

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 976**

21 Número de solicitud: 200930440

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **10.07.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **12.01.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
12.01.2012

71 Solicitante/s: **Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica Edificio Bluenet Avda. Isaac Newton, 3 - 2ª, Parque Cartuja 41092 Sevilla, ES**

72 Inventor/es: **López Fernández, José Ramón; Sparagano, Olivier Andre Ettore; Navas Triano, José Ignacio y Herrán Moreno, Roberto de la**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Método de identificación de los patógenos de peces: *Photobacterium damsela*, *Tenacibaculum soleae*, *Tenacibaculum maritimum* y *Vibrio harveyi*.**

57 Resumen:

Método de identificación de los patógenos de peces: *Photobacterium damsela*, *Tenacibaculum soleae*, *Tenacibaculum maritimum* y *Vibrio harveyi* mediante PCR y RLB (*Reverse-line blot hybridization*), sondas y kit de detección.

ES 2 371 976 A1

DESCRIPCIÓN

Método de identificación de los patógenos de peces: *Photobacterium damsela*, *Tenacibaculum soleae*, *Tenacibaculum maritimum* y *Vibrio harveyi*.

La presente invención se encuentra dentro del campo de la biología molecular y la veterinaria y se refiere a la detección e identificación de las especies bacterianas, *Photobacterium damsela*, *Tenacibaculum maritimum*, *Tenacibaculum soleae* y *Vibrio harveyi*, todas ellas agentes etiológicos de enfermedades comunes en peces cultivados, y por tanto, de especial importancia en el campo de la acuicultura.

Estado de la técnica anterior

La acuicultura ha sido uno de los sectores de la producción animal que más rápidamente ha crecido en los últimos veinte años debido, fundamentalmente, a los avances tecnológicos. Sin embargo, el estrés causado por distintos factores ambientales, como variaciones en la temperatura o altas densidades de cultivo, hace que disminuyan los mecanismos de defensa de los peces. Estos factores, unidos a otros como, por ejemplo, la presencia en el medio de contaminación orgánica que favorece el aumento de patógenos oportunistas, pueden llevar a la aparición de brotes patológicos. Así pues, en los sistemas de cultivos intensivos y semi-intensivos, las enfermedades de origen infeccioso (virus, bacterias, hongos, etc.) son un factor limitante que puede determinar la calidad y seguridad del producto final. Un diagnóstico rápido y preciso de las enfermedades, la aplicación de medidas preventivas y unos estudios epidemiológicos precisos constituyen las claves para minimizar el impacto de las enfermedades en la acuicultura. Por eso, es necesario revisar los métodos actuales de diagnóstico para mejorar el manejo sanitario de las explotaciones acuícolas, y el control de las enfermedades.

Dentro de las patologías infecciosas, son las de origen bacteriano las más frecuentes y a menudo también las más problemáticas y difíciles de controlar. En concreto son muy frecuentes cuatro especies de bacterias gram negativas patógenas de peces, que pueden aparecer aisladas o conjuntamente en un episodio de mortalidad: *Photobacterium damsela*, *Tenacibaculum maritimum*, *Tenacibaculum soleae* y *Vibrio harveyi*.

Photobacterium damsela comprende dos subespecies fenotípicamente distintas y que desarrollan distintas enfermedades, aunque ambas han sido asociadas con enfermedades en animales marinos. *P. damsela* subsp. piscicida (antes *Pasteurella piscicida*) es el agente etiológico de la pasteurellosis, una enfermedad caracterizada por la ausencia de lesiones externas y la presencia de hemorragias y granulomas en hígado, riñón y bazo. Es una de las enfermedades más devastadoras en acuicultura marina, causando mortalidades masivas en muchas especies de peces con una distribución mundial (Zorrilla *et al.*, 1999, *Journal of fish diseases* 22:167-172; Romalde *et al.*, 2002, *Systematic and Applied Microbiology* 25: 544-550, Toranzo *et al.*, 2005, *Aquaculture* 246: 37-61). Por otro lado, la subespecie *P. damsela* subsp. *damsela* (antes *Vibrio damsela*) comprende cepas que producen úlceras cutáneas y septicemia hemorrágica en un amplio rango de peces. Aunque generalmente es descrito como un patógeno secundario, algunos aislados pueden ser patógenos primarios en peces e incluso en humanos (Fouz *et al.*, 2000, *Journal of Applied Microbiology* 88:531-535, Fouz *et al.*, 1992, *FHS/AFS Newsletter* 20:3-4, Shin *et al.*, 1996, *Clinical Infectious Diseases* 22:856-857). La identificación de esta especie se puede realizar mediante cultivo y caracterización bioquímica (API 20E, API CH50), mediante técnicas inmunológicas (aglutinación, ELISA), o mediante métodos moleculares basados en la PCR, más sensibles y rápidos. En este sentido, Kvitt *et al.*, 2002, (*Diseases of Aquatic Organisms* 48:187-195) y Osorio *et al.*, 1999 (*Applied and Environmental Microbiology* 65(7): 2942-2946) desarrollaron protocolos de PCR con cebadores específicos para *P. damsela*, diseñados en el gen de ADN ribosómico 16S, mientras que Rajan *et al.*, 2003 (*Journal of Applied Microbiology* 95:1375-1380) lo hizo basándose en la secuencia del gen del polisacárido capsular. González *et al.*, 2004 (*Journal of Clinical Microbiology*, p1414-1419) diseñaron sondas basándose en los loci ureC (ureasa) y dly (síntesis de damselina) para la identificación de *P. damsela* subsp. *damsela* utilizando microarrays de ADN. Para la diferenciación de las dos subespecies, Osorio *et al.*, 2000 propusieron una PCR múltiple con primers dirigidos a los genes 16S y ureC. La diferenciación de las dos subespecies se hace en base a la ausencia o presencia del gen de la ureasa (ureC).

Tenacibaculum maritimum es el agente etiológico de la tenacibaculosis o flexibacteriosis, enfermedad ulcerativa de distribución mundial que afecta a gran número de especies de peces marinos y que tiene un considerable impacto económico en la acuicultura marina. La enfermedad fue descrita en 1977 por Masumura y Wakabayashi en Japón causando altas mortalidades en peces marinos cultivados. Se caracteriza por la aparición de cuadros ulcerativos en la superficie corporal del pez, erosión en aletas y boca, pudiendo llegar a causar en algunos casos cuadros septicémicos. El aislamiento de la bacteria a partir de las lesiones puede resultar complicada, pues es fácilmente ocultada o inhibida por el crecimiento de otras bacterias presentes en las mismas (Avendaño-Herrera *et al.*, 2006, *Diseases of Aquatic Organisms*, 71: 255-266). La identificación del patógeno se puede realizar en base a características morfológicas y bioquímicas, o mediante métodos moleculares. Toyama *et al.* 1996 (*Fish Pathology*, 31(1): 25-31) y Bader y Shotts 1998 (*Journal of Aquatic Animal Health*, 10(4): 311-319) diseñaron cebadores específicos que usaban como diana el gen del ARN ribosómico 16S, flanqueando fragmentos de 1088 pb y 400 pb. Otros autores desarrollaron métodos basados en la PCR, como PCR-ELISA (Wilson *et al.*, 2002, *Journal of Microbiological Methods* 51(33): 163-170), RT-PCR-EHA (Wilson y Carson, 2003, *Diseases of Aquatic Organisms* 54:127-134) y microarrays con sondas de ADN (Warsen *et al.*, 2004, *Applied and Environmental Microbiology* 70: 4216-4221).

Tenacibaculum soleae es un patógeno bacteriano recientemente descrito, aislado hasta el momento en ejemplares enfermos de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) en Galicia, España (Piñeiro-Vidal *et al.*, 2008, *International*

Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58(4):881-885). La identificación de esta especie se puede realizar en base a características morfológicas, bioquímicas y serológicas. No existe en la actualidad ningún método de diagnóstico rápido, basado en la PCR, específico para esta especie.

5 *Vibrio harveyi* (sinónimos: *Vibrio carchariae*, *Vibrio trachuri*) es un importante patógeno bacteriano, causante de vibriosis en un amplio número de vertebrados e invertebrados marinos. Particularmente afecta a los cultivos de estos últimos (langostinos peneídos, langostas, orejas de mar, etc.) en Asia y Sudamérica, causando mortalidades masivas que resultan en graves pérdidas económicas y constituyendo un importante factor limitante en el desarrollo de los mismos. Sin embargo también ha sido descrito causando grandes mortalidades en distintas especies de peces cultivados (lenguado, mero, besugo, etc.). Ha sido aislado también en ejemplares enfermos de distintas especies de tiburones, y causando gastroenteritis en humanos. Los síntomas que presentan los peces afectados van desde úlceras cutáneas hasta lesiones en los ojos, gastroenteritis, etc. (Austin y Zhang, 2006. *Letters in Applied Microbiology* 43:119-124). La identificación del patógeno mediante tests bioquímicos convencionales es problemática debido a la heterogeneidad fenotípica -y genotípica- de *V. harveyi* y a su estrecha relación con otras especies de vibrios como *V. parahaemolyticus*,
10 *V. alginolyticus* y *V. campbellii*. Gomez-Gil *et al.*, 2004 (*Microbiology* 150:1769-1777) mostraron que *V. harveyi* y *V. campbellii* eran indistinguibles en más de 100 características fenotípicas. Se han desarrollado varios métodos de identificación basados en la PCR. Así, Oakey *et al.*, 2003 (*Journal of Applied Microbiology*. 95:1293-1303) y Hernández y Olmos 2004 (*Applied Microbiology and Biotechnology* 63:722-727) desarrollaron protocolos de PCR con cebadores específicos para *V. harveyi* diseñados en el gen del ARN ribosómico 16S y en el gen lux N, respectivamente. Conejero y Hedreya, 2003 (*Journal of Applied Microbiology* 95:1293-1303) y Pang *et al.*, 2006 (*Letters in Applied Microbiology* 43 (3):249-255) hicieron lo propio utilizando como diana el gen toxR. No obstante, Oakey *et al.*, 2003. *Journal of Applied Microbiology* 95:1293-1303 reportaron casos de falsos positivos con cepas de *V. alginolyticus*, mientras que Conejero y Hedreya, 2003 (*Journal of Applied Microbiology* 95:1293-1303) han reportado casos de falsos negativos.

