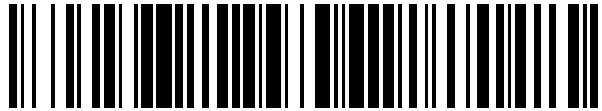


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 798**

21 Número de solicitud: 201131130

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**04.07.2011**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**15.02.2013**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA (100.0%)  
CAMPUS PL. SAN FRANCISCO (EDIF.  
INTERFACULTADAES) C/ PEDRO CERBUNA, 12  
50009 ZARAGOZA ES**

72 Inventor/es:

**FILLAT CASTEJÓN, Maria Francisca;  
PELEATO SÁNCHEZ, Maria Luisa;  
CLAVEL PARRILLA, Antonio;  
GOÑI CEPERO, Pilar;  
GREGORIO SÁNCHEZ, Irene y  
CALVO BEGUERIA, Laura**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **Método de detección de cianobacterias y bacterias patógenas presentes en agua o en amebas de vida libre.**

57 Resumen:

Método de detección de cianobacterias y bacterias patógenas presentes en agua o en amebas de vida libre.

La presente invención se refiere a un método de detección de cianobacterias productoras de microcistina y de al menos una bacteria patógena en una muestra de agua o en amebas de vida libre presentes en el agua caracterizado por la detección y/o cuantificación de los genes *mcyD*, *mip*, *hsp65* o *R16S*. Además también se refiere al método en el que también se puede detectar el gen *ompU*. La presente invención también se refiere a un kit que contiene al menos los cebadores útiles para la detección de dichos genes y su uso para el análisis de la calidad del agua.

ES 2 395 798 A1

## DESCRIPCIÓN

### Método de detección de cianobacterias y bacterias patógenas presentes en agua o en amebas de vida libre.

La presente invención se refiere a un método de detección simultánea de  
5 cianobacterias productoras de microcistina y de bacterias patógenas en una  
muestra de agua o en amebas de vida libre presentes en el agua caracterizado  
por la detección y/o cuantificación del gen *mcy* y al menos uno de los genes  
*mip*, *hsp65* o 16S. Además también se refiere a un kit que comprende los  
10 cebadores útiles para la detección de dichos genes. Por tanto, la invención se  
podría encuadrar en el campo de la medicina y de la salud pública.

### ESTADO DE LA TÉCNICA

La creciente eutrofización y deterioro de los acuíferos origina un incremento de  
15 la biomasa presente tanto en cuerpos de agua como en biofilms, conteniendo  
una gran cantidad de microorganismos potencialmente tóxicos para la salud  
humana. La prevención sanitaria implica su detección temprana y destrucción y  
es una tarea realizada de forma habitual en los laboratorios de salud pública.  
Muchas veces, los organismos patógenos pueden quedar enmascarados y  
20 protegidos de los sistemas tradicionales de detección y desinfección por  
alojarse en el interior de amebas de vida libre, lo que entraña unos riesgos  
importantes para la salud.

Se ha demostrado que las amebas de vida libre (AVL) pueden albergar  
25 distintos géneros de bacterias entre las que también se han detectado  
cianobacterias. Las amebas son protozoos ubicuos que habitan en ambientes  
húmedos, frecuentemente en agua con temperaturas en torno a los 25 grados.  
Algunas AVL representan un riesgo sanitario por sí mismas, como es el caso  
de *Acanthamoeba* spp. o *Hartmanella* spp., y también pueden actuar como  
30 vectores de bacterias patógenas y cianobacterias potencialmente tóxicas,  
jugando un importante papel en la resistencia de estos microorganismos frente

a condiciones adversas y permitiéndoles sobrevivir en su interior, lo que representa un riesgo para la salud.

Entre las cianobacterias asociadas a AVL se han detectado cianobacterias productoras de microcistina, como es el caso de *Microcystis* spp responsable de la toxicidad. (Yuichiro N et al. The Japanese Society of Limnology 2004. (5):71–76; y Liu X et al. , Shi Miao, Liao Yonghong, Gao Yin, Zhang Zhongkai, Wen Donghui, Wu Weizhong Grazing Upon Cyanobacteria: Food Selection, Ingestion and Digestion Progress Microbial ecology. 2006. (51), 315–325). Las microcistinas son heptapéptidos cíclicos de síntesis no ribosomal que están codificadas por el operón *mcy*. El gen *mcyD* codifica una policétido sintasa modular que presenta una alta homología en todas las cepas tóxicas de diferentes géneros de cianobacterias. Su expresión es indispensable para la síntesis de microcistina y está implicado en la incorporación del aminoácido Adda (3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetil-deca-4,6-ácido dienólico).

Otro de los patógenos mas problemáticos y que suele causar víctimas mortales es la bacteria *Legionella pneumophila*. Es muy conocido el fenómeno de su persistencia tras los procesos de desinfección en torres de refrigeración, probablemente debido a que se enmascara en el interior de AVL. La presencia de *Legionella* spp. en el interior de las amebas se ha descrito no solamente en los circuitos de refrigeración, sino también en biofilms formados en diferentes habitats naturales y en sistemas acuáticos antropogénicos. Junto con *Legionella pneumophila* también existen numerosas referencias de la presencia del *Mycobacterium* spp. (en este caso suelen coexistir varias especies de *Mycobacterium* en una misma muestra)) y *Pseudomonas* spp. En países tropicales, cabe destacar la presencia de brotes de *Vibrio cholerae*, detectados tanto en estado libre como en el interior de amebas como *Acanthamoeba* spp. o *Naegleria* spp. entre otras. La presencia de estas bacterias patógenas en el interior de las AVL hace difícil su detección y supone un importante riesgo para la salud si no son detectadas correctamente y eliminadas del agua.

- En la actualidad los métodos de detección utilizados más frecuentemente se basan en el cultivo previo de estos microorganismos que, en ocasiones es extremadamente lento ( Roch N and Maurin M. J Antimicrob Chemother 2005. (55):866–871). También existen protocolos de amplificación mediante RT-PCR
- 5 a tiempo real de estos patógenos de forma individual, aunque son protocolos que en la mayoría de los caso se aplican en centros de investigación, ya que se requiere instrumental con cierta sofisticación que no existe en prácticamente ningún laboratorio de análisis rutinario de aguas o de salud pública.
- 10 El análisis de calidad de aguas, en especial la de uso humano, requiere de herramientas rápidas y de sencillo manejo que permitan la detección de patógenos libres en el agua o bien alojados en el interior de organismos acuáticos, como es el caso de las AVL. En consecuencia, existe la necesidad de una herramienta que rápida, precisa y sensible para la detección de
- 15 cianobacterias potencialmente tóxicas y de bacterias patógenas, con el fin de mejorar la calidad del agua.

