

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 833**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06764381 .7**
96 Fecha de presentación: **15.06.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1895015**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.03.2008**

54 Título: **Método y kit de detección de especies bacterianas mediante análisis de ADN**

30 Prioridad:
17.06.2005 ES 200501481
17.06.2005 US 691231 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.11.2012

73 Titular/es:
**INSTITUTO DE SALUD CARLOS III (100.0%)
SINESIO DELGADO, 6
28029 MADRID, ES**

72 Inventor/es:
**ANDA FERNÁNDEZ, PEDRO;
ESCUDERO NIETO, RAQUEL;
JADO GARCÍA, ISABEL;
RODRÍGUEZ MORENO, ISABEL y
JIMÉNEZ ALONSO, MARÍA ISABEL**

74 Agente/Representante:
PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 391 833 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método y kit de detección de especies bacterianas mediante análisis de ADN

5 La presente invención se refiere a la detección e identificación de diferentes especies bacterianas, todas ellas causantes de zoonosis, basada en el análisis de ADN. Más concretamente, la invención proporciona un método y un kit para la detección simultánea de bacterias y grupos bacterianos pertenecientes a los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Borrelia*, *Bartonella*, *Coxiella*, *Rickettsia* y *Francisella* basados en la amplificación de ADN.

10 ANTECEDENTES

Actualmente hay descritas unas 200 enfermedades zoonóticas (bartonelosis, leptospirosis, borreliosis de Lyme ..) que el hombre puede padecer. En los países del tercer mundo, representan una de las principales causas de mortalidad y suponen cuantiosas pérdidas económicas. La convivencia con animales, la ausencia de infraestructuras sanitarias y el bajo nivel cultural continúan siendo los principales aliados de estas enfermedades.

Determinados tipos de zoonosis tienden a extenderse por países desarrollados como consecuencia del aumento de la población en zonas urbanas y periurbanas, así como del aumento del tráfico de animales a nivel internacional, que conlleva el riesgo de introducir enfermedades exóticas en nuestro entorno.

Estas circunstancias unidas a los frecuentes hallazgos de artrópodos infectados por más de uno de los patógenos incluidos en la presente invención, aumenta la posibilidad de transmisión de más de una de las especies bacterianas incluidas en la presente invención por la misma picadura.

Así pues, cada vez son más comunes las hospitalizaciones debidas a cuadros clínicos producidos por el contacto del hombre con animales o con diferentes clases de artrópodos, tales como mosquitos, garrapatas, pulgas, piojos, ácaros, etc., los cuales actúan como vectores o como reservorios de patógenos. Dichos cuadros clínicos, debido a su gran similitud, no permiten una identificación rápida y fiable del agente causante de la patología, por lo que no es posible un tratamiento específico y rápido, y en ocasiones llega demasiado tarde. Esto justifica, sin dejar lugar a dudas, la necesidad de un método integrado de detección.

Los métodos diagnósticos disponibles actualmente se limitan a la detección de anticuerpos que, por lo general, es retrospectiva y de escasa ayuda en el tratamiento de los pacientes en su fase aguda. El cultivo no es considerado un método diagnóstico, tanto por su dificultad tecnológica, que lo excluye de las prácticas habituales en un laboratorio de microbiología de hospital, como por la necesidad de instalaciones P3.

El diagnóstico molecular por amplificación de genoma mediante PCR supone una opción diagnóstica de gran valor. Sin embargo, no siempre se dispone de suficiente cantidad de muestra clínica como para ensayarla frente a una amplia batería de patógenos o no se dispone de la metodología necesaria para realizar diferentes ensayos.

Recientemente se ha publicado un trabajo (Blaskovic D. y col. 2005. Oligo-based detection of tick-borne bacteria. FEMS Microbiology Letters 243: 473 – 478), que describe un método para la detección de productos de PCR ribosomal 16S de bacterias de picadura por garrapata incluyendo *Borrelia spp.*, *Rickettsia spp.*, *Anaplasma spp.*, *Coxiella spp.* y *Francisella spp.* Dicho método está basado en el análisis de ADN ribosomal y emplea cebadores universales, que amplifican el material genético tanto de bacterias diana como de otras que no lo son por lo que su sensibilidad es bastante reducida.

Otros métodos, tal como el descrito por las patentes Americanas US 6.300.072 y 6.518.020, son capaces de detectar e identificar bacterias del género *Bartonella*, usando la misma región de ADN (espacio intergénico 16S – 23S). Sin embargo, el número de especies dentro de este género ha aumentado sensiblemente ya que dichas patentes se registraron y su aproximación, que consiste en una discriminación entre especies según el tamaño del amplicón obtenido en una PCR, no es útil para determinadas especies del mismo género que tienen un tamaño similar al fragmento amplificado. También se conoce en el estado de la técnica un ensayo de hibridación por PCR de detección sensible y específica para la detección e identificación simultánea de *Ehrlichia* y *Borrelia burgdorferi* en sentido amplio (Schouls y col., 1999. Detection and Identification of Ehrlichia, Borrelia burgdorferi Sensu Lato, and Bartonella Species in Dutch Ixodes ricinus Ticks, Journal of Clinical Microbiology, 37: 2215 – 2222).

El método aportado por la presente invención propone también el empleo de la región intergénica 16S – 23S para la detección de especies pertenecientes al género *Bartonella*, se han introducido mejoras con respecto a los métodos

que se han descrito previamente, puesto que es capaz de detectar un grupo mucho más amplio de especies del mismo y otros géneros, usando sondas y cebadores completamente novedosos y con niveles de sensibilidad máximos.

5 Para la detección de *Coxiella burnetii*, la presente invención emplea los mismos cebadores y la misma región de ADN (secuencia de inserción IS1111) que los métodos que se han descrito previamente. Dicha detección se ha mejorado combinándola con otra serie de pruebas completamente novedosas para la identificación de otras especies bacterianas, que pueden ser transmitidas por los mismos vectores, y además aporta una nueva sonda de hibridación para la detección de *Coxiella burnetii*.

10

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Definiciones: PCR múltiple o PCR Multiplex: PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) es un sistema mediante el cual se amplifica o aumenta un número de copias de una secuencia nucleotídica específica usando dos cebadores.

15 El análisis por PCR múltiple o PCR Mutiplex es una variante del análisis por PCR que permite la amplificación simultánea de más de una secuencia diana usando más de un par de cebadores.

La presente invención resuelve el problema de lo tedioso y complicado que resulta detectar un elevado número de bacterias, que causan zoonosis que pueden ser clínica y/o epidemiológicamente indistinguibles, mediante el desarrollo de un método y un Kit de detección para la identificación simultánea de especies bacterianas causantes de zoonosis pertenecientes a los géneros: *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Borrelia*, *Bartonella*, *Coxiella*, *Rickettsia* y *Francisella*.

La solución encontrada por la presente invención consiste en analizar diferentes regiones del ADN bacteriano simultáneamente para determinar en cada caso qué especies se encuentran presentes. En concreto, se analiza el gen 16S ARNr para detectar la presencia de *Anaplasma*, *Ehrlichia* y *Borrelia*; el espacio intergénico 23S – 5S ARNr para detectar la presencia de *Rickettsia*; el gen que codifica para el precursor de la proteína principal de membrana TUL4 para detectar la presencia de *Francisella*; el gen de la transposasa IS1111 para detectar la presencia de *Coxiella* y el espacio intergénico 16S – 23S para detectar la presencia de *Bartonella*.

30

De acuerdo con lo anterior, un primer aspecto de la invención se refiere a un método para la detección de bacterias a partir de una muestra, que comprende los siguientes pasos:

i) Poner en contacto la muestra a analizar con una mezcla de reacción, que contiene cebadores específicos para la realización de PCR Multiplex.

ii) La amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa.

iii) La identificación de formación de los productos del paso anterior, siendo dicha formación indicativa de la presencia o ausencia de bacterias causantes de zoonosis.

Los cebadores específicos que se han mencionado en la etapa (i) son SEQ ID NO: 1, 2, 7, 8, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 36 y 37.

45 En relación con este primer aspecto de la invención, dicha invención proporciona un método para detectar simultáneamente:

- *Anaplasma phagocytophilum*, *A. bovis*, *A. equi*, *A. marginale*, *A. centrale* y *A. ovis*.

50 • *Ehrlichia chaffeensis* y *E. Ewingii*.

- *Bartonella henselae*, *B. quintana*, *B. clarridgeiae*, *B. elizabethae*, *B. grahamii*, *B. vinsonii subespecie berkhofii*, *B. vinsonii subespecie vinsonii*, *B. vnisonii subespecie aurupensis*, *B. bacilliformis*, *B. alsatica*, *B. bovis*, *B. doshiae*, *B. koehlerae*, *B. schoenbuchensis*, *B. taylori* y *B. tribocorum*.

55

- Todas las especies del género *Borrelia*.

• *Coxiella burnetii*.

• Cualquier subespecie de *Francisella tularensis*, incluyendo *F. tularensis* subesp. *tularensis*, *F. tularensis* subesp. *holarctica* y *F. tularensis* subesp. *novicida*, que se detectan conjuntamente, y la variante 3523 de la misma especie y los denominados endosimbiontes de diferentes especies de ixódidos y argásidos, que se detectan diferencialmente.

• El género *Rickettsia*, el grupo de las mismas causantes de las fiebres manchadas y el grupo causante del tifus, las especies *Rickettsia akari*, *R. bellii*, *R. slovacca*, *R. conorii*, *R. aeschlimannii*, *R. rickettsii*, *R. sibirica*, *R. helvetica*, *R. felis*, *R. australis*, *R. prowazekii*, y *R. typhi* (*R. mooserii*).