25 Aunque el gen ribosómico 16S es frecuentemente utilizado para la identificación de bacterias, la región intergénica 16S-23S es más variable y permite una mejor discriminación entre especies relacionadas, por lo que ha sido ampliamente utilizada para el diseño de cebadores para PCR y sondas específicas para hibridaciones (Barry *et al.*, 1991. *Genome Research* 1: 51-56; Lee *et al.*, 2002. *Marine Pollution Bulletin* 44:412-420; Hassan *et al.*, 2003. *Systematic and Applied Microbiology* 26:97-110; Osorio *et al.* 2005. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 636-645; Matsuyama *et al.*, 2006. *Fish Pathology* 41:105-112).

35 La técnica de hibridación inversa con sondas específicas o “Reverse-line blot hybridization” (RLB) es una poderosa técnica desarrollada por Kaufhold *et al.*, 1994. (*FEMS Microbiol. Lett.* 119:19-25) que permite la identificación simultánea de hasta 43 secuencias dianas distintas en 43 muestras, en un solo ensayo. La esencia de esta técnica es la hibridación de productos de PCR con sondas específicas, a fin de identificar diferencias en las secuencias amplificadas. Ha sido aplicada en la detección de múltiples especies de virus, bacterias y hongos, pero no para la identificación de patógenos bacterianos de peces.

40 La utilización de esta técnica permite, sin embargo, resolver el problema que plantea tener que identificar un alto número de microorganismos que causan enfermedades en peces cultivados y que pueden infectar conjuntamente a un individuo. Otra ventaja radica en que las sondas diseñadas pueden utilizarse conjuntamente con otras que hayan sido diseñadas en la misma región del genoma, para otros patógenos.

Descripción de la invención

45 La presente invención proporciona un método de identificación de las principales bacterias patógenas gram negativas que son agentes etiológicos frecuentes en acuicultura. La identificación del agente causal de patologías comunes en peces cultivados constituye una valiosa herramienta en la conducta terapéutica a emplear y para el control de calidad y sanitario.

50 El método aquí propuesto consiste en la utilización de sondas específicas, diseñadas o bien en la región intergénica de los genes ribosómicos 16S y 23S o bien en el extremo 5' del gen 23S, para la identificación de los patógenos antes mencionados mediante la técnica de hibridación inversa con sondas específicas o “Reverse-line blot hybridization” (RLB). En la presente invención, la región ribosomal intergénica 16S-23S, junto con parte de los genes ribosómicos 16S y 23S, son amplificadas mediante el empleo de cebadores universales que se unen a regiones conservadas de los extremos 3' del gen 16S y del 5' del gen 23S. Esto permite la amplificación a partir de bacterias de distintos géneros, entre los que se encuentran las bacterias detectadas por los métodos o el kit de la invención. Los cebadores universales flanquean regiones hipervariables que son amplificadas y detectadas por sondas específicas diseñadas por los autores de la presente invención, permitiendo la detección e identificación de las especies bacterianas *Photobacterium damsela*,
55 *Tenacibaculum maritimum*, *Tenacibaculum soleae* y *Vibrio harveyi*.

60 Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un método para la identificación de bacterias, de ahora en adelante primer método de la invención, que comprende:

- 65 a. extraer el ADN total de una muestra biológica aislada,
- b. poner en contacto la muestra a analizar con una mezcla de reacción, que contiene los cebadores para la amplificación de la región intergénica 16S-23S y parte de ambos genes ribosómicos flanqueantes,

ES 2 371 976 A1

- c. amplificar, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la región intergénica 16S-23S ribosomal y parte de ambos genes ribosómicos flanqueantes,
- d. identificar la presencia o ausencia de al menos una de las especies *Photobacterium damsela*, *Tenacibaculum maritimum*, *Tenacibaculum soleae* mediante RBL con al menos una de las sondas cuya secuencia consiste en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, respectivamente.

Un segundo aspecto se refiere a un método para la identificación de bacterias, de ahora en adelante segundo método de la invención, que comprende los pasos (a)-(c) del primer método de la invención, y además:

- d. identificar la presencia o ausencia simultánea de al menos dos de las especies *Photobacterium damsela*, *Tenacibaculum maritimum*, *Tenacibaculum soleae* y *Vibrio harveyi* mediante RBL con al menos dos de las sondas cuyas secuencias consisten en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, respectivamente.

Los organismos de las especies *Photobacterium damsela*, *Tenacibaculum maritimum*, *Tenacibaculum soleae* y *Vibrio harveyi* son bacterias gram negativas.

En esta memoria, *Photobacterium damsela* es un organismo celular del Superreino *Bacteria*, Phylum *Proteobacteria*, Clase *Gammaproteobacteria*, Orden *Vibrionales*, Familia *Vibrionaceae*, Género *Photobacterium*.

Tenacibaculum maritimum y *Tenacibaculum soleae* son organismo celulares del Superreino *Bacteria*, Phylum *Bacteroidetes*, Clase *Flavobacteria*, Orden *Flavobacteriales*, Familia *Flavobacteriaceae*, Género *Tenacibaculum*.

Vibrio harveyi es un organismo celular del Superreino *Bacteria*, Phylum *Proteobacteria*, Clase *Gammaproteobacteria*, Orden *Vibrionales*, Familia *Vibrionaceae*, Género *Vibrio*.

Los inventores demuestran, como puede verse en los ejemplos de la presente invención, que las sondas cuyas secuencias consisten en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 son específicas para cada una de las especies bacterianas *Photobacterium damsela*, *Tenacibaculum maritimum*, *Tenacibaculum soleae* y *Vibrio harveyi* respectivamente. Todas ellas han sido diseñadas para hibridar en regiones variables del espaciador ribosómico intergénico 16S-23S, excepto la sonda de *V. harveyi* que fue diseñada para hibridar sobre la parte inicial del extremo 5' del gen del ARN ribosómico 23S.

En esta memoria se entiende por “región intergénica 16S-23S ribosomal y parte de ambos genes ribosómicos flanqueantes” la región homóloga a la secuencia que se describe entre los nucleótidos de la posición 1390 de la región 16S del rRNA y la posición 456 del 23S del rRNA de *E. coli*, tal y como se describe en Lee *et al.*, 2002. (*Marine Pollution Bulletin* 44:412-420).

El término “homología”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la semejanza entre dos estructuras debida a una ascendencia evolutiva común, y más concretamente, a la semejanza entre dos o más secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Puesto que dos secuencias se consideran homólogas si tienen el mismo origen evolutivo, en general, se asume que valores superiores de similitud o identidad del 50% indicarían homología.

El término “identidad”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de nucleótidos o aminoácidos idénticos entre dos secuencias nucleotídicas o aminoácídicas que se comparan. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa GAG, incluyendo GAP (Devereux *et al.*, 1984. *Nucleic Acids Research* 12: 287 Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison, (WI); BLAST, BLASTP o BLASTN, y FASTA (Altschul *et al.*, 1999. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410).

Por tanto, cebadores universales capaces de amplificar al menos la región homóloga a la región definida como “región intergénica 16S-23S ribosomal y parte de ambos genes ribosómicos flanqueantes” en distintas especies bacterianas serán útiles para llevar a cabo los métodos de la presente invención. Por ejemplo, pero sin limitarnos, los cebadores cuya secuencia consiste en la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, descritos en 16/23S-F Lee *et al.*, 2002. (*Marine Pollution Bulletin* 44:412-120).

La especificidad de las sondas se evaluó utilizando 8 cepas de *P. damsela* subsp *piscicida* aisladas de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*), así como las cepas de referencia *P. damsela* subsp *damsela* CECT 626 y *P. damsela* subsp *piscicida* CECT 5895; 8 cepas de *T. maritimum* aisladas de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) y acedía (*Dicologlossa cuneata*) y la cepa de referencia CECT 4276; 8 cepas de *T. solaea* aisladas de rombo (*Scophthalmus rhombus*), lenguado senegalés y acedía, además de la cepa tipo LL04 12.1.7; 13 cepas de *V. harveyi* aisladas de lenguado senegalés y acedía, junto con las cepas de referencia CECT 525 y CECT 5156. Además, se utilizaron 47 cepas pertenecientes a otras especies, tanto próximas como alejadas filogenéticamente de las especies diana: *Photobacterium* spp., *Photobacterium leiognathi*, *Photobacterium angustum*, *Photobacterium phosphoreum*, *Vibrio* spp., *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *Vibrio campbellii*, *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio natriegens*, *Vibrio tubiashii*, *V. tapetis*, *V. splendidus*, *Aeromonas salmonicida* subsp *salmonicida*, *Pseudoalteromonas* spp., *Psychrobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas anguilliseptica*,

ES 2 371 976 A1

Pseudomonas aeruginosa, *Tenacibaculum* spp., *Tenacibaculum ovolyticum*, *Flavobacterium marinotypicum*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Polaribacter* spp. y *Escherichia coli*. Todas las cepas de las especies diana fueron correctamente identificadas, mientras que las cepas de las especies no diana dieron resultados negativos, con la excepción de la reacción cruzada entre la sonda de *V. harveyi* y la cepa *V. campbellii* CECT 523.

Sparagano *et al.*, (2002) secuenciaron parte del gen 23S de varias especies de vibrios, encontrando que las cepas tipo *V. harveyi* LMG 4044, *V. harveyi* LMG 7890 y *V. campbellii* CECT 523 tenían secuencias similares. Por otra parte la cepa ensayada para esta especie, *Vibrio campbellii* CECT 523, presenta una secuencia similar a *Vibrio harveyi* tanto en el gen 23S como en la región intergénica 16S-23S, por lo que esta región del genoma parece no prestarse a la diferenciación de estas dos especies.

La sensibilidad del método se determinó utilizando diluciones decimales seriadas de ADN extraído de cultivo puro de las cepas diana *P. damsela* subsp *piscicida* a321, *T. maritimum* a443, *T. soleae* a47 y *V. harveyi* a91. La concentración del mismo se determinó por espectrofotometría (absorbancia a 260 nm). El límite de detección fue de 10 pg en el caso de la sonda de *P. damsela*; 100 pg en el caso de las sondas de *T. maritimum* y *T. soleae*, y 1 pg en el caso de la sonda de *V. harveyi*.

