



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 377 690**

②1 Número de solicitud: 201001157

⑤1 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

①2

SOLICITUD DE PATENTE

A1

②2 Fecha de presentación: **08.09.2010**

④3 Fecha de publicación de la solicitud: **30.03.2012**

④3 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
30.03.2012

⑦1 Solicitante/s: **Instituto Valenciano de
Investigaciones Agrarias (IVIA)
Crta. Moncada-Naquera, Km. 4,500
46113 Moncada, Valencia, ES
Fundo de Defensa Da Citricultura (FUNDECITRUS)**

⑦2 Inventor/es: **Bertolini, Edson;
Cambra Álvarez, Mariano;
Serra Alfonso, Pedro;
López González, María Milagros;
Lopes, Silvio;
Duran-Vila, Nuria;
Ayres, Juliano y
Bové, Joseph**

⑦4 Agente/Representante:
González Palmero, Fé

⑤4 Título: **Procedimiento directo de detección específica de *Candidatus Liberibacter* spp., mediante dianas inmovilizadas y PCR a tiempo real y kit para su detección.**

⑤7 Resumen:

Procedimiento directo de detección específica de *Candidatus Liberibacter* spp., mediante dianas inmovilizadas y PCR a tiempo real y kit para su detección.

Se detalla un procedimiento de preparación, conservación y análisis de muestras de material vegetal y artrópodos para diagnóstico y detección mediante amplificación molecular basada en PCR a tiempo real. El procedimiento se ha aplicado a la detección de *Ca. Liberibacter* spp., agentes patógenos de la enfermedad del Huanglongbing de los cítricos, zebra chip de la patata y otras. Las muestras son inmovilizadas en soportes de papel o nylon mediante impresión de tejidos o escachado de artrópodos o absorbidas en papel o nylon cuando se trata de muestras líquidas. Las muestras inmovilizadas, pueden ser conservadas a temperatura ambiente. El protocolo de análisis comienza por la extracción de dianas del soporte con agua destilada, octoxinol o tampón glicina y posterior análisis por PCR a tiempo real. Se detallan las secuencias de nucleótidos de iniciadores para amplificación molecular en las que se basa el kit de detección.

ES 2 377 690 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento directo de detección específica de *Candidatus Liberibacter* spp., mediante dianas inmovilizadas y PCR a tiempo real y kit para su detección.

Campo de la invención

La invención se relaciona en general con la detección de material genético (secuencias de ácidos nucleicos) mediante el empleo de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real, y en particular con la preparación previa de las muestras y su conservación, antes de realizar PCR cuantitativa a tiempo real. El procedimiento comprende la inmovilización directa, conservación y extracción de las dianas de interés para su amplificación molecular por PCR a tiempo real. La invención, por tanto, se relaciona con: 1) un procedimiento de preparación directa de muestras mediante inmovilización en membranas de papel o nylon por impresión o escachado de material vegetal o artrópodos, 2) un procedimiento para analizar extractos brutos de muestras de material vegetal o DNA purificado, inmovilizado en soportes sólidos, 3) un método de conservación de las membranas conteniendo muestras de cualquier tipo, 4) un sistema de extracción de dianas sin purificación de ácidos nucleicos y 5) unas secuencias de nucleótidos de iniciadores y sonda TaqMan específicos, para el diagnóstico y detección universal de *Ca. Liberibacter* spp., de cualquier origen, huésped o vector, mediante un kit basado en todo lo anterior.

Antecedentes de la invención

La patente ES 2 110 916 de 25 de mayo de 1996, de la cual fue solicitante el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) e inventores Mariano Cambra Álvarez, Antonio Olmos Castelló y Miguel Ángel Dasi Rodríguez, describe un procedimiento de preparación de dianas para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional. Esta patente ha sido mantenida por IVIA hasta la fecha. En la actualidad, se han realizado nuevas aplicaciones y modificado el procedimiento inicialmente descrito en la patente y posteriormente por Olmos *et al.*, 1996 (Nucleic Acids Res. 24, 2192-2193), para simplificarlo y poderlo aplicar a agentes patógenos no ensayados todavía y muy problemáticos en su detección, como bacterias Gram negativas no cultivables *in vitro* (limitadas al floema o al xilema de plantas y a artrópodos).

El procedimiento de inmovilización de dianas en soportes sólidos (membranas), su extracción y análisis mediante PCR o RT-PCR a tiempo real, sólo se ha aplicado a la detección de virus en material vegetal y en artrópodos (Olmos *et al.*, 2005. J. Virol. Methods 128, 151-155; Cambra *et al.*, 2006. In: Virus Diseases and Crop Biosecurity, Ed. NATO-Security through Science. Series C. Springer. 81-88 pp.; Osman y Rowhani, 2006. J. Virol. Methods 133, 130-136; Olmos *et al.*, 2007. In: Biotechnology and plant diseases management. CABI Press, British Columbia. 227-249 pp.; Bertolini *et al.*, 2008. Eur. J. Plant Pathol. 120, 177-188; López *et al.*, 2009. Curr. Issues Mol. Biol. 11, 13-46; Capote *et al.* 2009. Int. Microbiol. 12, 1-6; Bertolini *et al.*, 2010. Eur. J. Plant Pathol. 128, 283-287. El procedimiento no ha sido descrito para detección de bacterias restringidas al floema o xilema de plantas (sin fase epífita), en material vegetal ni en sus vectores. La detección fiable de estos organismos, algunos de ellos clasificados como de cuarentena, hace necesario el desarrollo de técnicas, protocolos y kits extremadamente sensibles y específicos para su detección y diagnóstico y que puedan ser empleados en gran escala de una forma sencilla. Además, la invención permite la conservación y el uso de controles inmovilizados sin riesgo de escapes.