10 todas ellas capaces de provocar zoonosis, infectar conjuntamente a un individuo y ser difíciles de identificar mediante la observación de los cuadros clínicos, en base a la amplificación y análisis de genes o regiones génicas concretas (Tablas 1 – 6).

15 Se amplifican fragmentos de ADN incluidos o comprendidos en las secuencias cuyos números de acceso se muestran en las tablas 1 – 6 que se muestran a continuación.

Las regiones amplificadas pueden tener un tamaño de entre 99 y 686 nucleótidos y contienen regiones variables empleadas para la identificación. Las regiones variables pueden contener o están incluidas en las SEQ ID NO: 55 a 20 SEQ ID NO: 93 o secuencias complementarias, cuyas posiciones se muestran en las tablas de 1 a 6.

Los productos de amplificación, que permiten identificar los diferentes especies y grupos bacterianos pueden detectarse simultáneamente mediante el empleo de sondas. Dichas sondas pueden tener una longitud de entre 15 y 25 nucleótidos, más específicamente, las sondas son sondas que comprenden las secuencias SEQ ID NO: 3 – 6; 25 SEQ ID NO: 9 – 24; SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 30; SEQ ID NO: 33 – 35; SEQ ID NO: 38 – 51. Las sondas tienen secuencias útiles para detectar una secuencia que comprende o están incluidas en las secuencias SEQ ID NO: 3 – 6; SEQ ID NO: 9 – 24; SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 30; SEQ ID NO: 33 – 35; SEQ ID NO: 38 – 51; o secuencias complementarias (Tablas 1 – 6).

30 Los cebadores pueden ser diseñados mediante alineamiento múltiple usando programas de ordenador, tal como CLUSTAL X, que permite la identificación de regiones muy conservadas que sirven de molde.

Los cebadores hibridan los genes indicados en las Tablas 1 a 6 que se indican a continuación, y especialmente aquellos con secuencias cuyo número de acceso se muestra en las tablas 1 – 6 que se muestran a continuación. 35 Los cebadores tienen secuencias que comprenden o están incluidas en las SEQ ID NO: 1 – 2; SEQ ID NO: 7 – 8; SEQ ID NO: 25 – 26; SEQ ID NO: 28 – 29; SEQ ID NO: 31 – 32; SEQ ID NO: 36 – 37; o secuencias complementarias.

Breve explicación de las tablas:

40 - Columna 1 (organismo): Indica las especies bacterianas o grupo de especies bacterianas detectadas en cada caso.

- Columna 2 (gen): Indica el gen o región genómica usada para detectar las especies bacterianas o grupo de especies de la columna 1.

45 - Columna 3 (cebador): Indica la secuencia del par de cebadores necesarios para realizar la amplificación de la región génica variable o regiones genómicas indicadas en cada tabla (columna 2).

- Columna 4 (sonda): Indica la secuencia de las sondas usadas para detectar las especies bacterianas o grupo de especies a las que se hace referencia en la columna 1 de cada tabla.

50 - Columna 5 (secuencia 5' – 3'): Indica las referencias de secuencias de las regiones variables que se amplifican para detectar cada especie bacteriana o grupo de especies.

55 - Columna 6 (posición 5' – 3'):

- La primera fila: Indica un código de secuencia relativo a un gen o región genómica a la que se hace referencia en la columna 2, además de la posición específica de dicha secuencia en la que el cebador hibrida (columna 3).

- La segunda a la última fila de cada tabla indican un código de secuencia relativo a un gen o una región genómica a la que se hace referencia en la columna 2, además de la posición específica de dicha secuencia a la que la sonda se une (columna 4).

5

Tabla 1: <i>Anaplasma</i> y <i>Ehrlichia</i> : secuencia de cada uno de los cebadores y sondas usados en el método y su posición relativa en el gen 16S ARNs					
ORGANISMO	GEN	CEBADOR	SONDAS	SECUENCIA 5' – 3'	POSICIÓN 5' – 3'
<i>Anaplasma spp</i> <i>Ehrlichia spp</i>	16S	SEQ ID NO: 1 (16S/AE – F)			9 – 30 (U02521)
		SEQ ID NO: 2 (16S/AE – R)			109 – 86 (U02521)
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> <i>A. bovis</i> <i>A. equi</i>	16S	SEQ ID NO: 1 (16S/AE – F) SEQ ID NO: 2 (16S/AE – R)	SEQ ID NO: 3 (S – PHA)	SEQ ID NO: 57	52 – 73 (U02521) 8 – 29 (AF470698) 8 – 29 (AF172167)
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	16S	SEQ ID NO: 1 (16S/AE – F) SEQ ID NO: 2 (16S/AE – R)	SEQ ID NO: 4 (S – CHA)	SEQ ID NO: 58	51 – 71 (AF147752)
<i>E. ewingii</i>	16S	SEQ ID NO: 1 (16S/AE – F) SEQ ID NO: 2 (16S/AE – R)	SEQ ID NO: 5 (S – EW1)	SEQ ID NO: 59	46 – 66 (U96436)
<i>A. marginale</i> <i>A. centrale</i> <i>A. ovis</i>	16S	SEQ ID NO: 1 (16S/AE – F) SEQ ID NO: 2 (16S/AE – R)	SEQ ID NO: NO 6 (S – MCO)	SEQ ID NO: 60	53 – 71 (AJ633048) 72 – 90 (AF414869) 72 – 90 (AF414870)

Tabla 2: *Bartonella*: Secuencia de cada uno de los cebadores y sondas usados en el método y su posición relativa en el espacio intergénico 16S – 23S ARNs

ORGANISMO	GEN	CEBADOR	SONDAS	SECUENCIA 5' – 3'	POSICIÓN 5' – 3'
<i>Bartonella spp.</i>	16S – 23S	SEQ ID NO: 7 (BAR/16 – 23F)			494 – 515 (AF369527)
		SEQ ID NO: 8 (BAR/16 – 23R)			908 – 889 (AF369527)
<i>B. henselae</i>	16S – 23S	SEQ ID NO: 7 (BAR/16 – 23F) SEQ ID NO: 8 (BAR/16 – 23R)	SEQ ID NO: 9 (S – HENS)	SEQ ID NO: 61	793 – 814 (AF369527)
<i>B. quintana</i>	16S – 23S	SEQ ID NO: 7 (BAR/16 – 23F) SEQ ID NO: 8 (BAR/16 – 23R)	SEQ ID NO: 10 (S – QUIN)	SEQ ID NO: 62	622 – 641 (AF368396)
<i>B. clarridgeiae</i>	16S – 23S	SEQ ID NO: 7 (BAR/16 – 23F) SEQ ID NO: 8 (BAR/16 – 23R)	SEQ ID NO: 11 (S – CLAR)	SEQ ID NO: 63	512 – 531 (AF312497)
<i>B. elizabethae</i>	16S – 23S	SEQ ID NO: 7 (BAR/16 – 23F) SEQ ID NO: 8 (BAR/16 – 23R)	SEQ ID NO: 12 (S – ELIZ)	SEQ ID NO: 64	807 – 827 (L35103)
<i>B. grahamii</i>	16S – 23S	SEQ ID NO: 7 (BAR/16 – 23F) SEQ ID NO: 8 (BAR/16 – 23R)	SEQ ID NO: 13 (S – GRAH2)	SEQ ID NO: 65	491 – 514 (AJ269790)
<i>B. vinsonii berkhofii</i>	16S – 23S	SEQ ID NO: 7 (BAR/16 – 23F) SEQ ID NO: 8 (BAR/16 – 23R)	SEQ ID NO: 14 (S – VIN – B)	SEQ ID NO: 66	2242 – 2261 (AF143446)
<i>B. vinsonii arupensis</i>	16S – 23S	SEQ ID NO: 7 (BAR/16 – 23F) SEQ ID NO: 8 (BAR/16 – 23R)	SEQ ID NO: 15 (S – VIN – A1)	SEQ ID NO: 67	686 – 706 (AF442952)
<i>B. vinsonii vinsonii</i>	16S – 23S	SEQ ID NO: 7 (BAR/16 – 23F) SEQ ID NO: 8 (BAR/16 – 23R)	SEQ ID NO: 16 (S – VIN – A2)	SEQ ID NO: 68	821 – 841 (AF312504)
<i>B. bacilliformis</i>	16S – 23S	SEQ ID NO: 7 (BAR/16 – 23F) SEQ ID NO: 8 (BAR/16 – 23R)	SEQ ID NO: 17 (S – BACI)	SEQ ID NO: 69	474 – 493 (AJ422181)
<i>B. alsatica</i>	16S – 23S	SEQ ID NO: 7 (BAR/16 – 23F) SEQ ID NO: 8 (BAR/16 – 23R)	SEQ ID NO: 18 (S – ALS)	SEQ ID NO: 70	589 – 608 (AF312506)
<i>B. bovis</i>	16S – 23S	SEQ ID NO: 7 (BAR/16 – 23F) SEQ ID NO: 8 (BAR/16 – 23R)	SEQ ID NO: 19 (S – B0V2)	SEQ ID NO: 71	455 – 478 (AY116638)
<i>B. doshiae</i>	16S – 23S	SEQ ID NO: 7 (BAR/16 – 23F) SEQ ID NO: 8 (BAR/16 – 23R)	SEQ ID NO: 20 (S – DOSH)	SEQ ID NO: 72	724 – 743 (AJ269786)