### **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

- 20 La presente invención se refiere a un método de detección simultánea de cianobacterias productoras de microcistina y al menos una de las bacterias patógenas *Microcystis* spp., *Legionella* spp., *Mycobacterium* spp., o *Pseudomonas* spp. tanto en agua como en organismos acuáticos, preferentemente en amebas de vida libre. Este método se basa en el
- 25 aislamiento de ácidos nucleicos de una muestra de agua o de organismos acuáticos y en la realización de una PCR multiplex acoplada a una PCR anidada. El método de la invención permite detectar simultáneamente el gen *mcy* y al menos un gen de entre los genes *mip*, *hsp65* o *R16S*. Además, el método de la invención también puede aislar y/o detectar en una muestra de
- 30 agua o de los organismos acuáticos otra bacteria patógena, *Vibrio* spp., mediante la detección y/o cuantificación del gen *ompU*.

El método de la invención permite alcanzar una gran sensibilidad y a la vez es capaz de minimizar los falsos positivos, así como evitar posibles inhibidores de la polimerasa que conducirían a la lectura de falsos negativos, como es el caso de inhibidores que suelen estar presentes en las muestras antropogénicas  
5 (Radstrom et al Mol Biotechnol 2004. 26:133-146). El método de la invención se ha valorado en 107 muestras de campo demostrando su utilidad, tanto en muestras de agua procedente de embalses, piscinas, fuentes ornamentales, aguas emergentes de depuradoras y también de cultivos de amebas de vida libre aislados de muestras de agua de embalses, piscinas, aguas emergentes  
10 de depuradoras y fuentes ornamentales.

El método de la invención es más rápido que los métodos que dependen del crecimiento previo de los patógenos, además, tiene una gran sensibilidad. El método de la invención permite conocer con un único ensayo las asociaciones  
15 entre estos microorganismos más frecuentes y detectar posibles riesgos para la salud. Por otra parte, este método es fácil de ejecutar con un instrumental económico y disponible en muchos laboratorios.

Por lo aquí descrito, un primer aspecto de la invención se refiere a un método  
20 de detección y/o cuantificación de al menos una cianobacteria productora de microcistina y de al menos una bacteria patógena caracterizado por que comprende los siguientes pasos:

- a. aislamiento de ácidos nucleicos presentes en una muestra de agua o de organismos acuáticos; y
- 25 b. detección y/o cuantificación del gen *mcyD* y al menos uno de los genes que se seleccionan de la lista que comprende: *mip*, *hsp65* o *16S* mediante PCR multiplex seguida de PCR anidada.

En adelante nos referiremos a éste como el método primero de la invención.

30 Una cianobacteria (también llamada “alga verdeazulada”) es una bacteria que realiza fotosíntesis oxigénica. Las cianobacterias a las que se refiere la invención son aquellas productoras de microcistina, en adelante las

“cianobacterias de la invención”. El término “microcistina” se refiere a una toxina que consiste en un heptapéptido cíclico de síntesis no ribosomal producido por algunas especies de cianobacterias. Entre las cianobacterias productoras de microcistinas se encuentran las cianobacterias del género  
5 *Microcystis*, *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Hapalosiphon* y *Planktothrix*.

El término “bacteria patógena” se refiere a aquella bacteria que no realiza fotosíntesis oxigénica y que puede provocar una enfermedad en un sujeto, preferentemente humano. Las bacterias patógenas a las que se refiere la  
10 invención son las bacterias del género *Legionella spp.*, *Mycobacterium spp.*, *Pseudomonas spp.* o *Vibrio spp.* En adelante nos referiremos a ellas como las “bacterias patógenas de la invención”.

El término “ácido nucleico” (o polinucleótido, o secuencia nucleotídica) se  
15 refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos como desoxirribonucleótidos. Preferentemente el ácido nucleico aislado es ácido desoxirribonucleico (ADN). El aislamiento se puede realizar por cualquier método o técnica conocidos por el experto en la materia. El ácido nucleico también puede referirse a ácido ribonucleico (ARN), por ejemplo RNA  
20 mensajero.

El término “muestra de agua” se refiere a cualquier muestra de agua, como por ejemplo, agua procedente de embalses, pantanos, tanques de almacenamiento de agua, depuradora, ríos, lagos, lagunas, charcas, estanques, mar, piscinas,  
25 agua de riego, o agua ornamental, por ejemplo en fuentes. Preferiblemente es una muestra de agua destinada a consumo humano, por ejemplo agua de bebida. El método de la invención es por lo tanto útil para controlar la calidad de una muestra de agua, es decir, útil para conocer si una muestra de agua contiene cianobacterias productoras de microcistina y de bacterias patógenas.

30

En la presente invención se entiende por “organismo acuático” como a aquel organismo unicelular o pluricelular que habite en agua y sea capaz de albergar

en su interior o adherido en su superficie a cianobacterias productoras de microcistina y al menos una de las bacterias patógenas de la invención. En la presente invención, los organismos acuáticos se refieren a amebas de vida libre, peces, dinoflagelados, nematelmintos, como la sanguijuela (*Hirudo*); anélidos; 5 moluscos, como las almejas y los caracoles; crustáceos y rotíferos, anfibios. Preferentemente el organismo acuático es una ameba de vida libre.

El término “ameba” se refiere a un protozoo que no depende de un único hábitat para vivir, entre ellos, ambientes húmedos o en agua (por ejemplo, 10 piscinas, lagunas, estanques) se desplazan por pseudópodos y se reproducen por fisión binaria. En la presente invención se entiende por “ameba de vida libre” (AVL) aquella ameba que es capaz de albergar en su interior a una cianobacteria productora de microcistina y al menos una de las bacterias patógenas de la invención. Entre las AVL se pueden encontrar amebas de los 15 géneros *Acanthamoeba*, *Naegleria* o *Hartmanella*, entre otros.

En el método primero de la invención se detecta y/o cuantifica la presencia o expresión de los genes *mcyD* y al menos uno de los genes siguientes: *mip*, *hsp65* y *16S* mediante PCR multiplex seguida de (o acoplada a) una PCR 20 anidada. La detección y/o cuantificación se puede realizar del ADN de dichos genes o de la expresión del gen, por ejemplo de su RNAm o del ADN complementario (ADNc). Preferentemente la detección y/o cuantificación se realiza del ADN.