La detección por hibridación inversa con sondas específicas, “Reverse-Line Blot hybridization” o RLB presenta la ventaja de que no es necesario partir de cultivos bacterianos puros. De este modo, y una vez realizada la validación de los cebadores y las sondas con muestras de ADN de las diferentes especies y subespecies, tal y como se describe en los ejemplos de la invención, se pueden identificar las distintas especies de bacterias patógenas simultáneamente con sondas específicas a partir de la amplificación de ADN de muestras no puras. Así, con los métodos de la presente invención es posible detectar las bacterias y grupos bacterianos mencionados, independientemente de la procedencia de las muestras. La muestra una vez tomada es pretratada para poder llevar a cabo una PCR y una posterior identificación de los amplicones mediante las sondas específicas descritas en la presente invención. Por tanto, en una realización preferida de los métodos de la invención, los cebadores para la amplificación de la región intergénica 16S-23S según el paso (b) son universales. En una realización aún más preferida, los cebadores empleados para la amplificación intergénica son las secuencias nucleotídicas que consisten en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2.

En esta memoria se entiende por “cebadores universales” aquellos que anillan en las regiones altamente conservadas de los genes ribosómicos 16S y 23S, de manera que permiten la amplificación del espaciador intergénico 16S-23S completo en un amplio rango de especies bacterianas, aunque éstas se encuentren filogenéticamente alejadas entre sí.

El término “filogenia” como aquí se usa se refiere a la relación histórica verdadera entre un conjunto de taxones.

Por “categoría taxonómica” se entiende el nivel de jerarquía utilizado para la clasificación de los organismos.

Las bacterias detectadas por los métodos de la presente invención pueden, en ocasiones, ser patógenas de varios organismos, incluyendo mamíferos humanos, y se pueden relacionar con enfermedades transmitidas por los alimentos. Por tanto, en una realización preferida de la invención, la muestra del paso (a) es una muestra biológica aislada de un organismo de interés.

Una muestra biológica aislada incluye, pero sin limitarnos, a células, tejidos y/o fluidos biológicos de un organismo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin. Preferiblemente en la presente invención, la muestra biológica aislada proviene de órganos internos, y más preferiblemente el órgano se selecciona de la lista que comprende: hígado, riñón, bazo o cualquiera de sus combinaciones. En otra realización preferida la muestra biológica aislada proviene, si están presentes, de úlceras o lesiones externas o internas.

Cuando la amplificación se realiza directamente a partir de tejidos del organismo que, de forma natural, presentan una microbiota propia, como es el caso de la piel, la branquia y el tubo digestivo, los microorganismos de interés compiten con otros por la unión a los cebadores y la consiguiente amplificación. De esta manera, los porcentajes de identificación de dichas bacterias disminuyen sensiblemente, siendo más adecuado, la identificación a partir de cultivos puros.

Así pues, en una realización aún más preferida de la invención, la identificación de las especies bacterianas *Photobacterium damsela*, *Tenacibaculum maritimum*, *Tenacibaculum soleae* y *Vibrio harveyi* se realiza a partir de cultivos puros.

Se han detectado casos de septicemia en humanos causada por *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (Shin *et al.*, 1996. *Clinical Infectious Diseases* 22:856-857), y de gastroenteritis provocada por *V. harveyi*. Sin embargo, como se ha dicho, *Photobacterium damsela* es el agente causal de la pasteurelosis en peces de aguas frías y templadas, *Tenacibaculum maritimum* es el agente etiológico de la tenacibaculosis o flexibacteriosis en peces marinos, *Tenacibaculum soleae* es un patógeno bacteriano recientemente descrito, aislado hasta el momento en ejemplares enfermos de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) en Galicia, España. Por tanto, en una realización preferida de este aspecto de la invención, el organismo de interés del que se obtiene la muestra biológica es un pez.

En esta memoria se entiende por “pez” los organismos pertenecientes a las clases *Myxini*, *Cephalaspidomorphi*, *Chondrichthyes*, *Sarcopterygii* y *Actinopterygii*.

5 *Vibrio harveyi* es el causante de vibriosis en un amplio número de vertebrados e invertebrados marinos. Particularmente afecta a los cultivos de estos últimos (langostinos peneidos, langostas, orejas de mar, etc.), aunque también en distintas especies de peces cultivados (lenguado, mero, besugo, etc.). Por tanto, en una realización preferida de este aspecto de la invención, el organismo de interés del que se obtiene la muestra biológica es un artrópodo.

10 En esta memoria se entiende por “artrópodo” un organismo celular perteneciente al Superreino *Eukaryota*, Reino *Metazoa*, Phylum *Arthropoda*.

Dada la gran abundancia de inhibidores de PCR que pueden dar lugar a falsos negativos, es recomendable (Hoorfar et al., 2003. *J. of Clinical Microbiology*, 41(12): 5835) que las pruebas de PCR contengan un Control Interno de Amplificación (CIA). Este CIA no es más que un fragmento de ADN, que se amplifica simultáneamente con la muestra diana, de tal modo que su ausencia al final de las pruebas es indicativa de la presencia de factores, que han provocado un indeseado desarrollo de la PCR. Así pues, en una realización preferida el método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende al menos un control de amplificación interno.

20 Otro aspecto de la invención se refiere a las sondas de secuencia SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, de ahora en adelante sondas de la invención, que son específicas para la detección de las especies bacterianas *Photobacterium damsela*, *Tenacibaculum maritimum* y *Tenacibaculum soleae*, respectivamente. Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a la sonda de secuencia SEQ ID NO: 6 que es específica para la detección de la especie bacteriana *Vibrio harveyi*.

25 Las sondas diseñadas pueden utilizarse conjuntamente con otras que hayan sido diseñadas en la misma región del genoma para otros patógenos. La PCR y RLB con sondas específicas permite de esta manera la detección simultánea de más de 40 especies bacterianas, resolviéndose así el problema que plantea tener que identificar un alto número de microorganismos que causan enfermedades en peces cultivados y que pueden infectar conjuntamente a un individuo.

30 Otro aspecto de la invención se refiere a un kit de detección de bacterias, de ahora en adelante kit de la invención, que comprende sondas específicas para la identificación de las especies bacterianas *Photobacterium damsela*, *Tenacibaculum maritimum* y *Tenacibaculum soleae*, que se seleccionan de la lista que comprende la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5. En otra realización preferida, el kit de detección de bacterias comprende además la sonda de secuencia SEQ ID NO: 6, que es específica para la detección de la especie bacteriana *Vibrio harveyi*. En otra realización preferida, el kit de detección de bacterias comprende además los medios adecuados para llevar a cabo los métodos de la invención.

35 Dicho kit puede comprender cebadores, sondas y todos aquellos reactivos necesarios para llevar a cabo el método de la invención. El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, el uso de tampones, polimerasas, cofactores para obtener una actividad óptima de éstas, agentes para prevenir la contaminación, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo el método de la invención. A título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, el kit contendrá todos los elementos necesarios para la detección de las especies bacterianas por cualquiera de las técnicas que se han descrito anteriormente, y que son conocidas por cualquier experto medio en la materia.

40 A lo largo de la descripción, el termino “específicos” implica que las sondas comprenden una secuencia nucleotídica totalmente complementaria a los genes o fragmentos intergénicos empleados por el método de la presente invención.

50 Los términos “regiones variables” o “regiones polimórficas” en esta memoria, se entiende las regiones que presentan una variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre los individuos de una determinada categoría taxonómica.

55 Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos como desoxiribonucleótidos.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

65 Fig. 1. Detección de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. A) Aplicación del protocolo con muestras de cultivos puros de cepas de distintos patógenos de peces: *Tenacibaculum soleae* (líneas 2-8), *Tenacibaculum maritimum* (líneas 12-17), *Vibrio harvey* (líneas 21-27), *Photobacterium damsela* subsp *piscicida* (líneas 31-36) y *Pseudomonas fluorescens* (líneas 40-42). B) Límite de detección del método utilizando distintas concentraciones de ADN y de

sonda. Líneas 1, 2, 3, 4, 5, y 6: 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg y 1 pg de ADN de *P. damsela* subsp *piscicida* a321, respectivamente. Filas a, b, c, d, e, f, g: 0'3, 0'6, 1'3, 2'6, 5'3, 10'6 y 21'3 μ M de sonda PG321 respectivamente.

Fig. 2. *Detección de Tenacibaculum maritimum*. A) Aplicación del protocolo con muestras de cultivos puros de cepas de distintos patógenos de peces: *Tenacibaculum soleae* (líneas 2-8), *Tenacibaculum maritimum* (líneas 12-17), *Vibrio harveyi* (líneas 21-27), *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (líneas 31-36) y *Pseudomonas fluorescens* (líneas 40-42). B) Límite de detección del método utilizando distintas concentraciones de ADN y de sonda. Líneas 1, 2, 3, 4, 5, y 6: 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg y 1 pg de ADN de *T. maritimum* a443, respectivamente. Filas a, b, c, d, e, f, g: 0'3, 0'6, 1'3, 2'6, 5'3, 10'6 y 21'3 μ M de sonda PG443, respectivamente.

Fig. 3. *Detección de Tenacibaculum soleae* A) Aplicación del protocolo con muestras de cultivos puros de cepas de distintos patógenos de peces: *Tenacibaculum soleae* (líneas 2-8), *Tenacibaculum maritimum* (líneas 12-17), *Vibrio harveyi* (líneas 21-27), *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (líneas 31-36) y *Pseudomonas fluorescens* (líneas 40-42). B) Límite de detección del método utilizando distintas concentraciones de ADN y de sonda. Líneas 1, 2, 3, 4, 5, y 6: 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg y 1 pg de ADN de *T. soleae* a47, respectivamente. Filas a, b, c, d, e, f, g: 0'3, 0'6, 1'3, 2'6, 5'3, 10'6 y 21'3 μ M de sonda PG47, respectivamente.

Fig. 4. *Detección de Vibrio harveyi*. A) Aplicación del protocolo con muestras de cultivos puros de cepas de distintos patógenos de peces: *Tenacibaculum soleae* (líneas 2-8), *Tenacibaculum maritimum* (líneas 12-17), *Vibrio harveyi* (líneas 21-27), *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (líneas 31-36) y *Pseudomonas fluorescens* (líneas 40-42). B) Límite de detección del método utilizando distintas concentraciones de ADN y de sonda. Líneas 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7: 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg y 0'1 pg de ADN de *V. harveyi* a91, respectivamente. Filas a, b, c, d, e, f, g: 0'3, 0'6, 1'3, 2'6, 5'3, 10'6 y 21'3 μ M de sonda PG91, respectivamente.