Candidatus Liberibacter spp. está constituido, hasta ahora, por un grupo de seis especies: *Ca. Liberibacter asiaticus*, *Ca. Liberibacter africanus*, *Ca. Liberibacter americanus*, *Ca. Liberibacter endosymbiont*, *Ca. Liberibacter solanacearum* y *Ca. Liberibacter europaeus* (Bové. 2006. J. Plant Pathol. 88, 7-37; Liefting *et al.*, 2009. Plant Dis. 93, 208-214; Raddadi *et al.*, 2011. Environmental Microbiology 13(2), 414-426). Estas especies de bacterias Gram negativas, no son fácilmente cultivables en medios artificiales *in vitro* (Sechler *et al.*, 2009. Phytopathology 99, 480-486), están restringidas al floema, son dispersadas naturalmente por diversas especies de psilas y por propagación vegetativa, y causan enfermedades con graves repercusiones económicas en cítricos, patata y plantas hortícolas (Bové. 2006; Secor *et al.*, 2008. Am. J. Potato Res. 85; 29 Li *et al.*, 2009. J. Microbiol. Methods 78, 59-65; Brown *et al.*, 2010. Plant Disease 94, 376).

Las especies que afectan a los cítricos causan la enfermedad denominada Huanglongbing o HLB (Bové. 2006), también denominada "greening", que es actualmente la enfermedad más devastadora de los cítricos (Duran-Vila *et al.*, 2009. Levante Agrícola 398, 348-355). La enfermedad bacteriana HLB afecta gravemente la producción de cítricos en varios países de Asia, África, América y Oceanía. La enfermedad no ha sido detectada en países de la UE, ni de la cuenca del Mediterráneo, donde se considera al agente causal como organismo de cuarentena, según la Directiva 2000/29/CE y otras en otros países. Ello obliga a notificar su detección y proceder a su erradicación, en caso de confirmarse la presencia de plantas infectadas, implicando serias restricciones internacionales al movimiento y comercio de material vegetal de cítricos para propagación.

HLB puede afectar a todas las especies y cultivares de cítricos (naranjos, mandarinos, pomelos, limas y limoneros, entre otros) injertados sobre cualquier patrón. El agente responsable de HLB ha sido caracterizado por métodos moleculares como tres especies "candidatas" (no cultivables *in vitro*) del género *Liberibacter* (*Ca. Liberibacter africanus*, *asiaticus* y *americanus*). El HLB africano está asociado a la especie *Ca. L. africanus* que es sensible al calor y está ex-

tendida por las regiones del sur y este de África y es transmitida, en condiciones naturales, por la psila *Trioza erythrae*. El HLB asiático está asociado a la especie *Ca. L. asiaticus* que es más tolerante al calor y se transmite naturalmente mediante la psila *Diaphorina citri*. Esta forma de HLB está presente en Asia, Brasil, Florida (EEUU), y también en Oceanía. El HLB americano está asociado a dos especies, *Ca. L. americanus* y *Ca. L. asiaticus*, ambas transmitidas por la psila *D. citri*. Experimentalmente, cualquier especie de *Liberibacter* de los cítricos puede ser transmitida indistintamente por *D. citri* o por *T. erythrae*. Según los datos disponibles, las únicas zonas libres tanto de HLB como de sus vectores, son los países de la cuenca del Mediterráneo, Australia, Nueva Zelanda y algunas islas del Pacífico (Teixeira *et al.*, 2008. Mol. Cell Probes 22, 139-150). Sin embargo, *T. erythrae*, vector de *Ca. L. africanus*, se encuentra ya en Madeira (Portugal) y en varias islas de Canarias, donde se ha confirmado su presencia desde 2002 (Pérez y Carnero, 2002. Granja 9:54-57; Duran-Vila *et al.*, 2009). La presencia del vector hace que esta zona sea especialmente vulnerable a la introducción fortuita de las especies de *Ca. Liberibacter* causantes de HLB, que luego se dispersaría con relativa rapidez. Por tanto, resulta imprescindible realizar prospecciones periódicas intensivas y analizar las muestras tomadas en laboratorios especializados mediante técnicas sensibles y fiables.

En cultivos de plantas hortícolas y en solanáceas de cultivo extensivo como la patata, causa proliferaciones, distorsiones, enanismo, clorosis en la planta y necrosis en los haces vasculares de los tubérculos, dando lugar a enfermedades conocidas como “zebra chip” de la patata (Secor *et al.*, 2008; Rehman *et al.* 2010. Plant Disease 94, 376-377) y otras como “tomato vein-greening” (Brown *et al.*, 2010) o afecciones en zanahoria (Munyanza *et al.*, 2010. Plant Dis. 94, 639). *Ca. L. solanacearum* es transmitida por la psila *Bacteriocera cockerelli* (Hansen *et al.*, 2008. Appl. Environ. Microbiol. 74, 5862-5865) y muy probablemente por otras especies. Se supone que *Ca. L. solanacearum* inoculada en cítricos podría inducir HLB como las otras especies de *Ca. Liberibacter* anteriormente reseñadas. La presencia de un psílido que fuera visitante de cultivos hortícolas y cítricos, podría provocar la transmisión de la bacteria de unos cultivos a otros.

La detección de *Ca. Liberibacter* spp. se ha realizado mediante diversos métodos y técnicas: plantas indicadoras o pruebas biológicas (Roistacher. 1991. In: Techniques for biological detection of specific citrus graft transmissible diseases. FAO, Rome. 35-45 pp.), pruebas bioquímicas (Schwarz. 1968. Proc. 4th Conf. Int. Org. Citrus Virol., IOCV. 118-124), microscopía electrónica (Lafèche y Bové, 1970. Fruits 25, 455-465), ensayos serológicos (Garnier y Bové. 1993. Proc. 12th Conf. Int. Org. Citrus Virol., IOCV. 212-219) y técnicas moleculares basadas en hibridación molecular de DNA (Villechanoux *et al.*, 1992. Current Microbiol. 24, 89-95), PCR convencional (Jagoueix *et al.*, 1996. Mol. Cell Probes 10, 43-50; Teixeira *et al.*, 2005. Mol. Cell Probes 19, 173-179) y PCR a tiempo real (Li *et al.*, 2006; Teixeira *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008. Plant Dis. 92, 854-861; Li *et al.*, 2009. Phytopathology 99, 139-144; Lopes *et al.*, 2009. Phytopathology 99, 301-306). Las técnicas basadas en PCR a tiempo real, con química SYBR-Green o sondas TaqMan, son las más sensibles y fiables para detección de *Ca. Liberibacter* spp. (Teixeira *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2006, respectivamente). No obstante, el protocolo de preparación de muestras resulta tedioso, caro y largo ya que precisa la purificación de DNA total de las muestras mediante protocolos convencionales basados en el uso de Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) o de kits comerciales. Esta operación se efectúa normalmente a partir de extractos vegetales obtenidos del nervio central de las hojas. Mediante este sistema, que implica riesgos de contaminación entre muestras y liberación de inhibidores de la PCR, únicamente se pueden analizar unas 50 muestras/operario/día.

