vez elegida la diana a amplificar.

En consecuencia, la diferencia fundamental entre D01, D03 o D05 y la presente solicitud, es la adición unas etapas posteriores a la RT-PCR anidada, en las que se marca la región amplificada, para utilizarse como sonda en la hibridación con el propio producto de dicha PCR.

El efecto técnico es una mayor sensibilidad del procedimiento, pudiéndose determinar la presencia del IPNV en peces asintomáticos.

Por lo tanto, el problema a resolver, es el desarrollo de métodos de detección del IPNV de mayor sensibilidad.

D02, D04 y D06 muestran que la detección de los productos de PCR mediante la hibridación con sondas marcadas con digoxigenina, incrementa la sensibilidad de la técnica cien veces.

En el caso de D02 y D04, se utiliza como sonda el propio producto de la PCR, mientras que en D06 un fragmento del cDNA. Sin embargo, esta última diferencia no se considera relevante.

En consecuencia, se entiende que un experto en la materia, intentaría desarrollar un método de detección del IPNV en peces asintomáticos, mediante una RT-PCR anidada de VP2 (D01, D03 o D05) y la visualización mediante hibridación de los productos amplificados con una sonda marcada con digoxigenina (D02, D04 o D06) con una expectativa razonable de éxito.

Así, a la vista de los documentos D01 y D02, D03 y D04, o D05 y D06, se considera que las reivindicaciones 5 y 8, no presentan actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).

La reivindicación 6 concreta las temperaturas y tiempos de la RT-PCR, y la 7 las condiciones de la PCR anidada.

Un experto en la materia conoce cómo optimizar una PCR mediante el ajuste de las diferentes temperaturas y tiempos de sus ciclos, formando parte de la puesta a punto rutinaria de las PCRs.

Por consiguiente, las reivindicaciones 6 y 7 no tienen actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).

Por otro lado, el objeto de la reivindicación 9 es las etapas de hibridación del "dot blot", y el de la 10 las de detección de los productos hibridados.

Se entiende que dichas etapas y condiciones, son las rutinarias a la hora de realizar este tipo de técnicas, pudiéndose hacer alguna variación en las mismas debido a las características propias de cada secuencia.

Así, se considera que las reivindicaciones 9 y 10, tampoco cumplen el requisito de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).

En la reivindicación 11 se especifica que la muestra a analizar es sangre.

En el método divulgado en D03, se detecta la presencia de IPNV en peces asintomáticos, a partir de sangre periférica.

Aunque en D01 y D05 no se utiliza la sangre como muestra, ya se conoce la posibilidad de detectar los IPNV a partir de muestras de sangre, por lo que la diferencia no resulta relevante.

En consecuencia, la reivindicación 11 tampoco presenta actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).

2.2. REIVINDICACIONES DE LA 1 A LA 4

El objeto de la solicitud, es un conjunto de cebadores para la detección de IPNV en peces asintomáticos, caracterizado por que presentan las secuencias SEQ. ID. NO. 1 y 2 (reivindicaciones 1 y 2) o SEQ. ID. NO. 3 y 4 (reivindicaciones 3 y 4).

Dados los argumentos expuestos en el apartado 1.1., las reivindicaciones 1 y 2 no cumplen el requisito de actividad inventiva.

Además, tal y como se apunta en el apartado 2.1., al no considerarse relevantes las diferencias en las regiones amplificadas, ninguno de los cebadores presenta actividad inventiva, por ser su diseño una técnica sobradamente conocida por un experto en la materia.

Por lo tanto, las reivindicaciones 1 y 2, tampoco tienen actividad inventiva a la luz de los documentos D03 o D05, ni las reivindicaciones 3 y 4 cumplen dicho requisito a la vista de los documentos D01, D03 o D05 (Art 8.1 LP 11/1986).

2.3 REIVINDICACIÓN 12

La reivindicación 12 tiene por objeto, un kit que comprende los cebadores de secuencias SEQ. ID. NO. 1, 2, 3 y 4.

Dados los motivos expuestos en los puntos 2.1 y 2.2, en vista de D01, D03 o D05, la reivindicación 12 no presenta actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).