Fig. 5. *Detección de T. soleae, T. maritimum, V. harveyi y P. damsela* mediante RLB con sondas específicas. Aplicación del protocolo con muestras de cultivos puros de distintas cepas de las especies diana: *Tenacibaculum soleae* (líneas 2-8), *Tenacibaculum maritimum* (líneas 12-17), *Vibrio harveyi* (líneas 21-27) y *Photobacterium damsela* subsp *piscicida* (líneas 31-36), frente a las sondas específicas correspondientes PG47, PG443, PG91 y PG321, respectivamente.

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de los métodos de detección de la invención, y de las sondas de la invención, para la detección de las especies *Photobacterium damsela*, *Tenacibaculum maritimum*, *Tenacibaculum soleae* y *Vibrio harveyi*.

Ejemplo 1

Identificación de *Photobacterium damsela*

La sonda específica para *Photobacterium damsela* utilizada en la RLB es la PG321, cuya secuencia consiste en la SEQ ID NO: 3. Esta diseñada en la región intergenica 16S-23S y lleva un grupo amino terminal en posición 5'. La concentración óptima de sonda esta en el rango de 1'3-21'3 μ M.

La especificidad del método se evaluó utilizando 8 cepas de *P. damsela* subsp *piscicida* aisladas de lenguado, así como las cepas de referencia *P. damsela* subsp *damsela* CECT 626 y *P. damsela* subs. *piscicida* CECT 5895. Además, se utilizaron 80 cepas pertenecientes a otras especies, tanto próximas como alejadas filogenéticamente de *P. damsela*: *Photobacterium* spp., *Photobacterium leiognathi*, *Photobacterium angustum*, *Photobacterium phosphoreum*, *Vibrio* spp., *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *Vibrio campbellii*, *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio natriegens*, *Vibrio tubiashii*, *V. tapetis*, *V. splendidus*, *Aeromonas salmonicida* subsp *salmonicida*, *Pseudoalteromonas* spp., *Psychrobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Tenacibaculum* spp., *Tenacibaculum maritimum*, *Tenacibaculum ovolyticum*, *Tenacibaculum soleae*, *Flavobacterium marinotypicum*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Polaribacter* spp., *Escherichia coli*.

La sensibilidad del método se determino utilizando diluciones decimales seriadas de ADN extraído de cultivo puro de la cepa *P. damsela* subsp *piscicida* a321. La concentración del mismo se determino por espectrofotometría (absorbancia a 260 nm). El límite de detección fue de 10 pg (unas 3 células según Becker *et al.*, 2000).

a) Identificación confirmativa de un cultivo puro

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de los aislados se disolvió una colonia bacteriana en 100 μ l de agua destilada estéril, tratándose a 99°C durante 10 minutos. Se centrifugo a 12000 rpm durante 1 minuto, recuperándose el sobrenadante. La concentración de ADN del mismo se determinó por espectrofotometría (absorbancia a 260 nm).

ES 2 371 976 A1

Reacción de amplificación

La amplificación de la región intergénica 16S-23S se llevó a cabo con el producto comercial REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix con MgCl₂ (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de reacción fue la siguiente:

- REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix con MgCl₂: 25 μ
- Primer 16/23SF (10 μ M): 1 μ l
- Primer 16/23SR-Biotina (10 μ M): 1 μ l
- ADN diana: de 10 a 100 ng
- Agua destilada: hasta un volumen final de 50 μ l.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C 5 minutos; 35 ciclos de desnaturalización (94°C 1 minuto), alineamiento (54°C 45 s), y extensión (72°C 45 s); finalmente un paso de extensión a 72°C durante 5 minutos.

Preparación de la membrana

La sonda específica PG321 se diluyó en NaHCO₃ 0'5 M pH 8'4 hasta obtener una concentración de 2'6 μ M. Se unió entonces a una membrana de nylon cargada negativamente Biodine C (Pall Life Sciences), previamente activada con una solución de EDAC (Sigma) al 16%, en un miniblitter ECL Multiprobe XL (Amersham Biosciences). A continuación se inactivó la membrana con NaOH 100 mM, y se lavó en buffer SSPE (Sigma) 2x con 0'1% SDS durante 5 minutos a 60°C, quedando lista para su uso.

Hibridación y revelado

Los productos de PCR se desnaturalizaron (99°C 10 minutos), se mantuvieron en hielo durante 10 minutos y se transfirieron al miniblitter con la membrana, teniendo lugar la hibridación durante 1 hora a 42°C. Después, la membrana se lavó dos veces con buffer SSPE 2x con 0'5% de SDS a una temperatura de 65°C. A continuación se incubó con peroxidasa conjugada a streptavidina (Roche) diluida 1:4000, a 42°C, durante 30 minutos. Se lavó entonces con buffer SSPE 2x con 0'5% SDS a 42°C. El revelado se produjo tras incubar la membrana con reactivos ECL (Amersham) y exponerla a un film ECL (Amersham).

Los resultados se muestran en la Figura 1.

b) Detección de *P. damselae* a partir de tejidos de acedía (*Dicologlossa cuneata*)

El protocolo utilizado es el mismo que se ha descrito en el ejemplo 1, salvo en lo que se refiere a la extracción de ADN de la muestra y a la reacción de amplificación. Este protocolo fue aplicado sobre muestras de peces (n = 10) infectados tanto de forma natural como experimentalmente con *P. damselae* subsp *piscicida*, siendo detectado el patógeno en el 100% de los casos. Esto confirma la utilidad del protocolo PCR-RLB para la detección de *Photobacterium damselae* a partir de tejidos de peces.

Extracción de ADN

Cada muestra de tejido, de unos 100 mg, se homogeneizó en una mezcla de 800 μ l de buffer TE (Sigma), 45 μ l de SDS 20% y 4'5 μ l de proteinasa K 20 mg/ml (Sigma), incubándose a una temperatura de 56°C durante toda la noche, tras lo cual se trataron con 2 μ l de ARNasa 10 mg/ml (Sigma) a 37°C durante 1 hora. La solución resultante se trató con la mezcla fenol:cloroformo:isoamilico 25:24:1 (Sigma) y con cloroformo:isoamilico 24:1, recuperándose entonces la fase acuosa. El ADN se precipitó entonces con isopropanol en una primera fase y con etanol 70% en una segunda. Finalmente se resuspendió en 50 μ l de agua destilada estéril.

Reacción de amplificación

Se llevó a cabo como se ha descrito en el ejemplo 1 a), modificándose únicamente el número de ciclos de amplificación, 45 en este caso.

Ejemplo 2

Identificación de *Tenacibaculum maritimum*

La amplificación de la región intergénica 16S-23S y parte de ambos genes ribosómicos flanqueantes (los extremos 3' del gen 16S y 5' el gen 23S) se realizó con los cebadores universales 16/23SF y 16/23SR (Lee *et al.*, 2002. *Marine Pollution Bulletin* 44:412-420). Se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ l que incluía el tampón de amplificación

ES 2 371 976 A1

(10 mM Tris-HCL pH 8'3, 50 mM KCl, 1'5 mM MgCl₂), los cuatro desoxinucleótidos (dATP, dCTP, TTP, dGTP) a una concentración final de 200 μM cada uno, 3 unidades de Taq DNA Polimerasa, agua destilada (en función de la cantidad de ADN), los dos cebadores a una concentración final de 200 nM cada uno y el ADN diana (10-100 ng). El cebador 16/23SR va marcado con biotina en el extremo 5'.

5

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C 5 minutos; 35 ciclos de desnaturalización (94°C 1 minuto), alineamiento (54°C 45 s), y extensión (72°C 45 s); finalmente un paso de extensión a 72°C durante 5 minutos.

10

La sonda específica para *T. maritimum* utilizada en la RLB es la PG443, cuya secuencia consiste en la SEQ ID NO: 4. Esta diseñada en la región intergénica 16S-23S y lleva un grupo amino terminal en posición 5'. La concentración óptima de sonda está en el rango de 2'6-21 μM. La hibridación se realizó a 42°C y los lavados a 65°C.

15

La especificidad del método se evaluó utilizando 8 cepas de *T. maritimum* aisladas de lenguado (*Solea senegalensis*) y acedía (*Dicologlossa cuneata*) pertenecientes a distintos serotipos, así como la cepa de referencia *T. maritimum* CECT4276. Además, se utilizaron 81 cepas pertenecientes a otras especies, tanto próximas como alejadas filogenéticamente de *T. maritimum*: *Tenacibaculum* spp., *Tenacibaculum ovolyticum*, *Tenacibaculum soleae*, *Flavobacterium marinotipicum*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Polaribacter* spp., *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, *Vibrio* spp., *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *Vibrio campbellii*, *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio natriegens*, *Vibrio tubiashii*, *V. tapetis*, *V. splendidus*, *Photobacterium* spp., *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, *Photobacterium leiognathi*, *Photobacterium angustum*, *Photobacterium phosphoreum*, *Pseudoalteromonas* spp., *Psychrobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*.

25

La sensibilidad del método se determinó utilizando diluciones decimales seriadas de ADN extraído de cultivo puro de la cepa *T. maritimum* a443. La concentración del mismo se determinó por espectrofotometría (absorbancia a 260 nm). El límite de detección fue de 100 pg (unas 30 células según Becker *et al.*, 2000. *Applied and Environmental Microbiology* 66(11): 4945-4953).

30

a) *Identificación confirmativa de un cultivo puro*

Extracción de ADN

35

Para la extracción de ADN de los aislados se disolvió una colonia bacteriana en 100 μl de agua destilada estéril, tratándose a 99°C durante 10 minutos. Se centrifugó a 12000 rpm durante 1 minuto, recuperándose el sobrenadante. La concentración de ADN del mismo se determinó por espectrofotometría (absorbancia a 260 nm).

Reacción de amplificación

40

La amplificación de la región intergénica 16S-23S y de las regiones flanqueantes de los genes 16S y 23S se llevó a cabo con el producto comercial REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix con MgCl₂ (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de reacción es la siguiente:

45

- REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix con MgCl₂: 25 μl

- Primer 16/23SF (10 μM): 1 μl

- Primer 16/23SR-Biotina (10 μM): 1 μl

50

- ADN diana: 10 ng

- Agua destilada: hasta un volumen final de 50 μl.

55

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C 5 minutos; 35 ciclos de desnaturalización (94°C 1 minuto), alineamiento (54°C 45 s), y extensión (72°C 45 s); finalmente un paso de extensión a 72°C durante 5 minutos.