25 La cuantificación puede ser realizada comparando con cantidades conocidas de la misma secuencia amplificada, es decir, con una muestra control. El término “muestras control” tal como se entiende en la presente invención se refiere, por ejemplo, pero sin limitarse, a una muestra de concentración conocida del gen que se quiere cuantificar. Este tipo de muestra control, es un 30 muestra control positiva.

La determinación de si una muestra presenta cianobacterias productoras de microcistina y al menos una de las bacterias de la invención puede determinarse mediante la detección de un valor límite a partir del cuál se considera la muestra como positiva.

5

El término "PCR multiplex" se refiere a la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que amplifica más de una secuencia en una misma reacción mediante el uso de más de dos pares de cebadores.

10 El término "PCR anidada" (o "nested") se refiere a la PCR que se realiza posteriormente a otra PCR en la que se ha producido un producto de amplificación, donde en esta nueva amplificación se utiliza como DNA molde el producto amplificado en la primera amplificación y se realiza utilizando cebadores que se ubican dentro de la primera secuencia amplificada.

15

En la presente invención primeramente se realiza una PCR multiplex y posteriormente los productos de amplificación obtenidos de la misma se utilizan como ADN molde para realizar una PCR anidada. Posteriormente, los productos de amplificación pueden ser visualizados utilizando las técnicas conocidas por cualquier experto en la materia, como por ejemplo pero sin limitarnos, a visualización mediante el uso de agentes intercalantes, por ejemplo, bromuro de etidio o SYBRgreen. La visualización de los resultados puede ser llevada a cabo mediante un transiluminador o lámpara de ultravioleta.

25

El término "cebador" se refiere a una secuencia de nucleótidos de tamaño variable que es complementaria a un fragmento de la secuencia de un gen (el ADN molde) y que se utiliza en una reacción de PCR para amplificar una secuencia nucleotídica.

30

El gen *mcyD* se refiere al gen que codifica para la policétido sintasa implicada de la síntesis de microcistina. El gen *mcyD* está presente en cianobacterias



productoras de microcistina. Este gen presenta una alta homología en todas las cepas tóxicas de diferentes géneros de cianobacterias (Tabla 1). Preferentemente el gen *mcyD* se refiere a una cianobacteria del género *Microcystis* spp., más preferentemente se refiere a *Microcystis aeruginosa* (que codifica para la proteína de numero de acceso AAF00959.1). En la presente invención se ha demostrado la utilidad del método de la invención ya que se ha detectado y/o cuantificado el gen *mcyD* de las cepas de *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 (AF183408.1), NIES-843 (AP009552.1), G-01 (JF799865.1) y V-08 (JF799864.1).

10

Tabla 1. Comparación de los genes *mcy* en distintas cepas de cianobacterias comparado con la secuencia *mcyD* de *M. aeruginosa* NIES-843

Cianobacteria	Número de acceso	Porcentaje de homología
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806	AF183408.1	96%
<i>Anabaena</i> sp. 90	AJ536156.1	80%
<i>Planktothrix rubescens</i> NIVA-CYA 98	AM990462.1	80%
<i>Nodularia spumigena</i> NSOR10	EU151885.1	75%

El gen *mip* (o potenciador de la infectividad en macrófagos, “macrophage infectivity potentiator”) se refiere al gen de *Legionella* spp. que codifica una proteína potenciadora de la infectividad en macrófagos (“macrophage infectivity potentiator”) (Noch N. et al. 2005 Journal of Antimicrobial Chemotherapy 55: 866-871). Preferentemente el gen se refiere a *Legionella pneumophila*. En la presente invención se ha demostrado la utilidad del método de la invención ya que se ha detectado y/o cuantificaco el gen *mcyD* de las cepas de *Legionella pneumophila* siguientes: *Legionella pneumophila subespecie pneumophila Philadelphia 1* (NC\_002942.5), Lens (NC\_006369), Paris (NC\_006368.1), Corby (NC\_009494.2), *Legionella longbeachae* NSW150 (NC\_013861.1), *Legionella pneumophila* serogrupo I salvaje (ambiental).

El gen *hsp65* codifica para la proteína de choque térmico 65 (“heat shock protein” 65) de *Mycobacterium* spp, una chaperona de respuesta a choque térmico tipo GroEL. El método de la invención puede utilizarse para detectar y/o

5 cuantificar el gen *hsp65* de *Mycobacterium* spp, por ejemplo pero sin limitarse a H37Rv (NP\_214954.1), *M. bolletti* IAL029 (HQ404297.1), *M. sp.* BF5b (EU478699.1), *M. sp.* BF4b (EU478698.1), *M. Kansasii* FHMk-3 (JF836805.1), *M. setense* HNTM46 (HQ229608.1), *M. bovis* ATCC 19210 GroEL (JF491332.1) y *M. porcinum* ATCC 33776 GroEI (JF491326.1).

10

El gen *16S* (también denominado r16S, 16S ribosómico o 16S rRNA) es un componente de la subunidad 30S del ribosoma de procariotas. El gen *16S* en la presente invención se refiere al 16S de *Pseudomonas* spp (Locatelli L, et al. 2002 System Appl Microbiol 25:220-227) (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC

15 27853).

20

Una realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere a un método donde además se detecta y/o cuantifica el gen *ompU* de forma simultánea o no simultánea mediante PCR. En adelante, nos referiremos a este

20 método como el método segundo de la invención.

25

El gen *ompU* se refiere al gen que codifica para la proteína exterior de la membrana U (“outer membrane protein U”) de *Vibrio* spp. Preferentemente se refiere a *Vibrio cholerae* (Rivera et al. 2001 Appl Environ Microbiol 67:2421-2429). El método de la invención ha demostrado ser útil para determinar y/o

25 cuantificar este gen en las cepas de *Vibrio cholerae* MJ-1236 y CECT 512.

30

El término “de forma simultánea” se refiere a que la detección y/o cuantificación del gen *ompU* se realiza en la misma reacción de PCR que las de los genes del

30 método primero de la invención, es decir, se realiza una PCR multiplex seguida de una PCR anidada. En el caso de que se realice de forma “no simultánea”, la reacción de PCR para amplificar el gen *ompU* se realiza en una reacción

distinta de PCR que las de los genes del método primero de la invención, es decir, una PCR que no sería multiplex ("denominada PCR primera para el gen *ompU*") puesto que no se amplifica más que la secuencia del gen *ompU* y seguida de una PCR anidada.