<i>B. koehlerae</i>	16S – 23S	SEQ ID NO: 7 (BAR/16 – 23F) SEQ ID NO: 8 (BAR/16 – 23R)	SEQ ID NO: 21 (S – KOE)	SEQ ID NO: 73	778 – 803 (AF312490)
<i>B. schoenbuchensis</i>	16S – 23S	SEQ ID NO: 7 (BAR/16 – 23F) SEQ ID NO: 8 (BAR/16 – 23R)	SEQ ID NO: 22 (S – SCHO2)	SEQ ID NO: 74	446 – 466 (AY116639)
<i>B. taylori</i>	16S – 23S	SEQ ID NO: 7 (BAR/16 – 23F) SEQ ID NO: 8 (BAR/16 – 23R)	SEQ ID NO: 23 (S – TAY)	SEQ ID NO: 75	655 – 673 (AJ269784)
<i>B. tribocorum</i>	16S – 23S	SEQ ID NO: 7 (BAR/16 – 23F) SEQ ID NO: 8 (BAR/16 – 23R)	SEQ ID NO: 24 (S – TRIB)	SEQ ID NO: 76	692 – 713 (AF312505)

Tabla 3: *Borrelia*: Secuencia de cada uno de los cebadores y sondas usados en el método y su posición relativa en gen 16S ARNs

ORGANISMO	GEN	CEBADOR	SONDAS	SECUENCIA 5' – 3'	POSICIÓN 5' – 3'
<i>Borrelia spp.</i>	16S	SEQ ID NO: 25 (BOF – 3)			336 – 356 (AJ224139)
		SEQ ID NO: 26 (BOR)			567 – 547 (AJ224139)
<i>Borrelia</i>	16S	SEQ ID NO: 25 (BOF – 3) SEQ ID NO: 26 (BOR)	SEQ ID NO: 27 (SG – BOR)	SEQ ID NO: 77	364 – 383 (AJ224139)

Tabla 4: *Coxiella*: Secuencia de cada uno de los cebadores y sondas usados en el método y su posición relativa en la secuencia de inserción (transposasa)

ORGANISMO	GEN	CEBADOR	SONDAS	SECUENCIA 5' – 3'	POSICIÓN 5' – 3'
<i>Coxiella burnetii</i>	Transposasa IS1111	SEQ ID NO: 28 (TRANS 1)			200 – 221 (M80806)
		SEQ ID NO: 29 (TRANS 2)			885 – 865 (M80806)
<i>Coxiella burnetii</i>	Transposasa IS1111	SEQ ID NO: 28 (TRANS 1) SEQ ID NO: 29 (TRANS 2)	SEQ ID NO: 30 (S – IS1111)	SEQ ID NO: 78	520 – 539 (M80806)

Tabla 5: *Francisella*: Gen amplificado, secuencia de cada uno de los cebadores y sondas usados en el método y su posición relativa

ORGANISMO	GEN	CEBADOR	SONDAS	SECUENCIA 5' – 3'	POSICIÓN 5' – 3'
<i>Francisella spp.</i>	17 kDa Tul4	SEQ ID NO: 31 (FT594)			593 – 617 (M32059)
		SEQ ID NO: 32 (FT827)			825 – 804 (M32059)
<i>F. tularensis</i>	17 kDa Tul4	SEQ ID NO: 31 (FT594) SEQ ID NO: 32 (FT827)	SEQ ID NO: 33 (S – TUL)	SEQ ID NO: 79	658 – 680 (M32059)
Variante 3523	17 kDa Tul4	SEQ ID NO: 31 (FT594) SEQ ID NO: 32 (FT827)	SEQ ID NO: 34 (S – TUL3523)	SEQ ID NO: 80	169 – 188 (AY243029)
Endosimbiontes	17 kDa Tul4	SEQ ID NO: 31 (FT594) SEQ ID NO: 32 (FT827)	SEQ ID NO: 35 (S – EN – DOS2)	SEQ ID NO: 81	533 – 553 (AY375423)

Tabla 6: *Rickettsia*: Secuencia de cada uno de los cebadores y sondas usados en el método y su posición relativa en los genes 23S, 5S ARNr y en el espacio intergénico 23S – 5S ARNr

ORGANISMO	GEN	CEBADOR	SONDAS	SECUENCIA 5' – 3'	POSICIÓN 5' – 3'
<i>Rickettsia</i> <i>spp.</i>	23S – 5S	SEQ ID NO: 36 (RCK/23 – 5 – F)			1 – 22 (AY125012)
		SEQ ID NO: 37 (RCK/23 – 5 – R)			388 – 367 (AY125012)
Genérico	23S – 5S	SEQ ID NO: 36 (RCK/23 – 5 – F) SEQ ID NO: 37 (RCK/23 – 5 – R)	SEQ ID NO: 38 (SG – RICK)	SEQ ID NO: 82	51 – 71 (AY125012)
Grupo fiebres manchadas	23S – 5S	SEQ ID NO: 36 (RCK/23 – 5 – F) SEQ ID NO: 37 (RCK/23 – 5 – R)	SEQ ID NO: 39 (SG – SFG)	SEQ ID NO: 83	123 – 141 (AY125012)
<i>R. akari</i>	23S – 5S	SEQ ID NO: 36 (RCK/23 – 5 – F) SEQ ID NO: 37 (RCK/23 – 5 – R)	SEQ ID NO: 40 (S – AKA4)	SEQ ID NO: 84	291.105 – 291.126 (AAFE01000001)
<i>R. bellii</i>	23S – 5S	SEQ ID NO: 36 (RCK/23 – 5 – F) SEQ ID NO: 37 (RCK/23 – 5 – R)	SEQ ID NO: 41 (S – BELLII)	SEQ ID NO: 85	2721 – 2743 (U11015)
<i>R. slovacae</i>	23S – 5S	SEQ ID NO: 36 (RCK/23 – 5 – F) SEQ ID NO: 37 (RCK/23 – 5 – R)	SEQ ID NO: 42 (S – SLO)	SEQ ID NO: 86	194 – 211 (AY125009)
<i>R. conorii</i>	23S – 5S	SEQ ID NO: 36 (RCK/23 – 5 – F) SEQ ID NO: 37 (RCK/23 – 5 – R)	SEQ ID NO: 43 (S – CON)	SEQ ID NO: 87	186 – 204 (AY125012)
<i>R. aeschlimannii</i>	23S – 5S	SEQ ID NO: 36 (RCK/23 – 5 – F) SEQ ID NO: 37 (RCK/23 – 5 – R)	SEQ ID NO: 44 (S – AESCH)	SEQ ID NO: 88	183 – 204 (AY125016)
<i>R. rickettsii</i> <i>R. sibirica</i>	23S – 5S	SEQ ID NO: 36 (RCK/23 – 5 – F) SEQ ID NO: 37 (RCK/23 – 5 – R)	SEQ ID NO: 45 (S – RI/SI)	SEQ ID NO: 89	2814 – 2833 (1)11022)
<i>R. helvetica</i>	23S – 5S	SEQ ID NO: 36 (RCK/23 – 5 – F) SEQ ID NO: 37 (RCK/23 – 5 – R)	SEQ ID NO: 46 (S – HELV)	SEQ ID NO: 90	360 – 342 (AY125017)
<i>R. felis</i>	23S – 5S	SEQ ID NO: 36 (RCK/23 – 5 – F) SEQ ID NO: 37 (RCK/23 – 5 – R)	SEQ ID NO: 47 (S – FEL)	SEQ ID NO: 55	186 – 207 (SEQ ID NO: 55)
<i>R. australis</i>	23S – 5S	SEQ ID NO: 36 (RCK/23 – 5 – F) SEQ ID NO: 37 (RCK/23 – 5 – R)	SEQ ID NO: 48 (S – AUS)	SEQ ID NO: 56	230 – 249
Grupo Tifus	23S – 5S	SEQ ID NO: 36 (RCK/23 – 5 – F) SEQ ID NO: 37 (RCK/23 – 5 – R)	SEQ ID NO: 49 (SG – TG)	SEQ ID NO: 91	2804 – 2827 (U11018)

<i>R. prowazekii</i>	23S - 5S	SEQ ID NO: 36 (RCK/23 - 5 - F) SEQ ID NO: 37 (RCK/23 - 5 - R)	SEQ ID NO: 50 (S - ROW)	SEQ ID NO: 92	2824 - 2846 (U11018)
<i>R. typhi</i> (<i>R. mooserii</i>)	23S - 5S	SEQ ID NO: 36 (RCK/23 - 5 - F) SEQ ID NO: 37 (RCK/23 - 5 - R)	SEQ ID NO: 51 (S - TYPHI)	SEQ ID NO: 93	188 - 211 (AY125019)

Dada la gran abundancia de inhibidores de PCR, tales como los ácidos húmico y fúlvico, metales pesados, heparina, etc. que pueden dar lugar a falsos negativos, y aunque existen métodos que reducen la concentración de este tipo de moléculas, es recomendable (véase, J. Hoorfar y col., "Making internal Amplification control mandatory for diagnostic PCR" J. Of Clinical Microbiology, Dec. 2003, págs. 5835) que las pruebas de PCR tengan 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.

10 El método puede describirse en el primer aspecto de dicha invención, incluyendo al menos un CIA, preferentemente constituido por una secuencia de ADN del gen de la **Tetrahidrocannabinol Sintasa** de la especie *Cannabis sativa* y más preferentemente con la secuencia con número de acceso AB183705.

Según una realización más preferida, se amplifica una región de la secuencia AB183705, estando dicha secuencia
15 incluida en la SEQ ID NO: 94 o secuencias complementarias (Tabla 7).

Según otra realización preferida, la amplificación de la región se realiza mediante cebadores específicos cuyas secuencias comprenden o están incluidas en las SEQ ID NO: 52 y SEQ ID NO: 53 o secuencias complementarias.