La presente invención proporciona un procedimiento de preparación de dianas de cítricos, plantas hortícolas, patata, ornamentales y artrópodos para su uso directo en PCR a tiempo real, su conservación por largos periodos antes del análisis o como controles, y su análisis directo tras una sencilla extracción de las dianas de *Ca. Liberibacter* spp. inmovilizadas en soportes sólidos (véanse ejemplos de aplicación 1, 2 y 3).

Descripción de la invención

Así pues, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de preparación de dianas para PCR a tiempo real, su conservación y su extracción para análisis mediante PCR a tiempo real utilizando los iniciadores identificados como *CaLf*, *CaLr* (para detección de cualquier *Ca. Liberibacter* spp.). El término “diana para PCR” en el sentido utilizado en esta descripción, se refiere a fragmentos de ácidos nucleicos (ADN) desnudos o situados dentro de células de vegetales o de artrópodos o en fluidos de los mismos.

El procedimiento comprende las siguientes etapas:

- i) Inmovilización de las dianas para PCR a tiempo real de secciones impresas o de escachados de muestras de tejidos de vegetales o de artrópodos que las contienen (Figuras 1 y 3, respectivamente) o de sus extractos brutos;
- ii) Conservación de las dianas inmovilizadas en soportes sólidos conteniendo muestras de cualquier tipo;
- iii) Extracción de las dianas para posterior análisis por PCR a tiempo real;
- iv) Análisis de las muestras mediante PCR utilizando los iniciadores y las sondas específicas identificadas y descritas en esta invención.

ES 2 377 690 A1

Para efectuar la inmovilización o fijación de las dianas para PCR a tiempo real a partir de muestras vegetales o artrópodos que las contienen: secciones o la zona de escisión tras arrancado manual de órganos de vegetales (hojas enteras enrolladas, pedicelo de hojas, pedúnculo de frutos, albedo y columela de frutos, partes de flores, brotes, tallos, corteza de ramas y tronco y raíces) o del artrópodo entero, se ponen en contacto con un soporte apropiado, bajo condiciones adecuadas y durante un período de tiempo suficiente como para que la diana para PCR a tiempo real quede retenida sobre dicho soporte. El soporte adecuado para llevar a cabo esta etapa puede ser una membrana de nylon o de cualquier tipo de papel convencional, preferentemente Whatman 3 MM por su alta capacidad de absorción de líquidos y su bajo coste. En este caso concreto, se ha utilizado el papel Whatman 3 MM para estandarizar el método propuesto por esta invención para la detección de *Ca. Liberibacter spp.* Las muestras pueden ser sólidas, por ejemplo, secciones frescas de tejidos de vegetales o tejidos de vegetales o artrópodos directamente escachados, o muestras líquidas, como por ejemplo, extractos de vegetales o de artrópodos o soluciones de ácidos nucleicos previamente purificados. Cuando la muestra es sólida, por ejemplo, una sección fresca de tejido de vegetal, su inmovilización en el soporte se realiza por impresión o escachado, es decir, presionando la muestra firmemente sobre el soporte durante un corto período de tiempo (unos segundos). En el caso de muestras líquidas, unos 5 microlitros del extracto bruto, o diluido en tampón, o de la solución purificada de ácidos nucleicos, se depositan directamente en el soporte poroso quedando así retenidas por absorción. La operación de fijación de muestras se puede realizar directamente en membranas en condiciones de campo o laboratorio (impresiones o escachados), o en secciones de unos 5 mm² previamente introducidas en tubos tipo Eppendorf o en pocillos de microplacas de 96 pocillos tipo ELISA (extracto bruto diluido). Esta última modalidad es la más apropiada para extractos y muestras líquidas por facilitar su depósito directamente en el contenedor en el que se realizará la extracción de las dianas.

Las dianas retenidas en el soporte sólido, impresionadas, escachadas o absorbidas (membrana o trozos de la misma contenidos en tubos Eppendorf o placas ELISA) pueden ser procesadas directamente o bien pueden ser conservadas en condiciones de poca humedad y preferentemente en la oscuridad durante un período de tiempo de al menos dos años, sin que se produzca una pérdida de sensibilidad en la detección por PCR a tiempo real. Para ello, las membranas conteniendo las dianas se introducen en un sobre de papel para garantizar la oscuridad, se conservan a temperatura ambiente o a 4°C en un contenedor hermético con desecante tipo silicagel o cloruro de calcio. Otra modalidad consiste en introducir el sobre conteniendo las membranas con las muestras inmovilizadas en una bolsa de plástico apta para realizar vacío y efectuarlo mediante un simple aparato de vacío alimentario.

La conservación de tubos Eppendorf o placas ELISA con secciones de membranas impresas o absorbidas con líquidos se realiza cerrando los tubos y/o sellando las placas y manteniendo las muestras inmovilizadas en oscuridad y a temperatura ambiente en un lugar de ambiente seco.

Para la extracción de las dianas previamente fijadas en el soporte, para análisis por PCR a tiempo real, se introducen secciones recortadas del soporte conteniendo las dianas en contenedores adecuados, tubos Eppendorf por ejemplo. En este caso y en el caso de haber dispensado líquido en secciones de membranas ya introducidas en tubos o microplacas ELISA, se realizará el siguiente tratamiento: 1) Dispensar 100 microlitros de agua destilada o tampón glicina 0.1 M o bien del detergente no iónico octoxinol (Tritón X-100 Merck) para cubrir la sección de soporte contenida en el tubo o pocillo de microplaca, 2) Calentar a 100°C durante 10 minutos en un termobloque o al baño María. Esta operación se puede obviar en análisis de rutina, 3) Realizar agitación durante 5 segundos para asegurar el contacto del agente extractor de las dianas caliente, y 4) Realizar un pulso de centrifugación (unas 6.000 rpm en unos 5 segundos).