5

Por todo lo aquí descrito, una realización preferida del método primero y segundo de la invención se refiere a un método donde el organismo acuático es una ameba de vida libre.

10 Otra realización preferida del método primero y segundo de la invención se refiere a un método donde la cianobacteria es del género *Microcystis spp.* Otra realización aún más preferida se refiere al método donde la cianobacteria es *Microcystis aeruginosa*.

15 Otra realización preferida del método primero y segundo de la invención se refiere a un método donde la bacteria patógena se selecciona de entre *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium spp.* o *Pseudomonas spp.*

20 Otra realización preferida del método primero y segundo de la invención se refiere a un método donde el gen *mcyD* pertenece a una cianobacteria productora de microcistina, el gen *mip* pertenece a *Legionella pneumophila* el gen *hsp65* pertenece a *Mycobacterium spp.*, el gen *R16S* pertenece a *Pseudomonas spp.*

25 Otra realización preferida del método segundo de la invención se refiere a un método donde el gen *ompU* pertenece a *Vibrio cholerae*.

Otra realización preferida del método primero y segundo de la invención se refiere a un método el ácido nucleico es ácido desoxirribonucleico.

30

En la presente invención se proporcionan ejemplos de cebadores que amplifican los genes descritos en la invención. Para la PCR multiplex los

cebadores que amplifican en gen *mcyD* de una cianobacteria productora de microcistina son SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 que se refieren a cebador sentido y antisentido respectivamente. En el caso del gen *mip* de *Legionella* spp. son SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 que se refieren a cebador sentido y antisentido respectivamente. En el caso del gen *hsp65* de *Mycobacterium* spp. son SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 que se refieren a cebador sentido y antisentido respectivamente. En el caso del gen *R16S* de *Pseudomonas* spp. son SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 que se refieren a cebador sentido y antisentido respectivamente. Para la PCR anidada, los cebadores que amplifican en gen *mcyD* de una cianobacteria productora de microcistina son SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 que se refieren a cebador sentido y antisentido respectivamente. En el caso del gen *mip* de *Legionella* spp. son SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14 que se refieren a cebador sentido y antisentido respectivamente. En el caso del gen *hsp65* de *Mycobacterium* spp. son SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16 que se refieren a cebador sentido y antisentido respectivamente. En el caso del gen *R16S* de *Pseudomonas* spp. son SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18 que se refieren a cebador sentido y antisentido respectivamente.

Por estos motivos, una realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere a un método donde la PCR multiplex se realiza utilizando los cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 y al menos una pareja de cebadores que se seleccionan de la lista que comprende: SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8.

25

Otra realización preferida se refiere a un método donde la PCR anidada se realiza utilizando los cebadores SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 y al menos una pareja de cebadores que se seleccionan de la lista que comprende: SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18.

30

En el caso del segundo método de la invención, para la PCR los cebadores que

amplifican en gen *ompU* de *Vibrio* spp. son SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10, y la pareja SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20 que se refieren a cebador sentido y antisentido respectivamente en ambas parejas. Por lo que otra realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere a un método donde  
5 además se utiliza la pareja de cebadores SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10, en la PCR multiplex. Otra realización preferida se refiere a un método donde además se utiliza la pareja de cebadores SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20 en la PCR anidada.

10 Los cebadores descritos en la presente invención (SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 20) pueden ser susceptibles de variaciones de hasta el 5% de su secuencia nucleotídica.

El método de la invención podría combinarse con otros métodos descritos para  
15 la detección de las cianobacterias productoras de microcistina y de las bacterias patógenas, por ejemplo, RT-PCR o cultivo de los microorganismos. Por este motivo, otra realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere a un método que además comprende la detección y/o cuantificación de al menos una cianobacteria productora de microcistina y de al menos una  
20 bacteria patógena mediante el cultivo de la cianobacteria o de la bacteria patógena.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un kit que comprende una pareja de cebadores que amplifican el gen *mcyD* y al menos una pareja de  
25 cebadores que amplifican un gen que se selecciona de la lista que comprende: *mip*, *hsp65* o *16S*. Nos referiremos a éste como al "kit primero de la invención".

Una realización preferida del segundo aspecto de la invención se refiere al kit donde los cebadores que amplifican el gen *mcyD* son SEQ ID NO: 1 y SEQ ID  
30 NO: 2 y/o los cebadores SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12.

Otra realización aún más preferida se refiere al kit que comprende al menos

una pareja de cebadores que se seleccionan de la lista que comprende: SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18.

5

Otra realización preferida del segundo aspecto de la invención se refiere al kit que además comprende los cebadores que amplifican el gen *ompU*. En adelante nos referiremos a éste como el “kit segundo de la invención”.

10 Una realización aún más preferida del kit segundo de la invención se refiere al kit donde los cebadores que amplifican el gen *ompU* son SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 y/o SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20. Como se ha explicado anteriormente, la reacción utilizando estos cebadores puede ser realizada simultáneamente o no con la reacción de detección y/o cuantificación de los  
15 genes descritos en el método primero de la invención.

Los kits primero y segundo de la invención pueden además pueden incluir, sin ningún tipo de limitación, el uso de tampones, enzimas, enzimas polimerasas, cofactores para obtener una actividad óptima de éstas, agentes para prevenir la  
20 contaminación, etc. Por otro lado los kits pueden incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Los kits pueden contener además otras moléculas, genes, proteínas o sondas de interés, que sirvan como controles positivos y negativos. Preferiblemente, los kits comprenden además las instrucciones para llevar a cabo los métodos de la  
25 invención.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere al uso del kit del segundo aspecto de la invención para la detección de al menos una cianobacteria productora de microcistina y de al menos una bacteria patógenas en una  
30 muestra de agua o en organismos acuáticos, donde la bacteria patógena es *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium spp.*, o *Pseudomonas spp* o *Vibrio cholerae*. En una realización preferida, la cianobacteria es del género

*Microcystis spp.* , más preferentemente es *Microcystis aeruginosa*.

En lo referente a organismos acuáticos, se puede utilizar en amebas de vida liber o en peces. Una realización preferida del tercer aspecto de la invención se  
5 refiere al uso del kit donde el organismo acuático es una ameba de vida libre.

Otra realización preferida del tercer aspecto de la invención se refiere al uso del kit donde la muestra de agua es para consumo humano. El término "consumo humano" se puede referir, por ejemplo y sin limitarse, a consumo de agua  
10 mediante su ingestión.