20 A lo largo del contexto de esta descripción, el término "específico" implica que los cebadores comprenden una secuencia nucleotídica totalmente complementaria a los genes o fragmentos génicos empleados por la presente invención.

Tabla 7: Control interno: Gen amplificado, secuencia de cada uno de los cebadores y sondas usados en el proceso y su posición relativa.

ORGANISMO	GEN	CEBADOR	SONDAS	SECUENCIA 5' - 3'	POSICIÓN 5' - 3'
CIA (<i>Cannabis sativa</i>)	THC Sintasa	SEQ ID 52 (CI - F)			77 - 99 (AB183705)
		SEQ ID 53 (CI - R)			447 - 427 (AB183705)
<i>Cannabis sativa</i>	THC Sintasa	SEQ ID 52 (CI - F) SEQ ID 53 (CI - F)	SEQ ID 54 (S - C12)	SEQ ID 94	281 - 302 (AB183705)

25 La expresión "regiones variables" hace referencia a secuencias de ADN que permiten la identificación de las especies y grupos bacterianos que se mencionan en este documento.

La amplificación del CIA puede detectarse mediante hibridación con sondas. Dichas sondas pueden tener una longitud de 15 a 25 nucleótidos. Dichas sondas tienen una secuencia comprendida o incluida en la SEQ ID NO: 54 o
30 secuencias complementarias.

El método proporcionado por la presente invención permite detectar las bacterias y grupos bacterianos que se han mencionado anteriormente, independientemente de la procedencia de las muestras. Dichas muestras pueden haber sido obtenidas a partir de biopsias, raspados, insectos, fluidos biológicos (sangre, orina, saliva, etc.), campo, etc. La
35 muestra una vez tomada es pretratada para realizar un análisis por PCR Múltiple y una posterior identificación de los amplicones.

Como se ha mencionado anteriormente y según las realizaciones, la invención proporciona un uso de los cebadores de las SEQ ID NO: 1, 2, 7, 8, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 36 y 37, para la amplificación simultánea de ADN procedente de las especies bacterianas causantes de zoonosis, que pertenecen a los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Bartonella*, *Borrelia*, *Coxiella*, *Francisella* y *Rickettsia*. Preferiblemente, el uso anterior comprende además los cebadores de la SEQ ID NO: 52 y la SEQ ID NO: 53 para el control interno de la amplificación.

La invención también proporciona un uso de las sondas de las SEQ ID NO: 3 – 6, 9 – 24, 27, 30, 33 – 35 y 38 – 51, para la detección simultánea de especies bacterianas causantes de zoonosis, que pertenecen a los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Bartonella*, *Borrelia*, *Coxiella*, *Francisella* y *Rickettsia*, donde dichas sondas son capaces de hibridar con los fragmentos correspondientes de las SEQ ID NO: 55 – 93. Preferiblemente, el uso anterior comprende además la sonda con la SEQ ID NO: 54 capaz de hibridar con el fragmento correspondiente de la SEQ ID NO: 94.

La presente invención también proporciona un uso de un kit de diagnóstico, es decir, un kit para la amplificación simultánea de ADN procedente de las especies bacterianas causantes de zoonosis, que pertenecen a los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Bartonella*, *Borrelia*, *Coxiella*, *Francisella* y *Rickettsia*, que contiene:

-Cebadores específicos con las secuencias: SEQ ID NO: 1 – 2, SEQ ID NO: 7 – 8, SEQ ID NO: 25 – 26, SEQ ID NO: 28 – 29, SEQ ID NO: 31 – 32, SEQ ID NO: 36 – 37 y opcionalmente SEQ ID NO: 52 y 53 como CIA.

La presente invención también proporciona un uso de un kit para la detección simultánea de las especies bacterianas causantes de zoonosis, que pertenecen a los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Bartonella*, *Borrelia*, *Coxiella*, *Francisella* y *Rickettsia*, que contiene:

- Sondas con las secuencias: SEQ ID NO: 3 – 6, SEQ ID NO: 9 – 24, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 33 – 35, SEQ ID NO: 38 – 51 y opcionalmente SEQ ID NO: 54 (S – C12) como CIA, donde dichas sondas son capaces de hibridar con los fragmentos correspondientes de ADN de las SEQ ID NO: 55 – 93, y si se usa la SEQ ID NO: 54, capaz de hibridar con el fragmento correspondiente de la SEQ ID NO: 94.

Del mismo modo, los kits pueden incluir todos aquellos reactivos necesarios para llevar a cabo cualquiera de los métodos descritos. Esto incluye, sin ningún tipo de limitación, el uso de tampones, polimerasas, cofactores para optimizar su actividad, agentes para prevenir la contaminación, etc. Por otro lado los kits pueden incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización.

Las ventajas del presente método y de los kits para aplicarlo son: velocidad (pueden detectarse 39 especies y grupos bacterianos en menos de 8 horas), especificidad (los iniciadores empleados son específicos de cada especie o grupo de bacterias) y un alto nivel de sensibilidad.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Membrana de hibridación que muestra la validación de cebadores, sondas y regiones variables para la detección de *Anaplasma* y *Ehrlichia* (A), *Borrelia* (B), *Francisella* (C), *Bartonella* (D) y *Coxiella* (E), por medio de sondas específicas (Tablas 1 – 5). La sonda S – C12 se refiere a la sonda de CIA (Tabla 7).

Figura 2: A) Membrana de hibridación que muestra la validación de cebadores, sondas y regiones variables para la detección de *Rickettsia*; **B)** Membrana de hibridación que muestra un ejemplo de detección simultánea de especies pertenecientes a los 7 géneros. En este ejemplo: *A. phagocytophilum*, *A. marginale*, *E. chaffeensis*, *E. ewingi*, *B. henselae*, *B. burgdorferi*, *F. tularensis tularensis*, *R. conorii* y *R. prowazekii*, ensayados a 10^3 , 10^2 y 10 equivalentes de genoma/copias. En ambos casos (A y B) se usa la sonda S – C12, que se refiere a la sonda de CIA (Tabla 7).

Figura 3: Membrana de hibridación que muestra los resultados de un estudio de especificidad realizado en el grupo de sondas indicado (Tablas 1 – 7) en diferentes especies bacterianas, artrópodos y mamíferos. Los resultados revelan que las sondas son están unidas a las muestras de los organismos ensayados en ningún caso. La sonda S – C12 se refiere a la sonda de CIA (Tabla 7).

EJEMPLO DE REALIZACION

Alineamientos, diseños de cebadores y sondas

Por comparación y alineamientos múltiples de secuencias obtenidas a partir de bases de datos públicas como Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), se identificaron regiones conservadas, a partir de las cuales se diseñaron cebadores específicos (Tablas 1 – 6) para su empleo en PCR múltiple. La compatibilidad entre los cebadores, así como su concentración óptima, se comprobó empíricamente de la misma manera que las sales de magnesio y la albúmina bovina sérica.

A partir de los alineamientos de las secuencias seleccionadas se identificaron regiones variables, que permitieron el diseño de sondas para la diferenciación entre las diferentes especies bacterianas y grupos génicos (Tablas 1 – 6), mediante RLB (Transferencia inversa en línea, *Reverse Line Blotting*) (Kaufhold A, Podbielski A, Baumgarten G, Blokpoel M, Top J, Schouls L. Rapid Typing of group-a streptococci by the use of DNA amplification and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *FEMS Microbiology Letters* 119: 19 – 25 (1994)).

Se realizó un primer análisis de especificidad de cada una de las sondas comparando su secuencia a partir de bases de datos públicas (Genbank) usando programas informáticos, tales como BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). La especificidad se demostró posteriormente realizando pruebas sobre una diversidad de muestras de ADN de diferentes especies bacterianas y eucarióticas (Figura 3).

Medios de cultivo y aislamiento de ADN

Las especies y grupos génicos seleccionados para su identificación se obtuvieron de colecciones privadas, de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y/o el banco de muestras disponible en el Centro Nacional de Microbiología (CNM). Todas las especies analizadas se muestran en la Tabla 8.

El aislamiento del material genético se realizó usando métodos bien conocidos en la técnica y disponibles en el mercado (DNA Mini Kit, Qiagen, N° de Referencia: 51304).

ORGANISMO	ADN NATIVO (origen)	ADN SINTÉTICO*
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	X (1)	
<i>A. marginale</i>	X (1)	
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>		X
<i>E. ewingii</i>		X
<i>Borrelia burgdorferi</i>	X (2)	
<i>B. garinii</i>	X (2)	
<i>B. afzelii</i>	X (2)	
<i>B. lusitaniae</i>	X (2)	
<i>B. japonica</i>	X (2)	
<i>B. hermsii</i>	X (2)	
<i>B. parkeri</i>	X (2)	
<i>Francisella tularensis tularensis</i>	X (3)	
<i>F. tularensis subespecie holarctica</i>	X (3)	
<i>F. tularensis subesp. Novicida</i>	X (3)	
<i>Francisella variante 3523</i>		X
<i>Francisella Endosimbiontes</i>		X
<i>Bartonella alsatica</i>	X (4)	
<i>B. bacilliformis</i>	X (4)	
<i>B. bovis</i>	X (4)	
<i>B. clarridgeiae</i>	X (4)	
<i>B. doshiae</i>	X (4)	
<i>B. elizabethae</i>	X (4)	
<i>B. grahamii</i>	X (4)	
<i>B. henselae</i>	X (4)	
<i>B. koehlerae</i>	X (4)	
<i>B. quintana</i>	X (4)	
<i>B. schoenbuchensis</i>	X (4)	
<i>B. taylorii</i>	X (4)	
<i>B. tribocorum</i>	X (4)	