Preparación de la membrana

60

La sonda específica PG443 se diluyó en NaHCO₃ 0'5 M pH 8'4 hasta obtener una concentración de 2'6 μM. Se unió entonces a una membrana de nylon cargada negativamente Biodine C (Pall Life Sciences), previamente activada con una solución de EDAC (Sigma) al 16%, en un miniblottter ECL Multiprobe XL (Amersham Biosciences). A continuación se inactivó la membrana con NaOH 100 mM, y se lavó en buffer SSPE (Sigma) 2x con 0'1% SDS durante 5 minutos a 60°C, quedando lista para su uso.

65

ES 2 371 976 A1

Hibridación y revelado

Los productos de PCR se desnaturalizaron (99°C 10 minutos), se mantuvieron en hielo durante 10 minutos y se transfirieron al miniblitter con la membrana, teniendo lugar la hibridación durante 1 hora a 42°C. Después, la membrana se lavó dos veces con buffer SSPE 2x con 0'5% de SDS a una temperatura de 65°C. A continuación se incubó con peroxidasa conjugada a streptavidina (Roche) diluida 1:4000, a 42°C, durante 30 minutos. Se lavó entonces con buffer SSPE 2x con 0'5% SDS a 42°C. El revelado se produjo tras incubar la membrana con reactivos ECL (Amersham) y exponerla a un film ECL (Amersham).

10 Reutilización de la membrana

La membrana puede reutilizarse unas 10 veces. Para eliminar las muestras, incubar la membrana en SDS 1% a 90°C 30 minutos. La membrana puede almacenarse hasta su uso a 4°C en EDTA 20 mM pH 8.

15 Ejemplo 3

Identificación de *Tenacibaculum soleae*

La amplificación de la región intergénica 16S-23S y la región intergénica 16S-23S y parte de ambos genes ribosómicos flanqueantes (el extremo 3' del gen 16S y 5' del gen 23S) se realizó con los cebadores universales 16/23SF y 16/23SR (Lee *et al.*, 2002. *Marine Pollution Bulletin* 44:412-420). Se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl que incluía el tampón de amplificación (10 mM Tris-HCL pH 8'3, 50 mM KCl, 1'5 mM MgCl₂), los cuatro desoxinucleótidos (dATP, dCTP, TTP, dGTP) a una concentración final de 200 DM cada uno, 3 unidades de Taq DNA Polimerasa, agua destilada (en función de la cantidad de ADN), los dos cebadores a una concentración final de 200 nM cada uno y el ADN diana (10-100 ng). El cebador 16/23SR va marcado con biotina en su extremo 5'. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C 5 minutos; 35 ciclos de desnaturalización (94°C 1 minuto), alineamiento (54°C 45 s), y extensión (72°C 45 s); finalmente un paso de extensión a 72°C durante 5 minutos.

La sonda específica para *T. soleae* utilizada en la RLB es la PG47, cuya secuencia consiste en la SEQ ID NO: 5. Esta diseñada en la región intergénica 16S-23S y lleva un grupo amino terminal en posición 5'. La concentración óptima de sonda esta en el rango de 2'6-21 µM. La hibridación se realizó a 42°C y los lavados a 65°C. La especificidad del método se evaluó utilizando 8 cepas de *T. soleae* aisladas de rombo (*Scophthalmus rhombus*), lenguado (*Solea senegalensis*) y acedía (*Dicologlossa cuneata*) así como la cepa tipo *T. soleae* LL04 12.1.7. Además, se utilizaron 81 cepas pertenecientes a otras especies, tanto próximas como alejadas filogenéticamente de *T. soleae*: *Tenacibaculum* spp., *Tenacibaculum ovolyticum*, *Tenacibaculum maritimum*, *Flavobacterium marinotypicum*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Polaribacter* spp., *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, *Vibrio* spp., *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *Vibrio campbellii*, *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio natriegens*, *Vibrio tubiashii*, *V. tapetis*, *V. splendidus*, *Photobacterium* spp., *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, *Photobacterium leiognathi*, *Photobacterium angustum*, *Photobacterium phosphoreum*, *Pseudoalteromonas* spp., *Psychrobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*.

La sensibilidad del método se determinó utilizando diluciones decimales seriadas de ADN extraído de cultivo puro de la cepa *T. soleae* a47. La concentración del mismo se determino por espectrofotometría (absorbancia a 260 nm). El límite de detección fue de 100 pg (unas 30 células según Becker *et al.*, 2000. *Applied and Environmental Microbiology* 66(11): 4945-4953).

a) Identificación confirmativa de un cultivo puro

50 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de los aislados se disolvió una colonia bacteriana en 100 µl de agua destilada estéril, tratándose a 99°C durante 10 minutos. Se centrifugó a 12000 rpm durante 1 minuto, recuperándose el sobrenadante. La concentración de ADN del mismo se determinó por espectrofotometría (absorbancia a 260 nm).

Reacción de amplificación

La amplificación de la región intergénica 16S-23S y de las regiones de los genes 16S y 23S que la flanquean se llevó a cabo con el producto comercial REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix con MgCl₂ (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de reacción fue la siguiente:

- REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix con MgCl₂: 25 µl
- Primer 16/23SF (10 µM): 1 µl
- Primer 16/23SR-Biotina (10 DM): 1 µl

ES 2 371 976 A1

- ADN diana: 10 ng
- Agua destilada: hasta un volumen final de 50 μ l.

5 Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C 5 minutos; 35 ciclos de desnaturalización (94°C 1 minuto), alineamiento (54°C 45 s), y extensión (72°C 45 s); finalmente un paso de extensión a 72°C durante 5 minutos.

Preparación de la membrana

10 La sonda específica PG47 se diluyó en NaHCO₃ 0'5 M pH 8'4 hasta obtener una concentración de 2'6 μ M. Se unió entonces a una membrana de nylon cargada negativamente Biodine C (Pall Life Sciences), previamente activada con una solución de EDAC (Sigma) al 16%, en un miniblotteder ECL Multiprobe XL (Amersham Biosciences). A continuación se inactiva la membrana con NaOH 100 mM, y se lavó en buffer SSPE (Sigma) 2x con 0'1% SDS durante 5 minutos a 60°C, quedando lista para su uso.

20 Los productos de PCR se desnaturalizaron (99°C 10 minutos), se mantuvieron en hielo durante 10 minutos y se transfirieron al miniblotteder con la membrana, teniendo lugar la hibridación durante 1 hora a 42°C. Después, la membrana se lavó dos veces con buffer SSPE 2x con 0'5% de SDS a una temperatura de 65°C. A continuación se incubó con peroxidasa conjugada a streptavidina (Roche) diluida 1:4000, a 42°C, durante 30 minutos. Se lavó entonces con buffer SSPE 2x con 0'5% SDS a 42°C. El revelado se produjo tras incubar la membrana con reactivos ECL (Amersham) y exponerla a un film ECL (Amersham).

Reutilización de la membrana

25 La membrana puede reutilizarse unas 10 veces. Para eliminar las muestras, incubar la membrana en SDS 1% a 90°C 30 minutos. La membrana puede almacenarse hasta su uso a 4°C en EDTA 20 mM pH 8.

Ejemplo 4

30 Identificación de *Vibrio harveyi*

35 La amplificación de la región intergénica 16S-23S y parte de los genes ribosómicos 16S y 23S se realizó con los cebadores universales 16/23SF y 16/23SR (Lee *et al.*, 2002. *Marine Pollution Bulletin* 44:412-420). Se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ l que incluía el tampón de amplificación (10 mM Tris-HCL pH 8'3, 50 mM KCl, 1'5 mM MgCl₂), los cuatro desoxinucleótidos (dATP, dCTP, TTP, dGTP) a una concentración final de 200 μ M cada uno, 3 unidades de Taq DNA Polimerasa, agua destilada (en función de la cantidad de ADN), los dos cebadores a una concentración final de 200 nM cada uno y el ADN diana (10-100 ng). El cebador 16/23SR va marcado con biotina en el extremo 5'.

40 Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94°C 5 minutos; 35 ciclos de desnaturalización (94°C 1 minuto), alineamiento (54°C 45 s), y extensión (72°C 45 s); finalmente un paso de extensión a 72°C durante 5 minutos. La sonda específica para *Vibrio harveyi* utilizada en la RLB es la PG91, cuya secuencia consiste en la SEQ ID O: 6. Está diseñada en el gen 23S y lleva un grupo amino terminal en posición 5'. La concentración óptima de sonda está en el rango de 0'6-21'3 μ M. La hibridación se realizó a 42°C y los lavados a 65°C.

50 La especificidad del método se evaluó utilizando 13 cepas de *Vibrio harveyi* aisladas de lenguado (*Solea senegalensis*) y acedía (*Dicologlossa cuneata*), así como las cepas de referencia *Vibrio harveyi* CECT 525 y *Vibrio harveyi* CECT 5156. Además, se utilizaron 75 cepas pertenecientes a otras especies, tanto próximas como alejadas filogenéticamente de *Vibrio harveyi*: *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *Vibrio campbellii*, *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio natriegens*, *Vibrio tubiashii*, *V. tapetis*, *V. splendidus*, *Vibrio* spp., *Photobacterium* spp., *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Photobacterium leiognathi*, *Photobacterium angustum*, *Photobacterium phosphoreum*, *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, *Pseudoalteromonas* spp., *Psychrobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Tenacibaculum* spp., *Tenacibaculum maritimum*, *Tenacibaculum ovolyticum*, *Tenacibaculum soleae*, *Flavobacterium marinotypicum*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Polaribacter* spp., *Escherichia coli*.

60 La sonda permite la identificación de *Vibrio harveyi* frente a otras especies estrechamente relacionadas, como *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio alginolyticus*, pero no frente a *Vibrio campbellii*, una especie prácticamente indistinguible fenotípicamente de *Vibrio harveyi* (Gomez-Gil *et al.*, 2004). Sparagano *et al.*, (2002) secuenciaron parte del gen 23S de varias especies de vibrios, encontrando que las cepas tipo *V. harveyi* LMG 4044, *V. harveyi* LMG 7890 y *V. campbellii* LMG 11216 tenían secuencias similares. Por otra parte la cepa ensayada para esta especie, *Vibrio campbellii* CECT 523, presenta una secuencia similar a *Vibrio harveyi* tanto en la región intergénica 16S-23S como en el gen 23S, por lo que esta región del genoma parece no prestarse a la diferenciación de estas dos especies.