Otra realización preferida del tercer aspecto de la invención se refiere al uso del kit donde la muestra de agua es agua de recreo, de riego u ornamental. También puede referirse a agua utilizada en ganadería.  
15

Si no se especifica lo contrario, en la presente invención todos los términos científicos y científicos tienen el mismo sentido que el utilizado por cualquier experto en la materia. Materiales y métodos similares o equivalentes a los descritos en la presente invención podrían utilizarse en los aspectos descritos  
20 en la invención.

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

30 **DESCRIPCION DE LAS FIGURAS**

**FIG. 1. Detección de *Microcystis aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae* en cultivo *in vitro* mediante PCR multiplex seguida de una PCR anidada.** Se muestran las bandas de DNA amplificado de los genes *mcyD* (194 bp), *mip* (112 bp), *hsp65* (297 bp), *R16S* (476 bp) y *ompU* (649 bp), 1, muestra que contiene 0,01ng de DNA de de *Vibrio cholerae* CECT 512. 1, 0,01ng de DNA de *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, 0,01 ng de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, 0,025 de de *Legionella pneumophila* Philadelphia 1 y 0,02 ng de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; M, marcador de peso molecular HaeIII.

**FIG. 2. Sensibilidad de la detección de *Microcystis aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, y *Vibrio cholerae*.** **A**, Se muestran las bandas de DNA amplificado mediante PCR multiplex del gen *mip* de *Legionella pneumophila* Philadelphia 1, el gen *mcyD* de *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 y el gen *ompU* de *Vibrio cholerae* CECT 512. 1, 0,2 ng de ADN molde; 2, 0,4 ng; 3, 0,6 ng. **B**, se muestran las bandas de DNA amplificado mediante PCR anidada, en la que se aprecia la amplificación del gen *ompU* de *Vibrio cholerae* CECT 512, el gen *mcyD* *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 y el gen *R16S* de *Legionella pneumophila* Philadelphia 1. Bp, pares de bases. 1, 0,0001 ng de ADN molde; 2, 0,001 ng; 3, 0,01 ng; 4, 0,1 ng; 5, 1 ng; 6, 10 ng.

**FIG. 3. Detección de *Microcystis spp*, *Legionella spp*, *Mycobacterium spp.*, *Pseudomonas spp.* en una muestra de campo.** Se muestran las bandas de DNA amplificado de los genes *mcyD* de *Microcystis spp*, *mip* de *Legionella spp*, *hsp65* de *Mycobacterium spp.* y *r16S* de *Pseudomonas spp.* de una muestra de agua de un embalse de Aragón, España. 1, calle que contiene la muestra de campo; M, calle que contiene el marcador de peso (Hae III).

30 **EJEMPLOS DE REALIZACIÓN**



Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto,  
5 los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la utilidad del método de la invención.  
10

**Ejemplo 1: Detección simultánea de *Microcystis aeruginosa* y bacterias patógenas (*Legionella pneumophila*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*. o *Vibrio cholerae*)**

15 Materiales: se han ensayado en 107 muestras de agua procedentes de diferentes cuerpos de agua tales como embalses, fuentes ornamentales, aguas emergentes de depuradoras, piscinas, pozos.. Se han ensayado las aguas de las procedencias mencionadas y también las amebas que crecieron después de cultivar en el laboratorio una alícuota del filtrado de estas muestras (un total  
20 de 47 muestras de amebas).

Como controles para poner a punto el ensayo se utilizaron cepas bacterianas procedentes de colección cultivadas en el laboratorio. Las condiciones de cultivo de la cianobacteria *Microcystis aeruginosa* en laboratorio fueron las  
25 siguientes. El cultivo de *M. aeruginosa* PCC 7806 se realizó en medio 553, que consiste en medio BG11<sub>0</sub> (Rippka R et al. J Gen Microbiol 1979. 11: 1-61) suplementado con nitrógeno y carbono. El medio de cultivo donde crecían las células estaba formado por BG11<sub>0</sub>, NaNO<sub>3</sub> en una concentración 2mM y NaHCO<sub>3</sub> a 10mM. Tras añadir el NaNO<sub>3</sub> al medio BG11<sub>0</sub>, se autoclava durante  
30 20 minutos a 121 °C y 1 kg/cm<sup>2</sup> de presión. Antes de utilizar el medio de cultivo, se adiciona el NaHCO<sub>3</sub> en condiciones asépticas a través de filtros de 0,22 µm de diámetro. Tras su inoculación, los cultivos fueron incubados a una

temperatura de 25-30°C, en frascos Roux de 1L, con iluminación lateral con luz blanca (25  $\mu$ moles de fotones/m<sup>2</sup>seg) y burbujeo con aire estéril, lo que permitía una correcta agitación del cultivo así como la aireación del mismo. Cada poco tiempo a los cultivos se les adiciona medio fresco estéril de forma

5 que las células dispongan de los nutrientes necesarios y elementos esenciales para su crecimiento, con el objetivo de prolongar la fase exponencial del crecimiento. Las demás bacterias se cultivaron siguiendo los protocolos descritos previamente (Roch N y Maurin M. J Antimicrob Chemother 2005. 55:866-871;; Zolezzi PC et al. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2004. 48(9):3462–3467; Tarr CL et al. J Clin Microbiol 2007 45(1):134-40. Epub 2006

10 Nov 8; Brooks T, et al. J Toxicol Environ Health A. 2004 Oct 22-Nov 26;67(20-22):1845-59.)

Métodos: Se partió de 100 ml de muestra de agua. Se tomó una alícuota

15 homogénea en un tubo de 50 ml, se centrifugó 3500 rpm entre 15 minutos y 20 minutos (min). Cada muestra de agua fue filtrada usando una rampa de filtración Millipore con el kit Microfil® Filtration Funnels with S-pack™ con Filtros Millipore estériles de 0,7  $\mu$ m de poro y diámetro 47mm.\_Se retiró parte del sobrenadante, hasta dejarlo en aproximadamente 1ml de sobrenadante, y se

20 pasa a un microtubo (tipo eppendorf). Se centrifugó 4 min a 10000 revoluciones por minuto (rpm) y se retira parte del sobrenadante hasta tener un volumen final de 500 $\mu$ l, (muestra 100 veces concentrada). Se homogeneiza y se coge una alícuota de 100  $\mu$ l. Se puede conservar el resto a 4°C.