<i>B. vinsonii subesp. Arupensis</i>	X (4)	
<i>B. vinsonii subesp. Berkhoffii</i>	X (4)	
<i>B. vinsonii subesp. Vinsonii</i>	X (4)	
<i>Coxiella burnetii</i>	X (5)	
<i>Rickettsia aeschlimannii</i>		X
<i>R. akari</i>	X (5)	
<i>R. australis</i>	X (5)	
<i>R. bellii</i>	X (5)	
<i>R. conori</i>	X (5)	
<i>R. felis</i>	X (5)	
<i>R. Helvetica</i>	X (5)	
<i>R. rickettsii</i>	X (5)	
<i>R. sibirica</i>		X
<i>R. slovacica</i>	X (5)	
<i>R. prowazekii</i>		X
<i>R. typhi</i>	X (5)	
<i>Brucella melitensis</i>	X (6)	
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	X (7)	
<i>C. psittaci</i>	X (7)	
<i>Escherichia coli</i>	X (6)	
<i>Legionella pneumophila</i>	X (8)	
<i>Leptospira interrogans</i>	X (4)	
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	X (7)	
<i>Ochrobactrum antropi</i>	X (4)	
<i>Orientia tsutsugamushi</i>	X (5)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	X (4)	
<i>Salmonella enterica Typhi</i>	X (4)	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	X (6)	
<i>Treponema pallidum</i>	X (7)	
<i>Ixodes ricinus</i>	X (9)	
<i>Dermacentor marginatus</i>	X (9)	
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	X (9)	
<i>Apodemus sylvaticus</i>	X (9)	
ADN humano	X (10)	
Control Interno		X

Origen del ADN natural:

1: Muestra positiva.

5

2: Medio de cultivo axénico, según se describe en:

Benach JL, Coleman JL, and Golightly MG. 1988. A murine monoclonal antibody binds an antigenic determinant in outer surface protein A, an immunodominant basic protein of the Lyme disease spirochete. J. Immunol. 140: 265 – 72.

10

3: Medio de cultivo axénico, según se describe en:

Anda P, Segura del Pozo J, Diaz Garcia JM, Escudero R, Garcia Peña FJ, Lopez Velasco MC, Sellek RE, Jimenez Chillaron MR, Sanchez Serrano LP, Martinez Navarro JF. 2001. Waterborne outbreak of tularemia associated with crayfish fishing. Emerg. Infect. Dis. 7 (Suppl): 575 – 82.

15

4: Composición de los medios de cultivo axénicos específicos para cada especie disponible en:

20 <http://cip.pasteur.fr/index.html.en>

5: Propagación en cultivos celulares mediante la técnica de "shell vial", según se describe en:

Marrero M, Raoult D. 1989. Centrifugation-shell vial technique for rapid detection of Mediterranean spotted fever rickettsia in blood culture. Am. J. Trop. Med. Hyg. 40: 197 – 9.

5 6: Cultivo de agar “Mueller Hinton” suplementado con el 5 % de sangre de carnero.

7: ADN extraído de portaobjetos para inmunofluorescencia indirecta de origen comercial.

8: Medio de cultivo axénico según se describe en:

10

Edelstein PH. 1981. Improved semiselective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental samples. J. Clin. Microbiol. 14: 298 – 303.

9: ADN extraído de ejemplares libres de patógenos.

15

10: ADN extraído de muestras clínicas de pacientes con enfermedades no relacionadas.

ADN sintético

20 El ADN sintético se preparó según las secuencias correspondientes que se han enumerado en las tablas 1 a 7 (columna 6), mediante elongación consecutiva de la ADN por PCR usando cebadores de aproximadamente 70 nucleótidos, solapados entre sí en, aproximadamente, 20 nucleótidos.

Amplificación, hibridación y validación

25

Esta etapa incluyó el análisis experimental de las regiones variables detectadas tempranamente usando PCR para su validación. El ADN aislado se amplificó por PCR (Saiki y col., (1985) Science 230, 1350; 1354), aplicando la siguiente tabla de ciclos de temperatura y la composición de la mezcla de reacción, junto con los cebadores específicos que se han usado previamente para tal propósito.

30

Ciclos de Temperatura		
Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
94	9'	1
94	15"	
60	1'	40
65	4'	
65	7'	1

Composición de la mezcla de reacción para un volumen final de 50 µl:

35 - H₂O: En función del volumen final de ADN

- Buffer Taq Gold LD: 9 µl

- Cl₂Mg [3 mM]: 6 µl

40 - dNTPs [200 mM]: 1 µl x 4

- BSA [0,8 ug/ul]: 4 µl

45 - 14 Cebadores específicos (SEQ ID NO: 1 – 2, SEQ ID NO: 7 – 8, SEQ ID NO: 25 – 26, SEQ ID NO: 28 – 29, SEQ ID NO: 31 – 32, SEQ ID NO: 36 – 37, SEQ ID NO: 52 – 53) [50 pm/µl]: 0,5 µl de cada uno (7 µl)

- Taq Gold LD: 0,5 µl [2,5 unidades]

- ADN problema: máximo de 800 ng

Los amplicones se secuenciaron para su validación, comprobando que la secuencia amplificada coincidiera con las 5 secuencias variables inferidas de estudios bioinformáticos. Posteriormente, los amplicones se hibridaron con las sondas específicas siguiendo el protocolo de RBL descrito por Sjoerd G. T. Rijpkema y col., Journal of Clinical Microbiology, Dec. 1995, pág. 3091 – 3095, aunque aplicando las siguientes modificaciones (Figura 1 y 2A):

- Sustrato: Super Signal West Dura (Pierce, Ref.: 34075)

10

- Sondas: Se usaron a una concentración de entre 0,2 y 3,2 picomoles / microlitro

- Incubación: a 55 °C

15 - Lavados: a 52 °C

Los resultados de la hibridación se muestran en las figuras 1 y 2A, en las que se puede observar que cada una de las sondas se une específicamente a los amplicones de cada una de las especies bacterianas detectadas usando el método de la invención.

20

Preparación de muestras y PCR múltiple.

Una de las ventajas de los sistemas de identificación basados en análisis por PCR y RBL consiste en que no es necesario partir de cultivos bacterianos puros. De este modo, y una vez realizada la validación de los cebadores y 25 las sondas con muestras de ADN de las diferentes especies y subespecies enumeradas en las tablas 1 – 6, preparadas siguiendo los métodos enumerados en la tabla 8 y analizándolas por duplicado, se realizó un análisis basado en PCR Múltiple de una mezcla de control de ADN preparada en condiciones de laboratorio, seguido de la prueba RLB, empleando los cebadores y sondas específicas diseñados, los ciclos de temperatura y la composición de la mezcla de reacción, indicados anteriormente, cuyos resultados se muestran en la Figura 2B. En dicha figura se 30 puede observar que fue posible realizar la detección simultánea de especies bacterianas presentes en la muestra.

Detección de inhibidores de PCR

Para la detección de inhibidores de PCR, se creó un control interno de amplificación (CIA) que se amplificó junto los 35 ADN diana, utilizando cebadores específicos (Tabla 7), que fueron diseñados a partir de regiones conservadas de la secuencia AB183705 (Tabla 7) perteneciente al gen de la THC sintasa de *Cannabis sativa*. Concretamente el amplicón que actúa como CIA se corresponde a una secuencia de 371 pares de bases para la cual también se diseñó una sonda (Tabla 7) para su detección durante el análisis RBL.

40 Especificidad del método

La alta especificidad de este método se basa en la especificidad de los cebadores y sus sondas, los cuales se ensayaron con otra serie de organismos (Tabla 9), siguiendo el método descrito por la presente invención, comprobándose que en ningún caso se detectaba la formación de amplicones detectables mediante hibridación 45 (Figura 3).

Tabla 9: Especificidad: especies no relacionadas de bacterias, artrópodos y mamíferos usadas en el desarrollo del método		
	ESPECIE	RESULTADO DEL RLB
1	<i>Bruceella melitensis</i>	Negativo
2	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Negativo
3	<i>C. psittaci</i>	Negativo
4	<i>Escherichia coli</i>	Negativo
5	<i>Legionella pneumophila</i>	Negativo
6	<i>Leptospira interrogans</i>	Negativo
7	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Negativo
8	<i>Ochrobactrum antropi</i>	Negativo
9	<i>Orientia tsutsugamushi</i>	Negativo

10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativo
11	<i>Salmonella enterica</i> Typhi	Negativo
12	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Negativo
13	<i>Treponema pallidum</i>	Negativo
	Artrópodos	Negativo
14	<i>Ixodes ricinus</i>	Negativo
15	<i>Dermacentor marginatus</i>	Negativo
16	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Negativo
	Mamíferos	Negativo
17	<i>Apodemus sylvaticus</i>	Negativo
18	Seres humanos	Negativo

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Instituto de Salud Carlos III
 5 <120> Método y kit de detección de especies bacterianas mediante análisis de ADN
 <130> 1580
 10 <160> 94
 <170> PatentIn versión 3.1
 <210> 1
 15 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Cebador 16S/AE – F
 <400> 1
 20
 cagaacgaac gctggcggca ag
 22
 <210> 2
 <211> 24
 25 <212> ADN
 <213> Cebador 16S/AE – R
 <400> 2
 gcattactca cccgtctgcc actc
 24
 30
 <210> 3
 <211> 22
 <212> ADN
 35 <213> Sonda 16S. S – PHA.
 <400> 3
 ggmttattct ttatagcttg ct
 22
 40

ES 2 391 833 T3

<210>4
<211> 21
<212> ADN
<213> Sonda 16S. S – CHA.
5
<400> 4

attgcttata accttttggg t
21

10 <210> 5
<211> 21
<212> ADN
<213> Sonda 16S. S – EWI.
15 <400> 5

gaacaattcc taaatagtct c
21

<210> 6
20 <211> 19
<212> ADN
<213> Sonda 16S. S – MCO.
<400> 6
25

cagcttgctg cgtgtatgg
19

<210> 7
<211> 22
30 <212> ADN
<213> Cebador BAR/16S – 23 – F
<400> 7

ttgataagcg tgaggtcgga gg
22

35
<210> 8
<211> 20
<212> ADN
40 <213> Cebador BAR/16 – 23 – R
<400> 8

caaagcaggt gctctcccag
20

45
<210> 9
<211> 22

ES 2 391 833 T3

<212> ADN
<213> Sonda 16S – 23S. S – HEN.