65 La sensibilidad del método se determinó utilizando diluciones decimales seriadas de ADN extraído de cultivo puro de la cepa *V. harveyi* a91. La concentración del mismo se estimó por espectrofotometría (absorbancia a 260 nm). El

ES 2 371 976 A1

límite de detección fue de 1 pg (unas 0'3 células según Becker *et al.*, 2000. *Applied and Environmental Microbiology* 66(11): 4945-4953).

a) *Identificación confirmativa de un cultivo puro*

5

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de los aislados se disolvió una colonia bacteriana en 100 μ l de agua destilada estéril, tratándose a 99°C durante 10 minutos. Se centrifugó a 12000 rpm durante 1 minuto, recuperándose el sobrenadante. La concentración de ADN del mismo se determinó por espectrofotometría (absorbancia a 260 nm).

10

Reacción de amplificación

La amplificación de la región intergénica 16S-23S y parte de los genes 16S y 23S se llevó a cabo con el producto comercial REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix con $MgCl_2$ (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de reacción fue la siguiente:

15

- REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix con $MgCl_2$: 25 μ l
- Primer 16/23SF (10 μ M): 1 μ l
- Primer 16/23SR-Biotina (10 μ M): 1 μ l
- ADN diana: 10 ng
- Agua destilada: hasta un volumen final de 50 μ l.

25

Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94°C 5 minutos; 35 ciclos de desnaturalización (94°C 1 minuto), alineamiento (54°C 45 s), y extensión (72°C 45 s); finalmente un paso de extensión a 72°C durante 5 minutos.

30

Preparación de la membrana

La sonda específica PG91 se diluyó en $NaHCO_3$ 0'5 M pH 8'4 hasta obtener una concentración de 2'6 μ M. Se unió entonces a una membrana de nylon cargada negativamente Biodine C (Pall Life Sciences), previamente activada con una solución de EDAC (Sigma) al 16%, en un miniblotteder ECL Multiprobe XL (Amersham Biosciences). A continuación se inactivo la membrana con NaOH 100 mM, y se lavó en buffer SSPE (Sigma) 2x con 0'1% SDS durante 5 minutos a 60°C, quedando lista para su uso.

35

Hibridación y revelado

Los productos de PCR se desnaturalizaron (99°C 10 minutos), se mantuvieron en hielo durante 10 minutos y se transfirieron al miniblotteder con la membrana, teniendo lugar la hibridación durante 1 hora a 42°C. Después, la membrana se lavó dos veces con buffer SSPE 2x con 0'5% de SDS a una temperatura de 65°C. A continuación se incubó con peroxidasa conjugada a streptavidina (Roche) diluida 1:4000, a 42°C, durante 30 minutos. Se lavó entonces con buffer SSPE 2x con 0'5% SDS a 42°C. El revelado se produjo tras incubar la membrana con reactivos ECL (Amersham) y exponerla a un film ECL (Amersham).

45

Reutilización de la membrana

La membrana puede reutilizarse unas 10 veces. Para eliminar las muestras, incubar la membrana en SDS 1% a 90°C 30 minutos. La membrana puede almacenarse hasta su uso a 4°C en EDTA 20 mM pH 8.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Método para la detección de bacterias, que comprende:

- 5
- a. extraer el ADN total de una muestra biológica aislada,
 - b. poner en contacto la muestra a analizar con una mezcla de reacción, que contiene los cebadores para la
amplificación de la región ribosomal intergénica 16S-23S y parte de ambos genes ribosómicos flanquean-
10 tes.
 - c. amplificar mediante reacción en cadena de la polimerasa, la región ribosomal intergénica 16S-23S y parte
de ambos genes ribosómicos flanqueantes,
 - d. identificar la presencia o ausencia de al menos una de las especies *Photobacterium damsela*, *Tenaciba-
15 culum maritimum*, *Tenacibaculum soleae* mediante RBL con al menos una de las sondas cuya secuencia
consiste en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, respectivamente.

2. Método para la detección de bacterias, que comprende los pasos (a)-(c) según la reivindicación anterior, y
20 además:

- d. identificar la presencia o ausencia simultánea de *Vibrio harveyi* y al menos una de las especies *Photobac-
25 terium damsela*, *Tenacibaculum maritimum* y *Tenacibaculum soleae* mediante RBL con la sonda cuya
secuencia se recoge en SEQ ID NO: 6 y al menos una de las sondas cuya secuencia se recoge en la SEQ
ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.

3. Método para la detección de bacterias según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde los cebadores para la
amplificación de la región intergénica 16S-23S según el paso (b) son universales.

4. Método para la detección de bacterias según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde los cebadores para la
30 amplificación de la región intergénica 16S-23S según el paso (b) son las secuencias nucleotídicas que consisten en la
SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2.

5. Método para la detección de bacterias según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la identificación de las
35 especies bacterianas *Photobacterium damsela*, *Tenacibaculum maritimum*, *Tenacibaculum soleae* y *Vibrio harveyi* se
realiza a partir de cultivos puros.

6. Método para la detección de bacterias según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la muestra del paso
(a) es una muestra biológica aislada de un organismo de interés.

7. Método para la detección de bacterias según la reivindicación 6, donde el organismo de interés del que se obtiene
40 la muestra biológica es un pez.

8. Método para la detección de bacterias según la reivindicación 6, donde el organismo de interés del que se obtiene
45 la muestra biológica es un artrópodo.

9. Método para la detección de bacterias según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que además comprende, al
menos, un control de amplificación interno.

10. Sondas cuya secuencia nucleotídica consiste en las SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, que
50 son específicas para la detección de las especies bacterianas *Photobacterium damsela*, *Tenacibaculum maritimum* y
Tenacibaculum soleae, respectivamente.

11. Sonda cuya secuencia nucleotídica consiste en las SEQ ID NO: 6, para la detección de la especie bacteriana
55 *Vibrio harveyi*.

12. Kit de detección de bacterias que comprende las sondas según la reivindicación 10.

13. Kit de detección de bacterias según la reivindicación anterior, que además comprende la sonda cuya secuencia
60 nucleotídica consiste en las SEQ ID NO: 6.

14. Kit de detección de bacterias que comprende los medios adecuados para llevar a cabo el método de detección
según cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