25 A partir de ahora se trabajará con esa alícuota. Se rompen las células que pueden estar presentes en la muestra de agua entre las que puede haber amebas de vida libre o de las amebas que han sido aisladas de la misma, , con dos ciclos de congelación-descongelación en nitrógeno líquido, seguidos de un tratamiento a 90°C durante 5min. Esta solución es la que se usará como DNA

30 molde en la amplificación. Hasta ese momento guardar a –20°C.

Las condiciones de la PCR multiplex y de la PCR anidada son las que se detallan a continuación. Para todos los casos, se utilizaron los mismos ciclos, temperaturas y tiempos, también en el caso en el que se realiza la detección de *Vibrio cholerae*.

5

**PCR multiplex:** La determinación de la presencia de microorganismos patógenos se realizará añadiendo 10 µl de DNA de la muestra y 1 µl de Taq Polimerasa (0,15 unidades). La reacción se realizó siguiendo los protocolos conocidos por cualquier experto en la materia. La Taq polimerasa, buffer y dNTPs son de Biotools. Los cebadores se adquirieron a Invitrogen o a Biomers. Se introducen en el termociclador para llevar a cabo la primera amplificación en las siguientes condiciones:

- Calentar a 94°C 5 minutos
- Se programan 25 ciclos:
- 15 - Desnaturalización: 94°C 1 minuto
- Anillamiento o "Annealing": de 42°C a 46°C 1 minuto
- Extensión: 72°C 1 minuto

Se finaliza prolongando la última incubación a 72°C durante 10 minutos

20

**PCR anidada:** Se toman 5 µl del producto de amplificación y se diluyen 1:10 con agua mili-Q estéril. Se añaden 5µl de la dilución en el tubo y 1 µl de Taq polimerasa. La reacción se realizó siguiendo los protocolos conocidos por cualquier experto en la materia. La Taq polimerasa, buffer y dNTPs son de Biotools. Los cebadores se adquirieron a Invitrogen o a Biomers. Se introducen en el termociclador y se realiza una segunda PCR en las siguientes condiciones:

- Calentar a 94°C 5 minutos
- 30 - Se programan 20 ciclos:
- Desnaturalización: 94°C 1 minuto
- Anillamiento o "Annealing": de 47°C a 49°C 1 minuto

- Extensión: 72°C 1 minuto

Se finaliza prolongando la última incubación a 72°C durante 10 minutos

Visualización de resultados: Gel de agarosa 2% con bromuro de etidio o SyBr

5 safe, se cargan 10µl del producto de PCR junto con 2µl de tampón de carga. Se carga 3µl de marcador *Hae* III con 2µl tampón de carga y 7 µl de H<sub>2</sub>O milliQ estéril. Se corren la electroforesis 90V 1h. Los resultados se visualizan bajo una lámpara UV.

10 En el control positivo (*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (NP\_214954.1), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Legionella pneumophila Philadelphia-1* (NC\_002942.5), *Vibrio cholerae strain* CECT 512 (CP001485.1), *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 (AF183408.1) los productos de amplificación que esperados son:

15

Presencia de *Legionella pneumophila*: banda de 112 pb

Presencia de *Microcystis aeruginosa*: banda de 194pb

Presencia de *Mycobacterium tuberculosis* banda de 297 pb

Presencia de *Pseudomonas aeruginosa*: banda de 476pb.

20

Presencia de *Vibrio cholerae*: banda de 649 pb

Donde "pb" se refiere a pares de bases.

**Ejemplo 1.1. Detección de *Microcystis aeruginosa* y bacterias patógenas  
25 crecidas en el laboratorio, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*. y *Vibrio cholerae* .**

Se detectó la presencia de los genes *mcyD*, *mip*, *hsp65*, *r16S* RNA y *ompU* en bacterias crecidas en el laboratorio. Se utilizaron las siguientes bacterias:  
30 *Microcystis aeruginosa* PCC7806, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Legionella pneumophila Philadelphia-1*, *Legionella pneumophila* serogrupo I salvaje y *Vibrio cholerae* CECT 512. El ADN se extrajo mediante métodos conocidos por cualquier experto en la

materia y se realizó una PCR multiplex seguida por una PCR anidada. Se utilizó 0,01ng de DNA para todos ellos, excepto en el caso de *Legionella pneumophila* donde se utilizó 0,025ng y de *Pseudomonas aeruginosa* donde se utilizó 0,02ng. Se utilizaron los cebadores SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 para realizar una PCR multiplex; y los cebadores SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20 para realizar la PCR anidada. Las PCRs se realizaron tal y como se ha descrito anteriormente, en el caso de la PCR multiplex se utilizó una temperatura de anillamiento de 45°C y para la PCR anidada una temperatura de 48°C. Las concentraciones de los cebadores utilizados fueron para el gen *mip*, 0,75µM; para el gen *mcyD*, 0,5 µM; para el gen *hsp65*, 1 µM y para el gen *r16S (Legionella pneumophila)*, 1 µM.

15

Los cebadores a los que se refieren las secuencias SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 han sido publicados previamente (Roch N et al. 2005 J Antimicrobial Chemother 55: 866-871 y Rivera ING et al. Appl Environ Microbiol 67:2421-2429).

20

En la figura 1 se observa amplificación de los 5 microorganismos tal y como se ha explicado previamente para las muestras control. Presencia de *Legionella pneumophila* (112 pb), *Microcystis aeruginosa* (194pb), *Mycobacterium tuberculosis* ( 297 pb), *Pseudomonas aeruginosa* (476pb), *Vibrio cholerae*: (649 pb).

25

Cuando se realizó la detección de *Vibrio cholerae* en una reacción separada del resto de los patógenos, se observó que la sensibilidad aumentaba.

30

**Ejemplo 1.2. Ensayo de sensibilidad de los cebadores utilizados.**

Para determinar el límite de detección de los microorganismos, se procedió a probar distintas concentraciones de DNA molde de cada uno de ellos. Los cebadores utilizados fueron los descritos en las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, 5 SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29 (los cuatro últimos se refieren a cebadores para amplificación del gen 16S de *Legionella pneumophila* Philadelphia 1, sentido y antisentido para PCR multiplex; sentido y antisentido para PCR anidada, respectivamente; descritos en Yamamoto H et al. Microbiol 10 Immunol 1993. 37(8):617-622). Las PCRs se realizaron tal y como se ha descrito anteriormente, en el caso de la PCR multiplex se utilizó una temperatura de anillamiento de 45°C y para la PCR anidada una temperatura de 48°C. Se utilizaron los microorganismos descritos en el ejemplo 1.2 y se observó que el límite de detección es de entre 5 y 10 fentogramos de DNA para 15 cada microorganismo. Las concentraciones de los cebadores utilizados fueron para el gen *mip*, 0,75µM; para el gen *mcyD*, 0,5 µM; para el gen *hsp65*, 1 µM y para el gen *r16S* (*Legionella pneumophila*), 1 µM y 0,75µM para el gen *ompU*.