<400> 9

5

atcggttcaa tcatatcgct tt
22

<210> 10
<211> 20
10 <212> ADN
<213> Sonda 16S – 23S. S – QUIN.

<400> 10

cgcttatcca ttggtttaa
20

15

<210> 11
<211> 20
<212> ADN
20 <213> Sonda 16S – 23S. S – CLAR.

<400> 11

acgatgctaa aagttgctat
20

25

<210> 12
<211> 21
<212> ADN
<213> Sonda 16S – 23S. S – ELIZ.

30

<400> 12

taagttccct tcaagaggat a
21

35 <210> 13
<211> 24
<212> ADN
<213> Sonda 16S – 23S. S – GRAH2.

40 <400> 13

attcaagttg atgaatttgg ttat
24

<210> 14
45 <211> 20
<212> ADN
<213> Sonda 16S – 23S. S – VIN – B

ES 2 391 833 T3

<400> 14

tttcggacac tattgataaa
20

5

<210> 15
<211> 21
<212> ADN
<213> Sonda 16S – 23S. S – VIN – A1

10

<400> 15

acttgttgga attgcttaac c
21

15 <210> 16

<211> 21
<212> ADN
<213> Sonda 16S – 23S. S – VIN – A2

20 <400> 16

atgaaaatat tgagagattt g
21

<210> 17

25 <211> 20

<212> ADN
<213> Sonda 16S – 23S. S – BACI

<400> 17

30

cctatgattg atttctaggc
20

<210> 18

<211> 20

35 <212> ADN

<213> Sonda 16S – 23S. S – ALS.

<400> 18

gctggtgaaa cttgcttata
20

40

<210> 19

<211> 24

<212> ADN

45 <213> Sonda 16S – 23S. S – BOV2

<400> 19

ES 2 391 833 T3

cgttttgata gtcttttgtg ttgc
24

<210> 20
5 <211> 20
<212> ADN
<213> Sonda 16S – 23S. S – DOSH.

<400> 20
10

tttgaacctt ctctctttat
20

<210> 21
<211> 27
15 <212> ADN
<213> Sonda 16S – 23S. S – KOE

<400> 21

ttaaattata tcactttggg tcatatcg
27

20

<210> 22
<211> 21
<212> ADN
25 <213> Sonda 16S – 23S. S – SCH02.

<400> 22

gctgataagt ttgctgataa g
21

30

<210> 23
<211> 19
<212> ADN
<213> Sonda 16S – 23S. S – TAY.

35

<400> 23

tatccatttc gcttaggca
19

40 <210> 24
<211> 22
<212> ADN
<213> Sonda 16S – 23S. S – TRIB.

45 <400> 24

ttctattaag tttgtcaaag gg
22

<210> 25
<211> 21
5 <212> ADN
<213> Cebador 16S/BO – F – 3

<400> 25

taagaatctt ccgcaatggg c
21

10

<210> 26
<211> 21
<212> ADN
15 <213> Cebador 16S/BO – R

<400> 26

atccgcctac tcacccttta c
21

20

<210> 27
<211> 20
<212> ADN
<213> Sonda 16S. SG – BOR3
25

<400> 27

tgacggagcg acaactgcgtg
20

30 <210> 28
<211> 22
<212> ADN
<213> Cebador transposa IS1111 directo. TRANS 1

35 <400> 28

tatgtatcca ccgtagccag tc
22

<210> 29
40 <211> 21
<212> ADN
<213> Cebador transposasa IS1111 indirecto. TRANS 2

<400> 29
45

ES 2 391 833 T3

cccaacaaca cctccttatt c
21

<210> 30
<211> 20
5 <212> ADN
<213> Sonda Transposasa IS1111. S – IS1111
<400> 30

gcaagaatac ggactcacga
20

10
<210> 31
<211> 23
<212> ADN
<213> Cebador 17 KDa – Tul4 directo. FT594.
15
<400> 31

gyaggttag ckagctgttc tac
23

20 <210> 32
<211> 23
<212> ADN
<213> Cebador 17 KDa – Tul4 indirecto. FT827.
25 <400> 32

ggagcytgcc attgtaatct tac
23

<210> 33
30 <211> 23
<212> ADN
<213> Sonda 17 kDa – Tul4. S – TUL

<400> 33
35

agatactgct gctgctcaga cag
23

<210> 34
<211> 20
40 <212> ADN
<213> Sonda 17 kDa – Tul4. S – TUL3523.

<400> 34

gcatcagata agggcaccgc
20

45

ES 2 391 833 T3

<210> 35
<211> 21
<212> ADN

5 <213> Sonda 17 kDa – Tul4. S – ENDOS2.

<400> 35

cagctacacc aacrgccgta g
21

10

<210> 36
<211> 22
<212> ADN

<213> Cebador 23S – 5S. RIK/23 – 5 – F

15

<400> 36

gataggtcrg rtgtggaagc ac
22

20 <210> 37

<211> 22
<212> ADN

<213> Cebador 23S – 5S. RIK/23 – 5 – R

25 <400> 37

tccggayggg atcgtgtgtt tc
22

<210> 38

30 <211> 21
<212> ADN

<213> Sonda 23S – 5S. SG – RICK.

<400> 38

35

tagctcgatt grtttacttt g
21

<210> 39

<211> 19
<212> ADN

<213> Sonda 23S – 5S. SG – SFG

<400> 39

actcacaarg ttatcaggt
19

45

ES 2 391 833 T3

<210> 40
<211> 22
<212> ADN
<213> Sonda 23S – 5S. S – AKA4.
5
<400> 40

gatcatgcag caatacatta gc
22

10 <210> 41
<211> 23
<212> ADN
<213> Sonda 23S – 5S. S – BELLII
15 <400> 41

gtgtttattc tataatatgt cag
23

<210> 42
20 <211> 18
<212> ADN
<213> Sonda 23S – 5S. S – SLO
25
<400> 42

gtagccctg ccacgata
18

<210> 43
<211> 19
30 <212> ADN
<213> Sonda 23S – 5S. S – CON
35
<400> 43

gttatatact gtagccctg
19

<210> 44
<211> 22
<212> ADN
40 <213> Sonda 23S – 5S. S – AESCH.
45
<400> 44

atattatact gtatgtagcc cc
22

45
<210> 45
<211> 20
<212> ADN

ES 2 391 833 T3

<213> Sonda 23S – 5S. S – RI/SI.

<400> 45

gttataactgt agtcctgcaa
20

5

<210> 46

<211> 19

<212> ADN

10 <213> Sonda 23S – 5S. S – HELV.

<400> 46

catggcttga tccacggta
19

15

<210> 47

<211> 22

<212> ADN

<213> Sonda 23S – 5S. S – FEL.

20

<400> 47

taatggtata ccgtaggtccc gc
22

25 <210> 48

<211> 20

<212> ADN

<213> Sonda 23S – 5S. S – AUS.

30 <400> 48

gacaagttta gttatgcaat
20

<210> 49

35 <211> 24

<212> ADN

<213> Sonda 23S – 5S. SG – TG.

<400> 49

40

gttattctat cgttttatgt yacg
24

<210> 50

<211> 23

45 <212> ADN

<213> Sonda 23S – 5S. S – PROW.

<400> 50

tacgatttga tagtaaagtt ttg
23

<210> 51
5 <211> 24
<212> ADN
<213> Sonda 23S – 5S. S – TYPHI.

<400> 51
10

atgtcacgat ttgaccgtaa gatc
24

<210> 52
<211> 23
15 <212> ADN
<213> Cebador THC sintasa. CI – F

<400> 52

atgatgctga gggatatgtcc tac
23

20

<210> 53
<211> 21
<212> ADN
25 <213> Cebador THC sintasa. CI – R

<400> 53

gtttttctcct ccaccaccac g
21

30

<210> 54
<211> 22
<212> ADN
<213> Sonda THC sintasa. S – CI2.
35
<400> 54

gtggacactt tagtggagga gg
22

40 <210> 55
<211> 377
<212> ADN
<213> R. felis

45 <220>
<221> lugar_unión_Sonda
<222> (186) .. (207)
<223>

<400> 55

gataggtcgg gtgtggaagc acagtaatgt gtgtagctaa ctgatactaa
tagctcgatt 60

gatttacttt gctgtgagat tacatatgca tatagtgtta attctataaa
aatgtagtat 120

caactcacia agttatcagg ttaaattagc tttaccaatg aataaaaatg
ttgttgacaa 180

gctaataatg ttataccgtg gtcccgccac ggtatctaga aaaattttta
atatttagat 240

tottgcttcc gcaggaatga taaatttagt catgcaacaa cattaacagc
aaactataat 300

acaaatctat ctttttaaaa gtttgtattg ctagcttggg ggttatagca
tgagtgaaac 360

acacgatccc atcccga
377

5

- <210> 56
- <211> 343
- <212> ADN
- <213> R. australis

10

- <220>
- <221> lugar_unión_Sonda
- <222> (230) .. (249)
- <223>

15

<400> 56

ccgatactaa tagctcgatt gatttacttt gctgtgggat tacatatgca
tatgggtgta 60

attctataaa catgtaagtg tcaactcaca aagttatcag gttaaattag
ctttatcaat 120

gaataaagat gttgttgcac agctaataat gtcctctcgt ggcttgacca
cagtatctag 180

cagtatctag aaaaatttat aatatttggga ttcttgettc cgtaggagtg
acaagtttag 240

ttatgcaata acattaacag cgaactataa tacaaatcta tttttttaa
agtttgtatt 300

gctagcttgg tggttatagc atgagtgaaa cacacgatcc cga
343

<210> 57

<211> 22

5 <212> ADN

<213> Anaplasma phagocytophilum, A. bovis y E. equi

<400> 57

agcaagctat aaagaataak cc
22

10

<210> 58

<211> 21

<212> ADN

15 <213> Ehrlichia chaffeensis

<400> 58

aacccaaaagg ttataagcaa t
21

20

<210> 59

<211> 21

<212> ADN

<213> Erlichia ewingii

25

<400> 59

gagactattt aggaattggt c
21

ES 2 391 833 T3

<210> 60
<211> 19
<212> ADN
<213> Anaplasma marginale, A. centrale y A. ovis
5
<400> 60