A continuación, con las dianas solubilizadas se procede a realizar la amplificación por PCR a tiempo real de la manera que se detalla en los ejemplos 1, 2 y/o 3.

Mediante el procedimiento desarrollado en esta invención se evita, en primer lugar, la necesidad de preparar extractos de material vegetal y purificar ácidos nucleicos, y en segundo lugar, con este procedimiento se logra una inmovilización eficiente y duradera de las dianas para su posterior análisis por PCR a tiempo real. Además, el protocolo y kit diseñados permiten la realización sencilla y rutinaria de numerosos análisis de forma rápida y con la alta precisión de la técnica molecular utilizada.

Los siguientes ejemplos ilustran formas concretas de realización de los procedimientos objeto de esta invención.

Ejemplo 1

Detección por PCR a tiempo real de Ca. Liberibacter spp. en material vegetal de cítricos y de apio impreso en membranas de papel

1.1. Preparación de la diana para PCR a tiempo real

Secciones frescas de pedicelo de hojas (arrancadas manualmente) procedentes de diversas muestras de material vegetal de *Citrus sinensis* cv. Pera y Valencia con y sin síntomas de HLB se inmovilizaron en papel Whatman 3 MM en São Paulo (Brasil) presionando firmemente las secciones de dichos tejidos sobre el soporte. Parte fueron analizadas en Brasil tras la impresión. El resto de las membranas impresas fueron enviadas por correo al laboratorio del IVIA en Valencia (España) y se analizaron tras una semana de su recepción (aproximadamente a los 30 días de su impresión). En el caso de muestras con síntomas de HLB se imprimieron, ligeramente superpuestas, tres hojas tomadas de la zona con síntomas. En el caso de árboles asintomáticos se imprimieron superpuestas en un área de unos 0,5 mm² de soporte,

ES 2 377 690 A1

10 hojas tomadas alrededor del árbol sospechoso a analizar. De igual manera, se inmovilizaron dianas de secciones de tallos de *Apium graveolens* (apio) con síntomas de distorsión (una impresión por sección de tallo con síntomas) procedentes de la provincia de Alicante (España), que fueron analizadas inmediatamente a su impresión.

5 A continuación, las impresiones directas de material vegetal en papel fueron recortadas e introducidas en tubos Eppendorf de 1,5 ml a los que se añadieron 100 μ l de agua destilada estéril y a continuación se aplicó agitación vigorosa durante 5 segundos (“vortex”). Seguidamente se centrifugaron los tubos (6.000 rpm durante 6 segundos), con lo que las dianas pasaron al sobrenadante.

10 1.2. Amplificación por PCR a tiempo real

Se utilizaron los dos iniciadores específicos de *Ca. Liberibacter* spp. descritos en esta patente CaLf y CaLr y la sonda TaqMan descrita por Li *et al.* (2006), pero marcada con los fluoróforos 6-carboxyfluorescein (FAM) en el extremo 5' y N,N,N',N'-tetramethyl-6-carboxyrhodamine (TAMRA) en el extremo 3' (Applied Biosystems). Se preparó el cóctel de amplificación en un volumen final de 12 μ l, compuesto por: 1 \times Path-ID™ qPCR master mix (Ambion), 0,5 μ M de cada uno de los iniciadores descritos (CaLf y CaLr), 100 nM de la sonda TaqMan descrita y 3 μ l de las dianas directamente extraídas según el procedimiento descrito. El protocolo de amplificación consistió en 1 ciclo de 95°C durante 10 minutos y 45 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60C durante 1 minuto. La amplificación se realizó en termocicladores StepOne Plus (Applied Biosystems).

20 Un ejemplo de los resultados obtenidos tras los análisis se muestra en la Figura 2. En ella, se observan curvas de amplificación típicas de PCR a tiempo real y sus correspondientes ciclos de amplificación (Ct), procedentes tanto de muestras sintomáticas de cítricos como de apio y de algunas muestras asintomáticas tomadas de árboles de naranjo dulce en zonas endémicas de *Ca. Liberibacter* spp. en São Paulo, Brasil. Se produjeron amplificaciones tanto de las dianas de *Ca. Liberibacter asiaticus* impresas y analizadas inmediatamente, como de aquellas enviadas por correo y analizadas un mes tras la impresión. El Ct no varió significativamente para muestras amplificadas ya procedieran de cítricos o apio o su procesado fuera inmediato a la impresión o tras un mes de la misma. Estos Cts se produjeron en el rango de 24,53 a 41,18. Los controles positivos (impresiones de *Vinca rosea* de la colección de HLB del INRA de Burdeos, Francia) conservados como control, según el método descrito, durante un año, proporcionaron valores de Ct de 25,00 a 33,34. El control de ADN purificado de *Ca. Liberibacter asiaticus* amplificó normalmente tras 20,94 Ct. Los controles negativos (impresiones de material vegetal en membranas) de plantas de naranjo dulce y de apio sanas, no produjeron ninguna amplificación (valores de Ct no determinados tras 45 ciclos), así como los controles de cóctel y secciones de membrana no impresas.