En la figura 2 se muestra un ejemplo de la amplificación mediante PCR 20 multiplex de *Vibrio cholerae* CECT 512, de *Legionella pneumophila* Philadelphia-1 y de *Microcystis aeruginosa* PCC7806. En la Fig. 2A se muestra una amplificación mediante PCR multiplex del gen *ompU*, el gen *mcyD* y el gen *mip*. En la figura 2B se muestra la amplificación de PCR multiplex seguida de PCR anidada del gen *ompU*, *mcyD* y R16S (en este caso el R16S de *L. 25 pneumophila* Philadelphia-1).

Como se puede observar en la figura 2, la PCR anidada acoplada a PCR multiplex permite una detección más sensible que una PCR multiplex sola.

30 **Ejemplo 1.3. Detección de *Microcystis spp.* y bacterias patógenas en una muestra de campo.**

El método de la invención se validó en una muestra de campo. En una muestra de agua de un pantano se analizó la presencia de cianobacterias productoras de microcistina y bacterias patógenas. Se utilizaron los cebadores SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, 5 SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, para realizar una PCR multiplex; y los cebadores SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18 para realizar la PCR anidada. Las PCRs se realizaron tal y como se ha descrito anteriormente, en el caso de la PCR multiplex se utilizó una temperatura de 10 anillamiento de 45°C y para la PCR anidada una temperatura de 48°C. Las concentraciones de los cebadores utilizados fueron las siguientes: para el gen mip (*L. pneumophila*) 0,75µM, para el gen mcyD (cianobacterias productoras de microcistina) 0,5 µM, para el gen hsp65( *Mycobacterium .sp.*) 1 µM y para el gen r16S (*Pseudomonas sp.*) 1 µM.

15

Como se puede apreciar en la figura 1 se detectó la presencia de *Microcystis spp*, *Legionella spp.*, *Mycobacterium spp*, *Pseudomonas spp*. Se puede observar que la cantidad de *Mycobacterium spp*. era superior a la cantidad de los otros tres microorganismos.

20

En algunos de los casos, tras los resultados de la PCR multiplex acoplada a PCR anidada, se procedió a secuenciar las muestras para confirmar la cepa de la que se trataba. Mediante secuenciación se ha podido observar que frecuentemente aparecen en las muestras de campo *Mycobacterium chelonae* 25 y *Mycobacterium mucogenicum*.

Con este ensayo se demuestra la utilidad del método de la invención en muestras de campo tanto en la detección como en la cuantificación de una cianobacteria productora de microcistina y de las bacterias patógenas de la 30 invención.

## REIVINDICACIONES

1. Método de detección y/o cuantificación de al menos una cianobacteria productora de microcistina y de al menos una bacteria patógena caracterizado por que comprende los siguientes pasos:
  - a. aislamiento de ácidos nucleicos presentes en una muestra de agua o de organismos acuáticos; y
  - b. detección y/o cuantificación del gen *mcyD* y al menos uno de los genes que se seleccionan de la lista que comprende: *mip*, *hsp65* o *16S* mediante PCR multiplex seguida de PCR anidada.
2. Método según la reivindicación 1 donde además se detecta y/o se cuantifica el gen *ompU* de forma simultánea o no simultánea mediante PCR.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 donde el organismo acuático es una ameba de vida libre.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde la cianobacteria es del género *Microcystis spp.*
5. Método según la reivindicación 4 donde la cianobacteria es *Microcystis aeruginosa*.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde la bacteria patógena se selecciona de entre *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium spp.* o *Pseudomonas spp.*
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde el ácido nucleico es ácido desoxirribonucleico.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde la PCR



multiplex se realiza utilizando los cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 y al menos una pareja de cebadores que se seleccionan de la lista que comprende: SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8.

5

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la PCR anidada se realiza utilizando los cebadores SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 y al menos una pareja de cebadores que se seleccionan de la lista que comprende: SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18.

10

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9 donde además se utiliza la pareja de cebadores SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10, en la PCR multiplex.

15

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, donde además se utiliza la pareja de cebadores SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20 en la PCR anidada.

20

12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 que además comprende la detección y/o cuantificación de al menos una cianobacteria productora de microcistina y de al menos una bacteria patógena mediante el cultivo de la cianobacteria o de la bacteria patógena.

25

13. Kit que comprende una pareja de cebadores que amplifican el gen *mcyD* y al menos una pareja de cebadores que amplifican un gen que se selecciona de la lista que comprende *mip*, *hsp65* o *16S*.

30

14. Kit según la reivindicación 13 donde los cebadores que amplifican el gen *mcyD* son SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 y/o los cebadores SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12.

15. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, que comprende al menos una pareja de cebadores que se seleccionan de la lista que comprende: SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18.
16. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15 que además comprende los cebadores que amplifican el gen *ompU*.
17. Kit según la reivindicación 16 donde los cebadores que amplifican el gen *ompU* son SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 y/o SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20.
18. Uso del kit según las reivindicaciones 13 a 17 para la detección de una cianobacteria productora de microcistina y de al menos una bacteria patógenas en una muestra de agua o en organismos acuáticos, donde la bacteria patógena es *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium spp.*, o *Pseudomonas spp* o *Vibrio cholerae*.
19. Uso de kit según la reivindicación 18 donde la cianobacteria es del género *Microcystis spp.*
20. Uso del kit según la reivindicación 19 donde la cianobacteria es *Microcystis aeruginosa*.
21. Uso del kit según las reivindicaciones 18 a 20 donde el organismo acuático es una ameba de vida libre
22. Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21 donde la muestra de agua es para consumo humano.
23. Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22 donde el agua

es agua de recreo, de riego u ornamental.