ccatacacgc agcaagctg
19

10 <210> 61
<211> 22
<212> ADN
<213> Bartolella henselae
15 <400> 61

aaagcgatat gattgaaccg at
22

<210> 62
20 <211> 20
<212> ADN
<213> Bartonella quintana
25 <400> 62

ttaaaccaaa tggataagcg
20

<210> 63
<211> 20
30 <212> ADN
<213> B. clarridgeiae
40 <400> 63

atagcaactt ttagcatcgt
20

35
<210> 64
<211> 21
<212> ADN
40 <213> B. elizabethae
45 <400> 64

tatcctcttg aaggggaactt a
21

45
<210> 65

ES 2 391 833 T3

<211> 24
<212> ADN
<213> B. grahamii

5 <400> 65

ataaccaa at tc at ca actt ga at
24

<210> 66
10 <211> 20
<212> ADN
<213> B. vinsonii berkhofii

<400> 66
15

tttatcaata gtgtccgaaa
20

<210> 67
<211> 21
20 <212> ADN
<213> B. vinsonii arupensis

<400> 67

ggttaagcaa ttccaacaag t
21

25
<210> 68
<211> 21
<212> ADN
30 <213> B. vinsonii vinsonii

<400> 68

caa at ct ct c a at at t t t ca t
21

35
<210> 69
<211> 20
<212> ADN
<213> B. bacilliformis

40
<400> 69

gcctagaa at ca at ca tagg
20

45 <210> 70
<211> 20
<212> ADN
<213> B. alsatica

ES 2 391 833 T3

<400> 70

tataagcaag ttcaccagc
20

5 <210> 71
<211> 24
<212> ADN
<213> B. bovis

10 <400> 71

gcaacacaaa agactatcaa aacg
24

<210> 72
15 <211> 20
<212> ADN
<213> B. doshiae

<400> 72
20

ataaagagag aaggttcaaa
20

<210> 73
<211> 27
25 <212> ADN
<213> B. koehlerae

<400> 73

cgatgaccc aaagtgatat aatttaa
27

30

<210> 74
<211> 21
<212> ADN
35 <213> B. schoenbuchensis

<400> 74

cttatcagca aacttatcag c
21

40

<210> 75
<211> 19
<212> ADN
<213> B. taylori

45

<400> 75

tgcctaagcg aaatggata
19

5 <210> 76
<211> 22
<212> ADN
<213> B. tribocorum

10 <400> 76

ccctttgaca aacttaatag aa
22

<210> 77
15 <211> 20
<212> ADN
<213> Borrelia burgdorferi *sensu lato*

<400> 77
20

cacgcagtgt cgctccgtca
20

<210> 78
<211> 20
25 <212> ADN
<213> Coxiella burnetii

<400> 78

30
tcgtgagtcc gtattcttgc
20

<210> 79
<211> 23
<212> ADN
35 <213> Fracisiella tularensis

<400> 79

ctgtctgagc agcagcagta tct
23

40
<210> 80
<211> 20
<212> ADN
<213> Fraciliella turalensis variante 3523

45
<400> 80

gcggtgccct tatctgatgc
20

- <210> 81
- <211> 21
- 5 <212> ADN
- <213> Francisella endosimbionte

- <400> 81

ctacggcygt tgggtgtagct g
21
10

- <210> 82
- <211> 21
- <212> ADN
- 15 <213> Rickettsia conorii variante 1450

- <400> 82

caaagtaaay caatcgagct a
21
20

- <210> 83
- <211> 19
- <212> ADN
- <213> Rickettsia conorii cepa 1450
- 25

- <400> 83

acctgataac yttgtgagt
19

- 30 <210> 84
- <211> 22
- <212> ADN
- <213> Rickettsia akari

- 35 <400> 84

gctaattgat tgctgcatga tc
22

- <210> 85
- 40 <211> 23
- <212> ADN
- <213> Rickettsia bellii

- <400> 85
- 45

ctgacatatt atagaataaa cac
23

ES 2 391 833 T3

<210> 86
<211> 18
<212> ADN
5 <213> Rickettsia slovaca

<400> 86

tatcgtggca ggggctac
18

10
<210> 87
<211> 19
<212> ADN
<213> Rickettsia conorii
15
<400> 87

cagggctaca gtatataac
19

20 <210> 88
<211> 22
<212> ADN
<213> R. aeschlimanii
25 <400> 88

ggggctacat acagtataat at
22

<210> 89
30 <211> 20
<212> ADN
<213> Rickettsia rickettsii

<400> 89
35

ttgcaggact acagtataac
20

<210> 90
<211> 19
40 <212> ADN
<213> Rickettsia helvetica

<400> 90

taccgtggat caagccatg
19

45
<210> 91

<211> 24
<212> ADN
<213> Rickettsia prowazekii

5 <400> 91

cgtracataa aacgatagaa taac
24

<210> 92
10 <211> 23
<212> ADN
<213> Rickettsia prowazekii

<400> 92
15

caaaacttta ctatcaaattc gta
23

<210> 93
<211> 24
20 <212> ADN
<213> Rickettsia typhi

<400> 93

gatcttacgg tcaaattcgtg acat
24

25

<210> 94
<211> 22
<212> ADN
30 <213> Cannabis sativa

<400> 94

cctcctccac taaagtgtcc ac
22

35

REIVINDICACIONES

1. Método de análisis para la detección simultánea de especies bacterianas, que pertenecen a los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Bartonella*, *Borrelia*, *Coxiella*, *Francisella* y *Rickettsia*, que comprende:
- 5 a. Poner en contacto la muestra a analizar con una mezcla de reacción, que contiene cebadores específicos de SEQ ID NO: 1, 2, 7, 8, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 36 y 37, para realizar PCR Múltiple.
- b. Amplificar mediante reacción en cadena de la polimerasa.
- 10 c. Identificar la formación de productos del paso anterior, siendo dicha formación indicativa de la presencia o ausencia de bacterias causantes de zoonosis.
2. Método, según la reivindicación 1, en el que las especies bacterianas detectadas son:
- 15 a. *Anaplasma phagocytophilum*, *A. bovis*, *A. equi*, *A. marginale*, *A. centrale* y *A. ovis*.
- b. *Ehrlichia chaffeensis* y *E. ewingii*.
- 20 c. *Bartonella henselae*, *B. quintana*, *B. clarridgeiae*, *B. elizabethae*, *B. grahamii*, *B. vinsonii* subespecie *berkhofii*, *B. vinsonii* subespecie *vinsonii*, *B. vinsonii* subespecie *aurupensis*, *B. bacilliformis*, *B. alsatica*, *B. bovis*, *B. doshiae*, *B. koehlerae*, *B. schoenbuchensis*, *B. taylori* y *B. tribocorum*.
- d. Todas las especies del género *Borrelia*.
- 25 e. *Coxiella burnetii*.
- f. Cualquier subespecie de *Francisella tularensis*, incluyendo *F. tularensis* subesp. *tularensis*, *F. tularensis* subesp. *holarctica* y *F. tularensis* subesp. *novicida*, que se detectan conjuntamente, y la variante 3523 de la misma especie y
- 30 los denominados endosimbiontes de diferentes especies de ixódidos y argásidos, que se detectan diferencialmente.
- g. El género *Rickettsia*, el grupo de las mismas causantes de las fiebres manchadas y el grupo causante del tifus, las especies *Rickettsia akari*, *R. bellii*, *R. slovaca*, *R. conorii*, *R. aeschlimannii*, *R. rickettsii*, *R. sibirica*, *R. helvetica*, *R. felis*, *R. australis*, *R. prowazekii*, y *R. typhi* (*R. mooserii*).
- 35 3. El método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la detección simultánea de los productos de amplificación se realiza usando sondas que comprenden las secuencias SEQ ID NO: 3 – 6, 9 – 24, 27, 30, 33 – 35 y 38 – 51.
- 40 4. Método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende al menos un control interno de amplificación.
5. Método, según la reivindicación 4, en el que el control interno de amplificación consiste en:
- 45 a. La amplificación de la SEQ ID NO: 94 con cebadores específicos.
- b. La detección de la formación del producto de amplificación resultante de la etapa anterior.
6. Método, según la reivindicación 5, en el que los cebadores específicos tienen las secuencias SEQ ID NO: 52 y SEQ ID NO: 53.
- 50 7. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 4 – 6, en el que la detección del producto de amplificación se realiza usando la sonda con la SEQ ID NO: 54.
- 55 8. Uso *in vitro* de los cebadores de las SEQ ID NO: 1, 2, 7, 8, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 36 y 37, para la amplificación simultánea de ADN de especies bacterianas causantes de zoonosis, que pertenecen a los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Bartonella*, *Borrelia*, *Coxiella*, *Francisella* y *Rickettsia*.