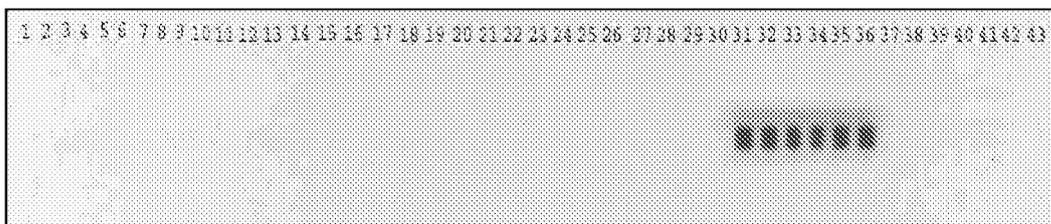


FIG. 1A

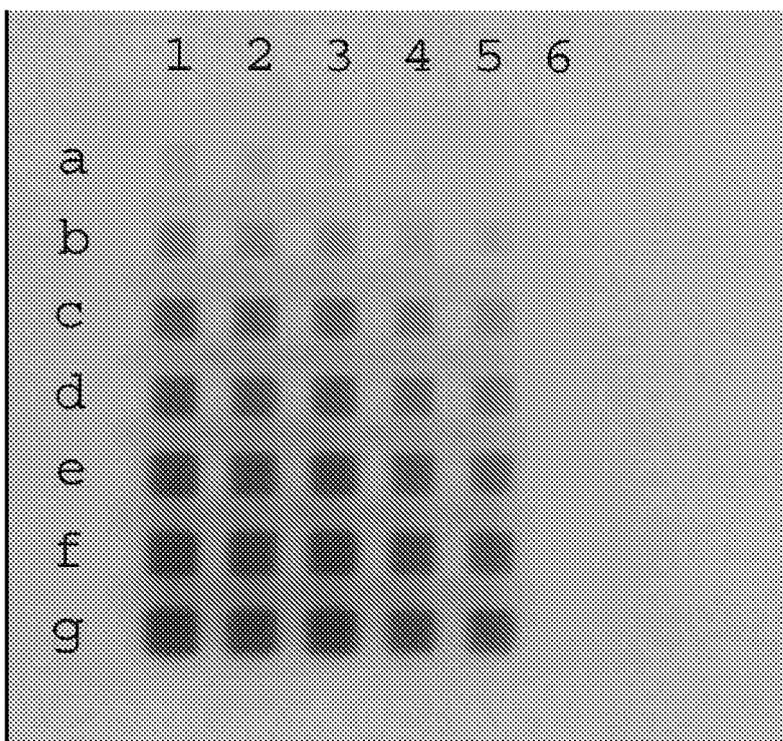


FIG. 1B

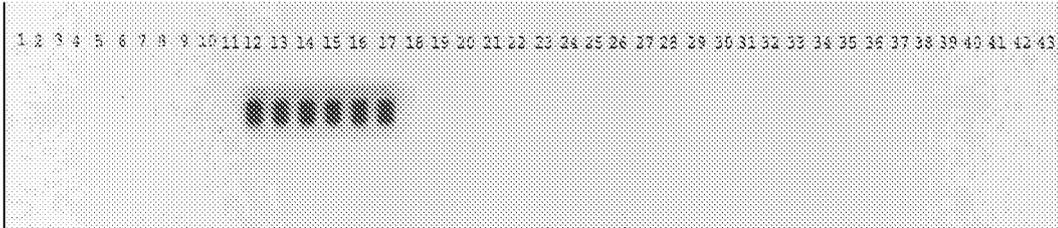


FIG. 2A

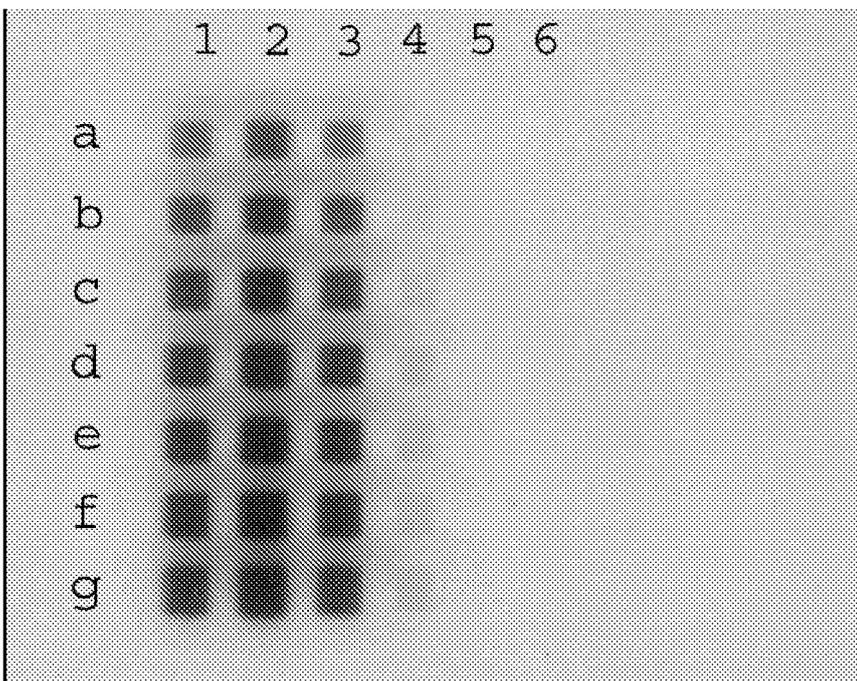


FIG. 2B

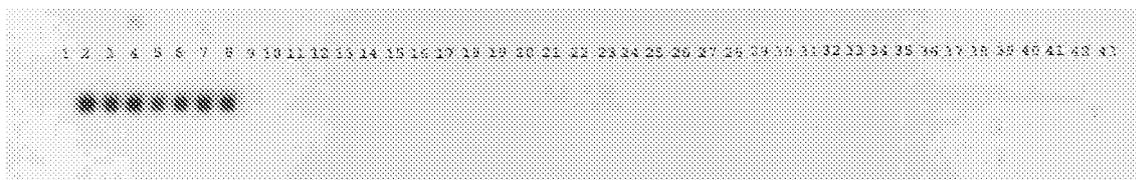


FIG. 3A

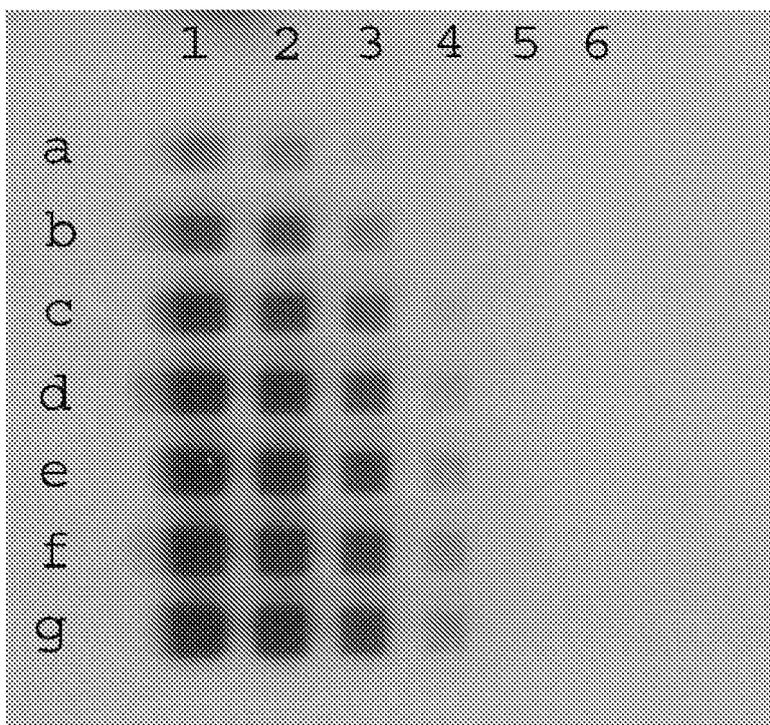


FIG. 3B

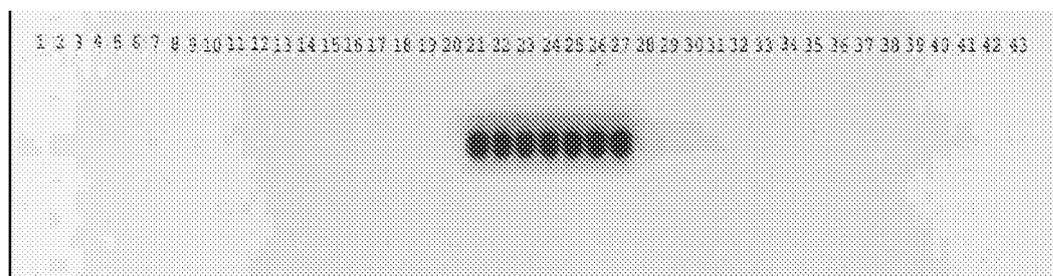


FIG. 4A

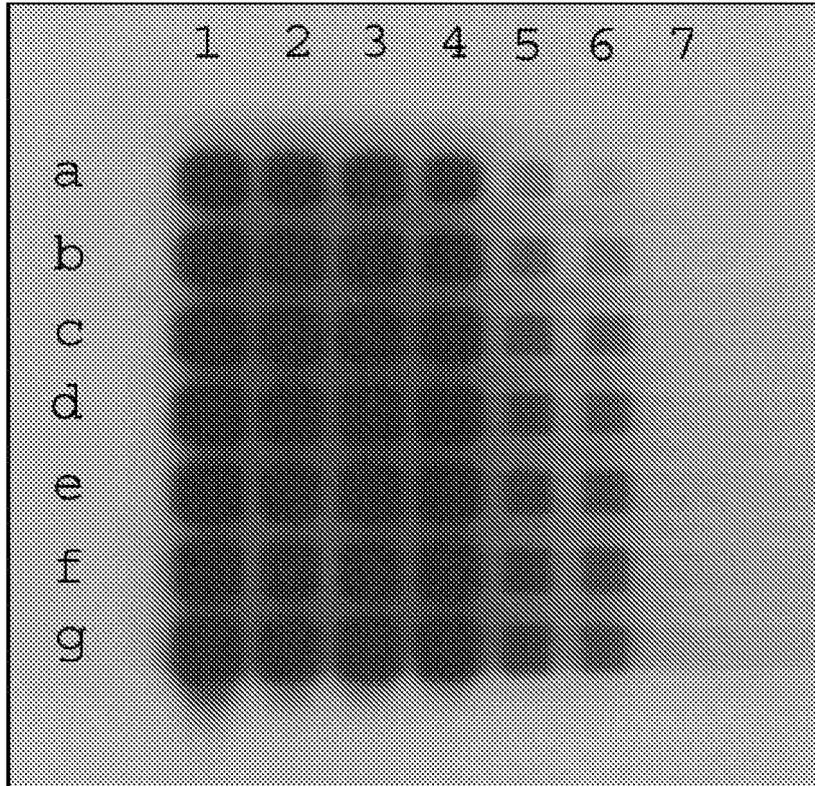


FIG. 4B

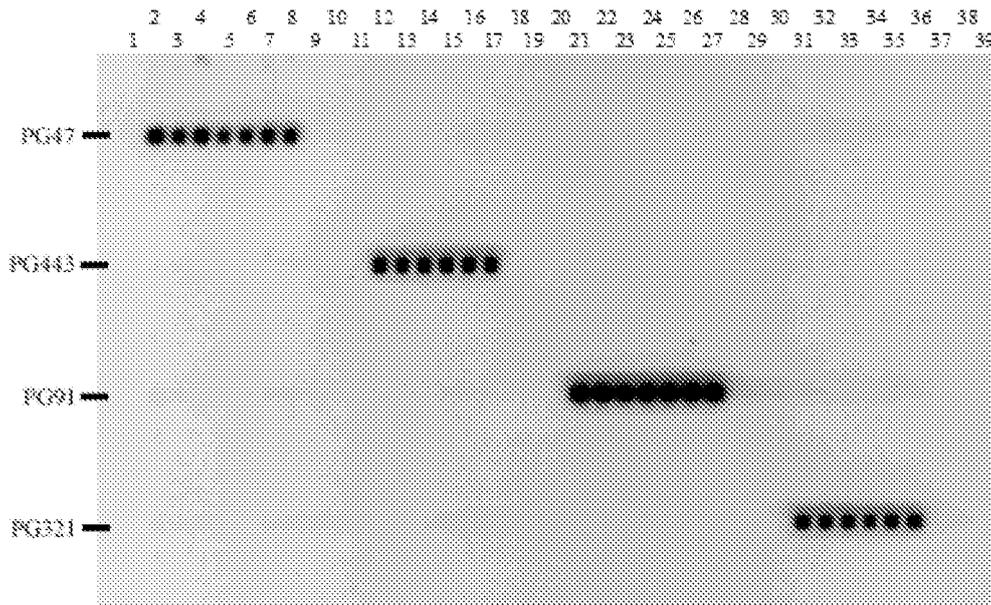


FIG. 5

ES 2 371 976 A1

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Instituto Andaluz de investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica
- 5 <120> Método de identificación de los patógenos de peces: *Photobacterium damsela*, *Tenacibaculum soleae*, *Tenacibaculum maritimum* y *Vibrio harveyi*.
- <130> 1682.6
- 10 <160> 6
- <170> PatentIn version 3.4
- 15 <210> 1
<211> 17
<212> DNA
- 20 <213> Artificial
- <220>
<223> cebador 16/23SF
- 25 <400> 1
aagtcgtaac aaggtag 17
- 30 <210> 2
<211> 19
<212> DNA
- 35 <213> Artificial
- <220>
<223> cebador 16/23SR
- 40 <400> 2
gaccatataat aacccaag 19
- 45 <210> 3
<211> 26
<212> DNA
- 50 <213> Artificial
- <220>
<223> sonda PG321
- 55 <400> 3
tgatttattt taagttttta tcgaaa 26
- <210> 4
- 60 <211> 24
<212> DNA
- <213> Artificial
- 65 <220>
<223> sonda PG443

ES 2 371 976 A1

	<400> 4		
	aggattttat aatctgaatt tcat		24
5	<210> 5		
	<211> 23		
	<212> DNA		
	<213> Artificial		
10	<220>		
	<223> sonda PG47		
15	<400> 5		
	ctagaacaac agttaattac gaa		23
	<210> 6		
20	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> Artificial		
25	<220>		
	<223> sonda PG91		
	<400> 6		
30	aaccggcaac gcatwtaaag		20
35			
40			
45			
50			
55			
60			
65			



②① N.º solicitud: 200930440

②② Fecha de presentación de la solicitud: 10.07.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	MATSUYAMA, T. et al. Rapid discrimination of fish pathogenic Vibrio and Photobacterium species by oligonucleotide DNA array. Fish Pathology, Sep. 2006, Vol 41(3), páginas 105-112. ISSN 0388-788X.	1-10
Y	OSORIO, C.R. et al. Variation in 16S-23S rRNA intergenic spacer regions in Photobacterium damsela: a mosaic-like structure. Applied and Environmental Microbiology (2005), Vol 71(2), páginas 636-645. ISSN: 0099-2240.	1-10
Y	CN 1877328 A (UNIV. NANKAI) 13.12.2006, resumen; SEQ ID NO 27.	2-9
X		11
X	EP 1895015 A1 (INSTITUTO DE SALUD CARLOS III) 05.03.2008, todo el documento.	12-14
X	US 20060228718 A1 (CHANG et al.) 12.10.2006, resumen; párrafos [0013],[0023],[0025],[0029].	12-14
A		1-9
A	ZWART, G. et al. Rapid Screening for Freshwater Bacterial Groups by using Reverse Line Blot Hybridization. Applied and Environmental Microbiology, Oct. 2003. Vol 69 (10), páginas 5875-5883. ISSN 0099-2240.	1-9

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
15.12.2011

Examinador
M. Á. Martín-Falquina Garre

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q1/68 (2006.01)

C07H21/04 (2006.01)

G01N33/569 (2006.01)

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

C12Q, C07H, G01N

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

INVENES, EPODOC, bases de datos del EBI, REGISTRY, NPL, BIOSIS, MEDLINE, XPESP, WPI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 15.12.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-10, 12-14	SI
	Reivindicaciones 11	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-14	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.