35 Ejemplo 2

Detección por PCR a tiempo real de Ca. Liberibacter spp. en extractos brutos de material vegetal absorbidos en membranas de papel

40 2.1. Preparación de la diana para PCR a tiempo real

Se homogenizaron 0,5 g de la nerviadura central de 5 hojas de *Citrus sinensis* (naranjo dulce) con síntomas de HLB y hojas enteras de *Vinca rosea*, todas ellas de la Colección del INRA de Burdeos, Francia y de Fundecitrus, Araraquara, São Paulo, Brasil, inoculadas con 14 *Ca. Liberibacter asiaticus*, *africanus* y *americanus* de orígenes diferentes (véase Tabla 1). Se preparó el extracto utilizando 10 ml de tampón de extracción (agua fisiológica tamponada-PBS, pH 7,2 + 0,2% dietil ditiocarbamato sódico-DIECA). El material de cítricos se homogeneizó en bolsas de plástico de malla gruesa (Plant Print Diagnostics S.L.) y el de *Vinca rosea* en bolsas de plástico de malla fina (Bioreba S.L.). Se depositaron 5 μ l de los extractos brutos en 0,5 mm² de discos o secciones de membrana de papel Whatman 3 MM contenidos en tubos Eppendorf. Además de los extractos brutos, se dispensaron de la misma forma en discos de papel, 5 microlitros de una solución de DNA purificado (Colección IVIA) de 3 orígenes de *Ca. Liberibacter solanacearum* (véase Tabla 1) y ADN o ARN purificado de diversos agentes patógenos de los cítricos y de las solanáceas (véase Tabla 1). Tras dispensar las muestras y controles, se dejó secar a temperatura ambiente durante 20-30 minutos. Con ello las dianas de *Ca. Liberibacter* spp. contenidas en los 5 microlitros de extracto bruto y las dianas de los agentes patógenos ensayados, quedaron inmovilizadas en los discos del soporte sólido contenidos en tubos Eppendorf. Seguidamente se añadieron 100 μ l de agua destilada estéril y a continuación se aplicó un “vortex” de 5 segundos. A continuación se centrifugaron los tubos (6.000 rpm durante 6 segundos), con lo que las dianas pasaron al sobrenadante.

La amplificación por PCR a tiempo real se realizó de la misma forma que en el ejemplo 1 anterior utilizando los iniciadores de PCR objeto de la invención. Los resultados indicados en la Tabla 1 muestran que se produjo amplificación por PCR a tiempo real con todos los orígenes ensayados que contenían *Ca. Liberibacter* spp. (incluyendo las especies: *asiaticus*, *africanus*, *americanus* y *solanacearum*) en distintos hospedadores y de muy diversas zonas geográficas. Los valores Ct se indican en la Tabla 1. No se produjo amplificación con ninguno de los otros agentes patógenos de los cítricos y de las solanáceas ensayados, demostrándose la especificidad de los iniciadores diseñados. Por otra parte, se demostró la eficacia del procedimiento de inmovilización y extracción de dianas objeto de la invención, a partir de extractos brutos o de ADN purificado y absorbidos en soporte de papel.

Ejemplo 3

*Detección por PCR a tiempo real de Ca. Liberibacter spp. en psilas escachadas en papel*5 3.1. *Preparación de la diana para PCR a tiempo real*

Psilas de la especie *Diaphorina citri* capturadas en Araraquara (Brasil) sobre árboles de naranjo dulce (*C. sinensis*) con síntomas de HLB e infectados por *Ca. Liberibacter asiaticus*, fueron conservadas en alcohol etílico (70%) durante 30 días y remitidas por correo al IVIA para su análisis. De un total de 196 psillas, se escacharon individualmente 10 98 psillas en papel Whatman 3 MM (Figura 3) con el auxilio de la base de un tubo Eppendorf, que fue cambiado entre cada muestra. Con ello, se inmovilizaron las posibles dianas de *Ca. Liberibacter spp.* que pudieran portar estos vectores. A continuación, el soporte de papel conteniendo las psilas escachadas fue recortado en piezas o discos de unos 0,5 mm² e introducidas en tubos Eppendorf de 1,5 ml a los que se añadieron 100 µl de tampón 0.1 M glicina conteniendo 0.01 M NaCl y 1 mM EDTA en agua destilada estéril. Los tubos fueron calentados a 100°C durante 10 15 minutos en un termobloque y seguidamente se aplicó un vortex, con lo que las dianas pasaron al sobrenadante que se empleó directamente como muestra. Otra parte igual de la misma población de psillas (98 individuos) fue analizada mediante purificación de ADN, de grupos de 5 psilas, según el método descrito por Teixeira *et al.* (2005).

20 3.2. *Amplificación por PCR a tiempo real*

La amplificación por PCR a tiempo real para detección específica de *Ca. Liberibacter spp.* se realizó de la misma forma que en los ejemplos anteriores 1 y 2, tanto de las psilas escachadas como del ADN purificado.

Un ejemplo de los resultados obtenidos de los análisis de las 98 *Diaphorina citri* ensayadas escachadas en papel se muestran en la Figura 4. En la misma se observan las típicas curvas de amplificación de PCR a tiempo real en las psilas portadoras de *Ca. Liberibacter spp.*, que resultaron 48 de las 98 ensayadas (48,97% de psilas portadoras). Los Ct de las psilas positivas variaron de 28,85 a 37,42. La amplificación por PCR a tiempo real de ADN purificado de las psilas proporcionó un porcentaje similar de amplificación. Ello demuestra la eficacia del procedimiento objeto de la invención, para la detección fiable de dianas de *Ca. Liberibacter spp.* en el artrópodo vector *D. citri*, mediante un 30 método más rápido, sencillo y económico que el convencional hasta ahora utilizado.

Descripción de los dibujos

La figura 2.- Muestra curvas de amplificación por PCR a tiempo real de *Candidatus Liberibacter spp.* utilizando 35 muestras de cítricos y apio impresas en membranas de papel.

La figura 3.- Muestra escachados en membranas de papel Whatman de la psila *Diaphorina citri*, vector natural de *Ca. Liberibacter asiaticus*. Se indica en la figura el área aproximada de 0.5 mm² que contiene las dianas de *Ca. Liberibacter asiaticus* inmovilizadas para ser extraídas dentro de un tubo Eppendorf o en un pocillo de placa ELISA y 40 posterior análisis por PCR a tiempo real.

La figura 4.- Muestra curvas de amplificación por PCR a tiempo real de *Candidatus Liberibacter asiaticus* utilizando como muestra psilas escachadas en papel.

La tabla 1.- Muestra las especies de *Candidatus Liberibacter spp.* y de otros agentes patógenos de distintos huéspedes y orígenes geográficos, utilizados para la validación de los iniciadores diseñados.