9. El uso de los cebadores, según la reivindicación 8, que comprende adicionalmente los cebadores de la SEQ ID NO: 52 y la SEQ ID NO: 53 para el control interno de amplificación.
10. Uso *in vitro* de las sondas de las SEQ ID NO: 3 – 6, 9 – 24, 27, 30, 33 – 35 y 38 – 51, para la
5 detección simultánea de las especies bacterianas causantes de zoonosis, que pertenecen a los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Bartonella*, *Borrelia*, *Coxiella*, *Francisella* y *Rickettsia*, en el que dichas sondas son capaces de hibridar con los fragmentos correspondientes de las SEQ ID NO: 55 – 93.
11. Uso de las sondas, según la reivindicación 10, que comprende adicionalmente la sonda con la SEQ ID
10 NO: 54 capaz de hibridar con el fragmento correspondiente de la SEQ ID NO: 94.
12. Uso *in vitro* de un kit, en el que dicho kit comprende los cebadores de las SEQ ID NO: 1, 2, 7, 8, 25,
26, 28, 29, 31, 32, 36 y 37, para la amplificación simultánea de ADN de las especies bacterianas causantes de
zoonosis, que pertenecen a los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Bartonella*, *Borrelia*, *Coxiella*, *Francisella* y *Rickettsia*.
15
13. El uso de un kit, según la reivindicación 12, que comprende adicionalmente los cebadores de las SEQ
ID NO: 52 y SEQ ID NO: 53 para el control interno de amplificación.
14. Uso *in vitro* de un kit, en el que dicho kit comprende las sondas de las SEQ ID NO: 3 – 6, 9 – 24, 27,
20 30, 33 – 35 y 38 – 51, para la detección simultánea de las especies bacterianas causantes de zoonosis, que pertenecen a los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Bartonella*, *Borrelia*, *Coxiella*, *Francisella* y *Rickettsia*, en el que dichas sondas son capaces de hibridar con los fragmentos correspondientes de ADN de las SEQ ID NO: 55 – 93.
15. Uso del kit, según la reivindicación 14, que comprende adicionalmente la sonda con la SEQ ID NO: 54
25 capaz de hibridar con el fragmento correspondiente de la SEQ ID NO: 94.

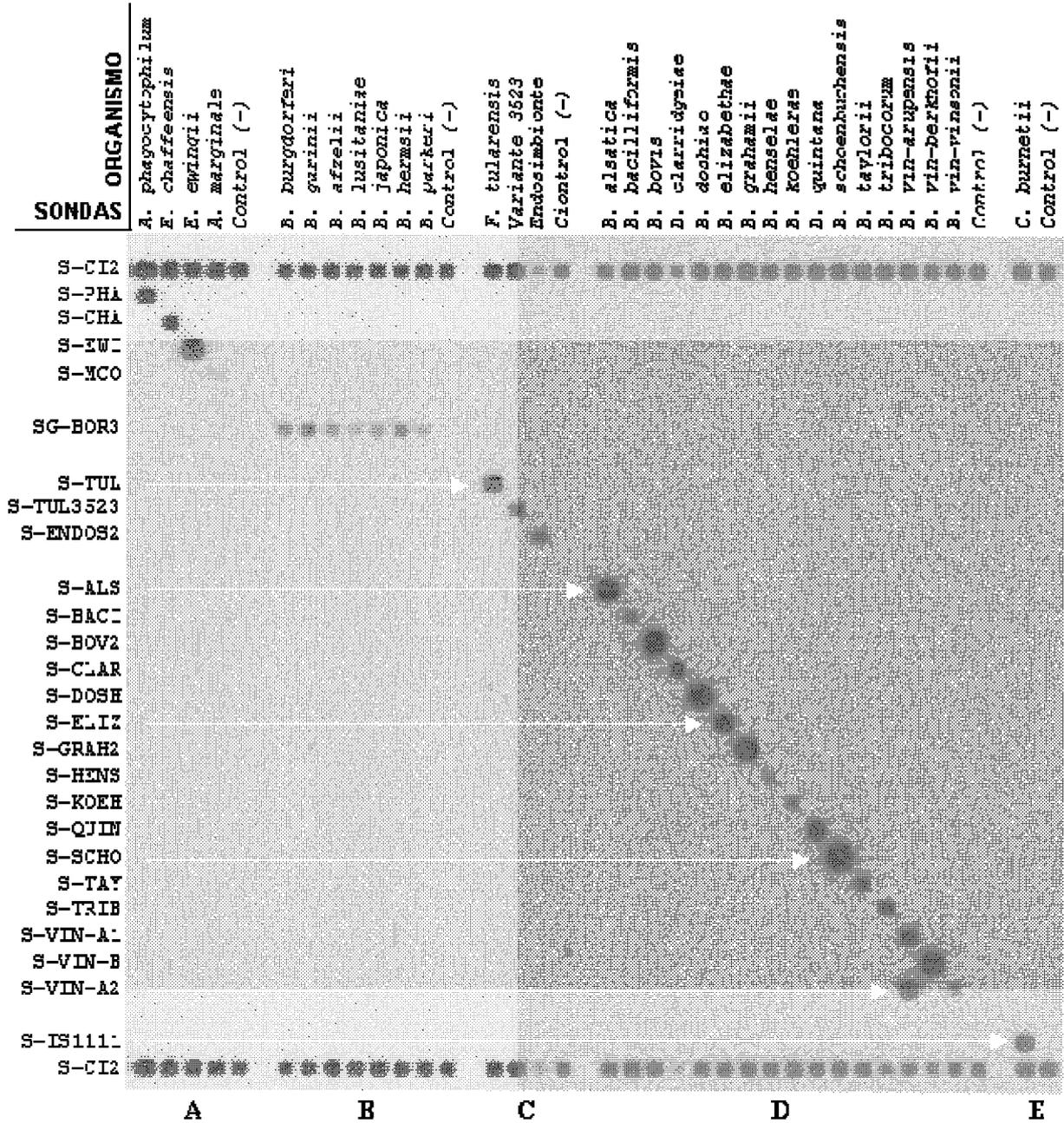


FIGURA 1

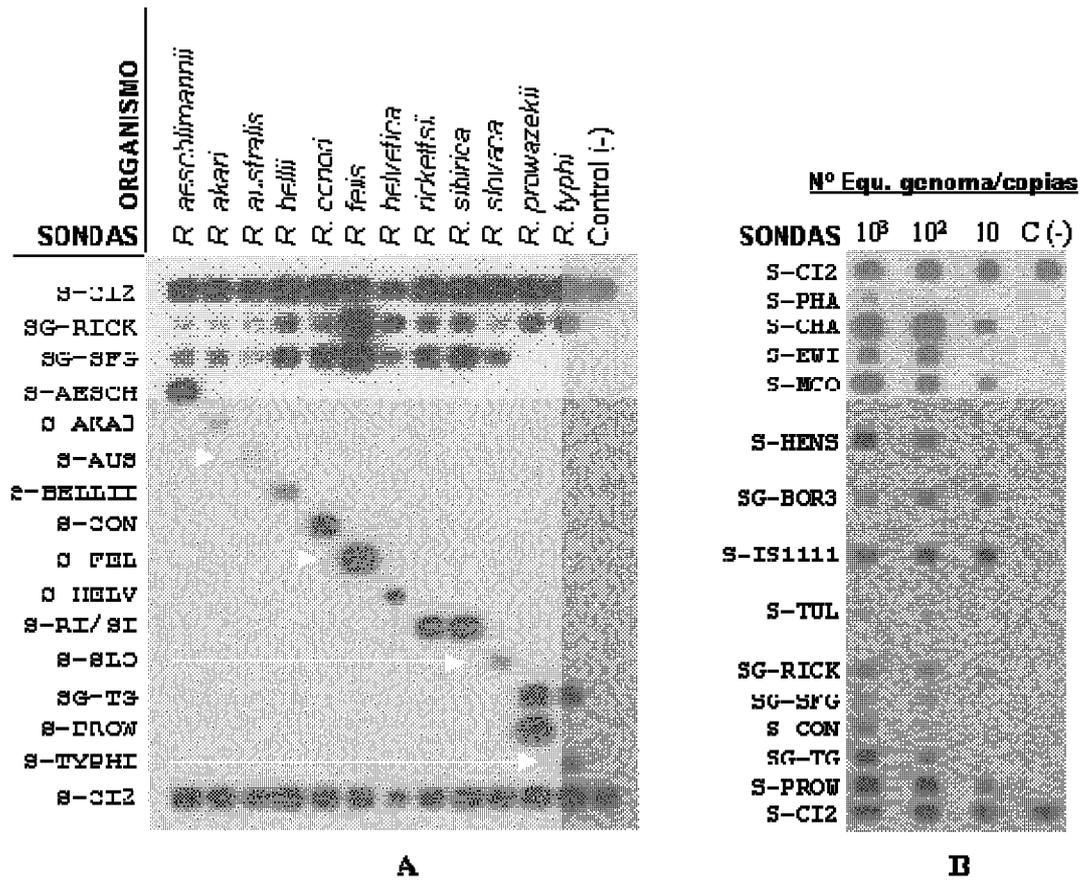


FIGURA 2