Consideraciones:

Los documentos de la solicitud de patente sobre los que se basa esta Opinión Escrita son el resultado de las modificaciones efectuadas durante el proceso de examen formal y técnico de la solicitud de patente.

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	MATSUYAMA, T. et al. Rapid discrimination of fish pathogenic <i>Vibrio</i> and <i>Photobacterium</i> species by oligonucleotide DNA array. <i>Fish Pathology</i> , Sep. 2006, Vol 41(3), páginas 105-112. ISSN 0388-788X.	00.09.2006
D02	OSORIO, C.R. et al. Variation in 16S-23S rRNA intergenic spacer regions in <i>Photobacterium damsela</i> : a mosaic-like structure. <i>Applied and Environmental Microbiology</i> (2005), Vol 71(2), páginas 636-645. ISSN: 0099-2240.	00.02.2005
D03	CN 1877328 A (UNIV. NANKAI)	13.12.2006
D04	EP 1895015 A1 (INSTITUTO DE SALUD CARLOS III)	05.03.2008
D05	US 20060228718 A1 (CHANG et al.)	12.10.2006

La invención se refiere por una parte a un método para la identificación de los patógenos de peces *Photobacterium damsela*, *Tenacibaculum soleae* y *Tenacibaculum maritimum* y por otra a un método para identificación de los microorganismos anteriores simultáneamente con *Vibrio harveyi*. En ambos casos el método comprende la amplificación de la región intergénica ribosomal 16S-23S mediante PCR y la identificación de los microorganismos mediante RLB (hibridación inversa) con sondas específicas. Así mismo, se describen dichas sondas y un kit para la puesta en práctica de los métodos de la invención.

Los siguientes documentos se han tomado en consideración:

El documento D1 divulga un método rápido para la discriminación de bacterias (*Vibrio* y *Photobacterium* sp.) que son patógenas de animales acuáticos. El método comprende la extracción de ADN de la muestra biológica, la amplificación de la región intergénica ribosomal 16S-23S mediante PCR con cebadores universales y la identificación, entre otras especies, de *Photobacterium damsela* mediante hibridación con sondas de oligonucleótidos específicos inmovilizados en membranas de nylon.

En el documento D2 se identifican y distinguen subespecies y cepas de *P.damsela* analizando y comparando las secuencias de la región intergénica 16S-23S de cada una de ellas. La secuenciación de dichas zonas muestra que la región intergénica 16S-23S en *P. damsela* tiene una estructura de tipo mosaico, en la que existe una zona conservada de 120 pb presente en todas las secuencias intergénicas 16S-23S de las subespecies y cepas analizadas. Esta zona de 120 pb comprende la secuencia SEQ ID NO 3 de la invención.

El documento D3 describe un array de sondas de hibridación específicas de ADN ribosomal 23S para la identificación de organismos patógenos en animales acuáticos, concretamente de *Vibrio harveyi*. En la secuencia identificada como SEQ ID NO 27 se divulga una sonda de hibridación idéntica a la SEQ ID NO 6 de la solicitud.

El documento D4 se refiere a un método y su correspondiente kit para la detección de especies bacterianas que causan zoonosis. Se identifican diversas especies de los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Bartonella*, *Coxiella*, *Rickettsia* y *Francisella* mediante PCR y análisis por hibridación inversa (RLB) con sondas específicas.

Finalmente D5 divulga un método para la identificación rápida de especies bacterianas presentes en productos alimentarios que comprende la amplificación de la región intergénica 16S-23S y posterior hibridación con sondas específicas dispuestas sobre un sustrato, por ejemplo sobre una membrana. Incluye el kit correspondiente para llevar a cabo el análisis.

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

Reivindicación 1:

El estado de la técnica disponible no describe un método que comprenda las etapas a que se refiere la reivindicación 1 ni anticipa ninguna de las secuencias SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4 y SEQ ID NO 5. En consecuencia, la reivindicación 1 cumple el requisito de novedad establecido en el art. 6.1 de la Ley de Patentes.

D1 se considera el estado de la técnica más cercano en relación con la reivindicación 1; La reivindicación 1 difiere de D1 en que el método de D1 detecta *Photobacterium damsela* utilizando una sonda específica diferente a SEQ ID NO 3. Por lo tanto, el problema técnico objetivo que resuelve la reivindicación 1 es proporcionar una sonda alternativa para la detección de *Photobacterium damsela*.

Sin embargo, es conocido a través de D2 que la región intergénica 16S-23S de *P.damselae* posee una zona de 120 pb altamente característica de dicha especie. Por lo tanto, se considera que un experto en la materia, a la hora de diseñar sondas específicas para *P. damselae* trabajaría en esa zona y, contando con las herramientas informáticas disponibles para el diseño de sondas, consideraría el fragmento SEQ ID NO 3 o uno muy similar con una razonable expectativa de éxito. Dado que la solicitud no aporta argumentos que permitan suponer que el uso de SEQ ID NO 3 solvente algún problema técnico o produzca algún efecto inesperado diferente al producido por la sonda de D1, se considera que el método de identificación de al menos una de las especies *Photobacterium damselae*, *Tenacibaculum soleae* y *Tenacibaculum maritimum* de la reivindicación 1, no cumple con el requisito de actividad inventiva que establece el art. 8.1 de la Ley de Patentes .

Reivindicación 2:

Ninguno de los documentos del estado de la técnica disponible divulga un método de detección simultánea de *Vibrio harveyi* y al menos una de las especies *Photobacterium damselae*, *Tenacibaculum soleae* y *Tenacibaculum maritimum* a que se refiere la reivindicación 2. Por lo tanto, la reivindicación 2 cumple el requisito de novedad establecido en el art. 6.1 de la Ley de Patentes.

D1 se considera el estado de la técnica más cercano en relación con la reivindicación 2; La reivindicación 2 difiere de D1 en que el método de D1 detecta *Photobacterium damselae* y *Vibrio harveyi* utilizando sondas diferentes a las identificadas como SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 6 respectivamente. Sin embargo, con respecto a SEQ ID NO 3 aplica el mismo razonamiento que para la reivindicación 1 y SEQ ID NO 6 ya está descrita para el mismo fin en D3. Por lo tanto, a falta de argumentos en la solicitud que justifiquen que SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 6 utilizadas conjuntamente solventen algún problema técnico (por ejemplo evitando reacciones cruzadas) o produzcan algún efecto inesperado diferente al descrito en D1, no se considera sino una mera adición al método de la reivindicación 1. Por lo tanto, siguiendo el mismo razonamiento del apartado anterior, la reivindicación 2 no cumple con el requisito de actividad inventiva que establece el art. 8.1 de la Ley de Patentes.

Reivindicaciones 3-9:

Las reivindicaciones 3-9 en tanto que dependientes de las reivindicaciones 1 y 2, cumplen con el requisito de novedad del art. 6.1 de la Ley de Patentes. Sin embargo, no incluyen características técnicas que en combinación con las de las reivindicaciones de las que dependen supongan actividad inventiva por las siguientes razones:

El uso de cebadores universales para amplificar la región intergénica 16S-23S está descrito en D1 para los mismos microorganismos y su diseño es obvio para un experto en la materia que dispone de las herramientas informáticas apropiadas;

El uso de cultivos puros está descrito en D5 (párrafo 0032);

Las bacterias de la invención ya han sido identificados en multitud de organismos y particularmente en peces (ver D1-D5);

Finalmente el uso de un control de amplificación interno es habitual cuando se amplifican fragmentos de ácidos nucleicos mediante PCR (ver D5, párrafo 0025).

Por lo tanto, las reivindicaciones 3-9 no cumplen con el requisito de actividad inventiva que establece el art. 8.1 de la Ley de Patentes

Reivindicaciones 10 y 11:

La sonda SEQ ID NO 3 forma parte de un fragmento mayor dentro de la región intergénica 16S-23S y las sondas SEQ ID NO 4 y SEQ ID NO 5 no están divulgadas en el estado de la técnica disponible; Por lo tanto la reivindicación 10 cumple el requisito de novedad establecido en el art. 6.1 de la Ley de Patentes.

Sin embargo, como ya se ha razonado en apartados anteriores, en vista de lo descrito en D2, SEQ ID NO 3 se encuentra en una zona de la región intergénica 16S-23S muy específica de *P.damselae*, por lo que es obvia para un experto en la materia que cuenta además con programas informáticos apropiados para el diseño de sondas (ver D5, párrafo 0036). En consecuencia, la reivindicación 10, tal y como está redactada carece de actividad inventiva.

La reivindicación 11 está anticipada por la SEQ ID NO 27 de D3 y, puesto que carece de novedad, también carece de actividad inventiva.

Reivindicaciones 12-14:

Las reivindicaciones 12-14 cumplen el requisito de novedad según el art. 6.1 de la Ley de Patentes puesto que no está anticipado un kit como el que describen. Sin embargo, en vista de D4 o D5, no cumplen el requisito de actividad inventiva que establece el art. 8.1 de la Ley de Patentes.