La tabla 2.- Corresponde a los resultados de amplificación de las muestras de cítricos y apio impresas en papel, correspondientes al ejemplo de la figura 2, donde se indica el tiempo de conservación a temperatura ambiente de las 50 dianas impresas.

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento directo de detección específica de *Candidatus Liberibacter* spp., mediante dianas inmovilizadas y PCR a tiempo real, **caracterizado** porque comprende las etapas de: i) Inmovilización de las dianas para PCR a tiempo real de muestras vegetales o de artrópodos que las contienen, en un soporte sólido, y ii) Extracción de las dianas para PCR a tiempo real con agua destilada o un agente capaz de solubilizar dichas dianas.

10 2. Procedimiento directo de detección específica de *Candidatus Liberibacter* spp., mediante dianas inmovilizadas y PCR a tiempo real, según reivindicación 1ª, **caracterizado** porque en la conservación de las dianas inmovilizadas permite largos periodos de almacenamiento y su envío por correo para posterior análisis por PCR a tiempo real.

15 3. Procedimiento directo de detección específica de *Candidatus Liberibacter* spp., mediante dianas inmovilizadas y PCR a tiempo real, según reivindicación 1ª, **caracterizado** porque se emplea para analizar sistemáticamente por PCR a tiempo real, dianas inmovilizadas y conservadas en tubos Eppendorf o en pocillos de placas ELISA.

20 4. Procedimiento directo de detección específica de *Candidatus Liberibacter* spp., mediante dianas inmovilizadas y PCR a tiempo real, según reivindicación 1ª, **caracterizado** porque utiliza como iniciador directo para amplificación por PCR a tiempo real de *Ca. Liberibacter* spp. la secuencia (SEQ ID No 1) de 21 nucleótidos, deposición 15-36, de la secuencia de *Ca. Liberibacter asiaticus* 16S ribosomal RNA gene (GenBank nº L22532.1), denominada CaLf.

25 5. Procedimiento directo de detección específica de *Candidatus Liberibacter* spp., mediante dianas inmovilizadas y PCR a tiempo real, según reivindicación 1ª, **caracterizado** porque utiliza como iniciador reverso para amplificación por PCR a tiempo real de *Ca. Liberibacter* spp. la secuencia (SEQ ID No 2) de 21 nucleótidos, complementaria a la posición 103-124 de la secuencia de *Ca. Liberibacter asiaticus* 16S ribosomal RNA gene (GenBank nº L22532.1), denominada CaLr.

30 6. Procedimiento directo de detección específica de *Candidatus Liberibacter* spp., mediante dianas inmovilizadas y PCR a tiempo real, según reivindicaciones anteriores, **caracterizado** por el uso de dichas secuencias para la fabricación de un kit completo de diagnóstico, detección, identificación o caracterización de *Ca. Liberibacter* spp. o de sus especies separadas.

35

40

45

50

55

60

65

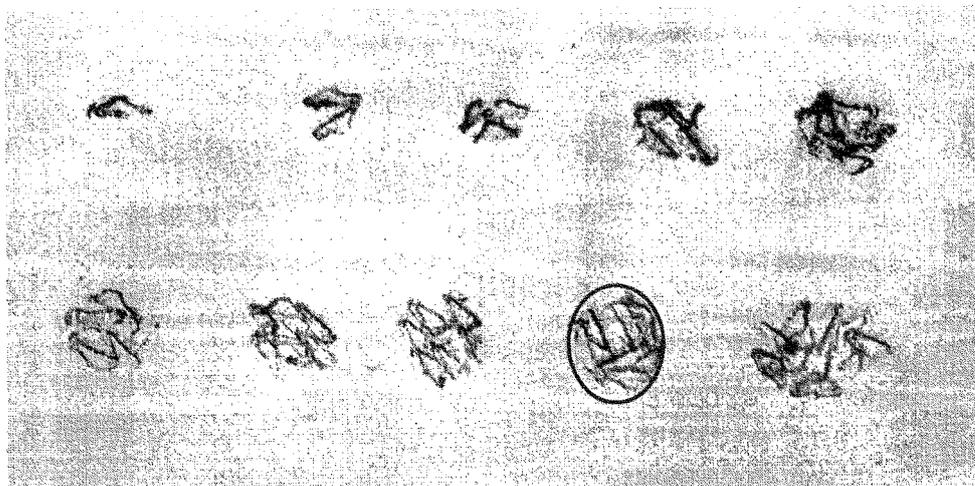


Figura 1.

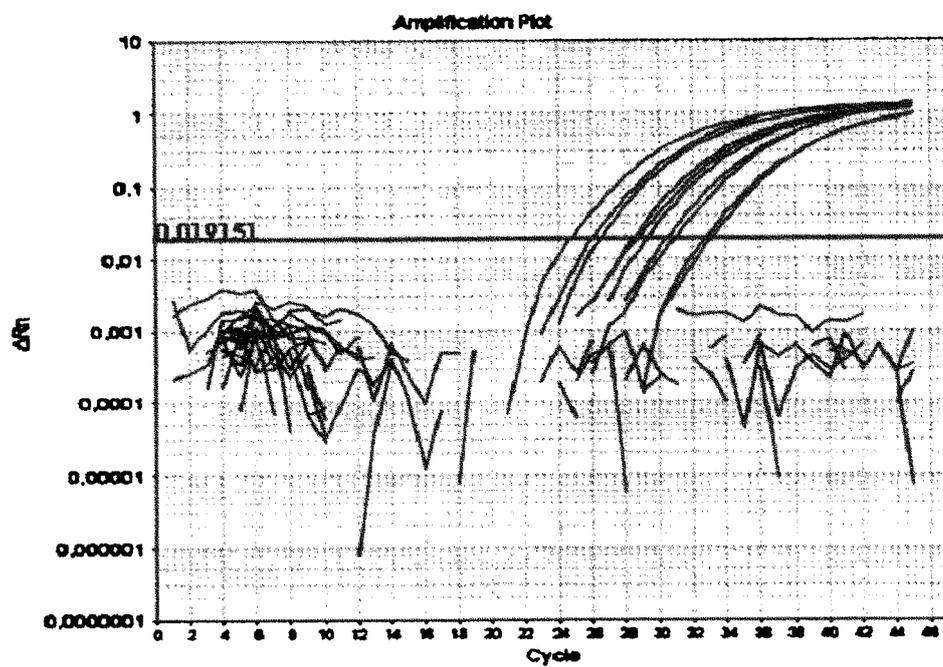


Figura 2.



Figura 3.

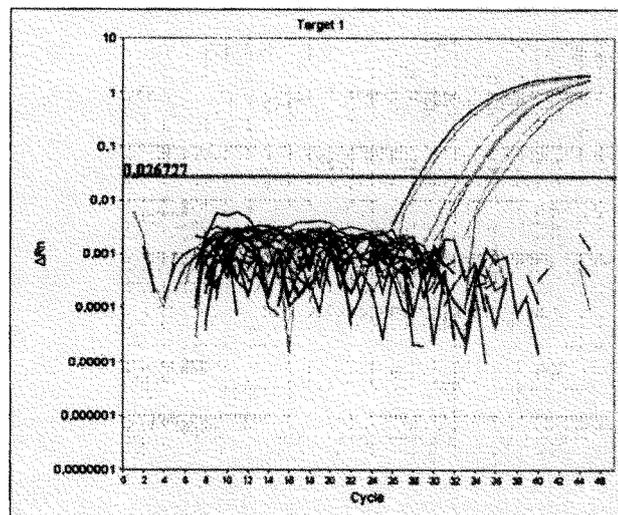


Figura 4.

TABLA 1

Especies	Huésped	Origen	PCR a tiempo real	
			Amplificación	Ct
<i>Candidatus Liberibacter americanus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Brasil (São Paulo)*	+	29.04
<i>Candidatus Liberibacter americanus</i>	<i>Citrus</i> sp.	Brasil (São Paulo)*	+	33.51
<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	<i>Citrus</i> sp.	Brasil (São Paulo)	+	27.65
<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	China (Fuzhou)*	+	30.29
<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Filipinas (Lipa city)*	+	30.28
<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	<i>Citrus</i> sp.	Filipinas (PH 70)*	+	29.34
<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Florida (Florida)*	+	31.07
<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	India (Poona 70) *	+	31.22
<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	<i>Citrus</i> sp.	India (Poona 70) *	+	34.19
<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	<i>Citrus</i> sp.	Indonesia-Bali*	+	28.58
<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	<i>Citrus</i> sp.	Malasia (95-1) *	+	40.01
<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	<i>Citrus</i> sp.	Islas Mauricio (95-11)*	+	27.72
<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	<i>Citrus</i> sp.	Islas Reunión (USA-7)*	+	26.98
<i>Candidatus Liberibacter africanus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Sud África (AFS 84) *	+	26.29
<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	<i>Citrus</i> sp.	Taiwán (LK 70) *	+	28.50
<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Tailandia (TH 88)*	+	32.53
<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	<i>Citrus</i> sp.	Vietnam (95-35) *	+	36.19
<i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i>	<i>Daucus carota</i>	España (colección IVIA)	+	28.36
<i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i>	<i>Apium graveolens</i>	España (colección IVIA)	+	27.67
<i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i>	<i>Solanum lycopersicy</i>	España (colección IVIA)	+	29.58
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	<i>Citrus</i> sp.	Brasil	-	Indeterminado
<i>Xylella fastidiosa</i>	<i>Citrus</i> sp.	Brasil	-	Indeterminado
<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Solanum lycopersicy</i>	España (colección IVIA)	-	Indeterminado
<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	España (1602.1 colección IVIA)	-	Indeterminado
<i>Spiroplasma citri</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Morocco (GH-3)*	-	Indeterminado
<i>Citrus tristeza virus</i>	<i>Citrus</i> sp.	España (T388, colección IVIA)	-	Indeterminado
<i>Citrus exocortis viroid</i>	<i>Citrus</i> sp.	España	-	Indeterminado
<i>Hop stunt viroid</i>	<i>Citrus</i> sp.	España	-	Indeterminado
<i>Citrus sudden death virus</i>	<i>Citrus</i> sp.	Brasil	-	Indeterminado

*INRA-Bordeaux collection

TABLA 2

Muestras	Ct
Naranja dulce con síntomas (tiempo 0)	25.63
Naranja dulce con síntomas (tiempo 30días)	25.87
Naranja dulce sin síntomas (tiempo 0)	34.87
Naranja dulce sin síntomas (tiempo 30días)	35.32
Naranja dulce sano (tiempo 0)	Indeterminado
Naranja dulce sano (tiempo 30días)	Indeterminado
Apio con síntomas	28.63
Apio con síntomas	25.36
Apio con síntomas	31.29
Apio sin síntomas	Indeterminado
Apio sano	Indeterminado
<i>Vinca rosea</i> (control positivo)	25.42
DNA purificado cítrico HLB CLas	20.94
Secciones de membranas no impresas	Indeterminado
Secciones de membranas no impresas	Indeterminado
Control positivo PCR (DNA purificado vinca)	21.36
Control negativo PCR (agua estéril)	Indeterminado

ES 2 377 690 A1

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias
- 5 <120> Procedimiento directo de detección específica de *Candidatus Liberibacter* spp., mediante dianas inmovilizadas y PCR a tiempo real y kit para su detección
- <160> 2
- 10 <170> BiSSAP 1.0
- <210> 1
- 15 <211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
- 20 <220>
<221> source
<222> 1..21
- 25 <223> /mol_type="DNA"
/note="Forward primer CaLF"
/organism="Artificial Sequence"
- <400> 1
- 30 **gcaggcctaa cacatgcaag t** **21**
- <210> 2
- 35 <211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
- 40 <220>
<221> source
<222> 1..21
- 45 <223> /mol_type="DNA"
/note="Reverse primer CaLR"
/organism="Artificial Sequence"
- 50 <400> 2
- gcacacgttt ccatgcgтта t** **21**
- 55
- 60
- 65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201001157

②② Fecha de presentación de la solicitud: 08.09.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ES 2110916 A1 (IVIA) 16.02.1998, ejemplos 1,2; reivindicaciones 1-4.	1-6
X	OSMAN, F. et al., 'Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan)', JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, 2006, Vol. 133, No. 2, páginas 130-136, ISSN: 0166-0934, Materiales y Métodos.	1-6
X	KIM, J.S. et al., 'Characterization of copy numbers of 16S rDNA and 16S rRNA of Candidatus Liberibacter asiaticus and the implication in detection in planta using quantitative PCR', BMC RESEARCH NOTES, 2009, Vol. 2, página 37, ISSN: 1756-0500 (Electronic), Métodos.	4-6
X	LI, W. et al., 'Quantitative real-time PCR for detection and identification of Candidatus Liberibacter species associated with citrus huanglongbing', JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS, 2006, Vol. 66, No. 1, páginas 104-115, ISSN: 0167-7012, materiales y Métodos, Figura 1.	4-6
X	JAGOUEIX, S. et al., 'PCR detection of the two 'Candidatus' Liberobacter species associated with greening disease of citrus', MOLECULAR AND CELLULAR PROBES, 1996, Vol. 10, No. 1, páginas 43-50. ISSN 0890-8508 (print), Materiales y Métodos.	4-6
X	JAGOUEIX, S. et al., 'The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the Proteobacteria', INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, 1994, Vol. 44, No. 3, páginas 379-386, ISSN: 0020-7713, Materiales y Métodos; Resultados, Figura 4.	4-6

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
16.03.2012

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
1/4

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, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 16.03.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 4-6	SI
	Reivindicaciones 1-3	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1, 4-6	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	ES 2110916 A1 (IVIA)	16.02.1998
D02	OSMAN, F. et al., <i>J. Virol. Methods</i> , (2006), 133 (2): 130-6.	2006
D03	KIM, J.S. et al., <i>BMC Res. Notes</i> , (2009), 2 : 37.	2009
D04	LI W. et al., <i>J. Microbiol. Methods</i> , (2006), 66 (1): 104-15.	2006
D05	JAGOUEIX, S. et al., <i>Mol. Cell. Probes</i> , (1996), 10 (1): 43-50.	1996
D06	JAGOUEIX, S. et al., <i>Int. J. Syst. Bacteriol.</i> , (1994), 44 (3): 379-86.	1994

En D1-D2 se describen métodos de preparación de dianas inmovilizadas para una reacción PCR.

En D3-D6 se describen procedimientos de detección de *Candidatus Liberibacter* spp.

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**1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes).****1.1. Reivindicación independiente 1.**

1.1.1. El objeto de la reivindicación 1 consiste en un método para la detección de *Candidatus Liberibacter* spp. que comprende una reacción PCR a tiempo real caracterizada por la inmovilización de las dianas objeto de la amplificación en un soporte sólido y su posterior extracción con agua destilada o un agente capaz de solubilizarlas. En los documentos D1 y D2 del estado de la técnica se describen procedimientos de preparación de dianas para PCR caracterizados porque dichas dianas son inmovilizadas en un soporte sólido y extraídas posteriormente para su amplificación enzimática (cf. D1: ejemplos 1 y 2; reivindicaciones 1-4. D2: Materiales y Métodos). Por consiguiente, el objeto de protección de la reivindicación independiente 1 y el de las reivindicaciones dependientes 2 y 3 se considera que no es nuevo sobre la base de los documentos D1-D2.

1.2. La presente solicitud no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 1-3 no es nuevo de acuerdo con el Art. 6.1. de la Ley de Patentes.

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).**2.1. Reivindicación independiente 1 en combinación con las reivindicaciones 4 a 6.**

2.1.1. Los documentos D1, D3-D6 constituyen el estado de la técnica más próximo. En D1 se divulga un procedimiento de preparación de dianas para PCR. En D3-D6 se describen procedimientos de detección y cuantificación de *Candidatus Liberibacter* spp. que consisten básicamente en una reacción PCR caracterizada por el uso de cebadores específicos del gen 16S rDNA de *Candidatus Liberibacter* spp. (cf. D1: Reivindicaciones 1-4. D3: Métodos. D4: Materiales y Métodos, Figura 1. D5: Materiales y Métodos. D6: Materiales y Métodos; Resultados, Figura 4).

2.1.2. El problema técnico a resolver por el objeto de la reivindicación independiente 1 puede ser considerado, por consiguiente, como la provisión de un nuevo procedimiento de detección de *Candidatus Liberibacter* spp.

2.1.3. La solución propuesta es el procedimiento de la reivindicación 1 en combinación con las reivindicaciones 4 a 6 que consiste básicamente en una reacción PCR a tiempo real caracterizada por el uso de los cebadores CaLf (SEQ ID No 1) y CaLr (SEQ ID No 2) que amplifican específicamente el gen 16S rDNA de *Candidatus Liberibacter* spp. Por consiguiente, la diferencia entre el procedimiento de la invención y los descritos en D3-D6 radica básicamente en los cebadores empleados en cada caso para la amplificación del gen bacteriano 16S rDNA. Las secuencias de los iniciadores utilizados tanto en la invención como en D3-D6 se corresponden con regiones altamente conservadas del gen concernido de *Candidatus Liberibacter* spp. (cf. D6: Figura 4). Puesto que en la solicitud no se especifica el supuesto efecto sorprendente e inesperado derivado del uso de los cebadores CaLf (SEQ ID No 1) y CaLr (SEQ ID No 2) frente a los descritos en D3-D6 que se traduciría en una mejora del procedimiento de detección de la invención frente a los divulgados en D3-D6, se considera que la solución propuesta por el objeto de las reivindicaciones 1 en combinación con las reivindicaciones 4 a 6 al problema técnico planteado es una alternativa no inventiva a la solución existente en el estado de la técnica que no requeriría de la aplicación de conocimientos técnicos inventivos por parte del experto en la materia.

2.2. La presente invención no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 1, 4-6, no implica actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1. de la Ley de Patente.