FIG.1

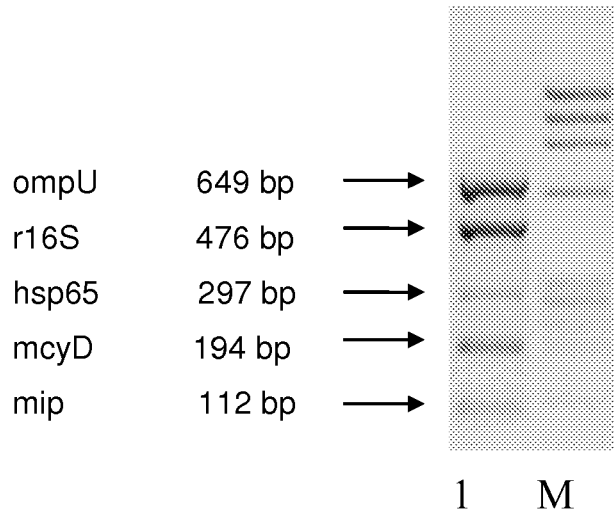


FIG.2

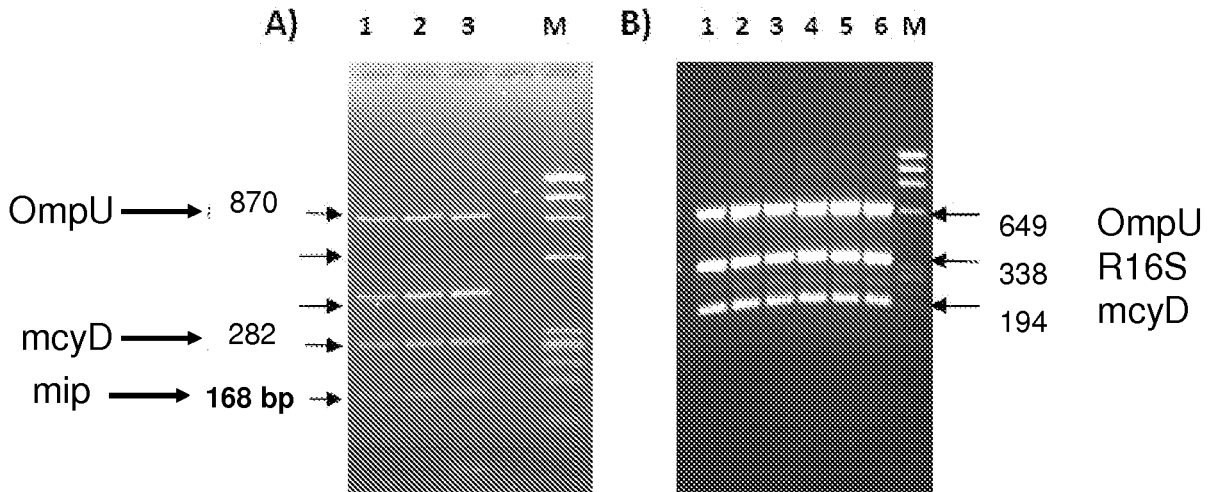
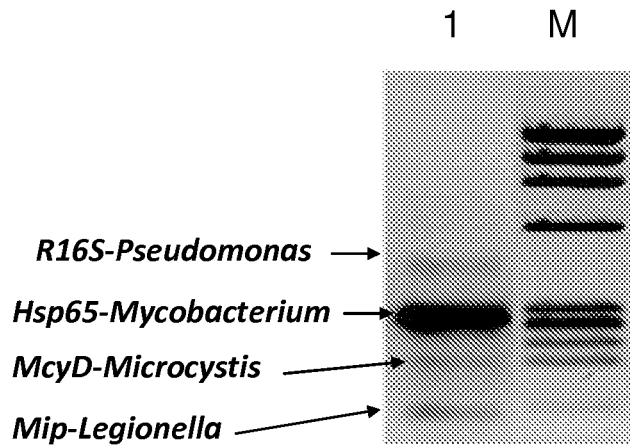


FIG.3



# ES 2 395 798 A1

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Zaragoza

<120> Método de detección de cianobacterias y bacterias patógenas presentes en agua o en amebas de vida libre

<130> ES1510.97

<160> 30

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> cebador sentido para PCR multiplex del gen mcyD

<400> 1  
gagcattaag ggctaaatcg 20

<210> 2  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Cebador antisentido para PCR multiplex del gen mcyD

<400> 2  
cttggttgct tcatcaactc 20

<210> 3  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> cebador sentido para la PCR multiplex del gen mip

<400> 3  
gcattggtgc cgatttgg 18

<210> 4  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Cebador antisentido para la PCR multiplex del gen mip

<400> 4  
gytttgcac aaatctttct gaa 23

<210> 5  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

ES 2 395 798 A1

<223> Cebador sentido para la PCR multiplex del gen hsp65  
 <400> 5  
 cccgtacgag aagatcgg 18

<210> 6  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador antisentido para la PCR multiplex del gen hsp65  
 <400> 6  
 gactcctcga cggtgatg 18

<210> 7  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador sentido para la PCR multiplex del gen 16S de Pseudomonas spp.  
 <400> 7  
 ggtctgagag gatgatcagt 20

<210> 8  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador antisentido para la PCR multiplex del gen 16S de Pseudomonas spp.  
 <400> 8  
 tctgtaccga ccattgtagc 20

<210> 9  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador sentido para la PCR multiplex del gen ompU  
 <400> 9  
 gctgacggaa tcaaccaaag 20

<210> 10  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador antisentido para la PCR multiplex del gen ompU  
 <400> 10  
 cggaagtttg gcttgaagta g 21

ES 2 395 798 A1

<210> 11  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador sentido para la PCR anidada del gen mcyD  
  
 <400> 11  
 tcatagcccc atatccttta gcggc 25  
  
 <210> 12  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador antisentido para la PCR anidada del gen mcyD  
  
 <400> 12  
 ctgctgtatc ttaattggc tcggc 25  
  
 <210> 13  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador sentido para la PCR anidada del gen mip  
  
 <400> 13  
 gaagcaatgg ctaaaggcat gcaag 25  
  
 <210> 14  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador antisentido para la PCR anidada del gen mip  
  
 <400> 14  
 gctttgcat caaatcttc tgaaacttg 29  
  
 <210> 15  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador sentido para la PCR anidada del gen hsp65  
  
 <400> 15  
 gagctgtca aggaagtcgc c 21  
  
 <210> 16  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador antisentido para la PCR anidada del gen hsp65

ES 2 395 798 A1

<400> 16  
 gttgccgacc ttgtccatcg c 21

<210> 17  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador sentido para la PCR anidada del gen 16S de Pseudomonas spp.

<400> 17  
 gacgttaccg acagaataag caccg 25

<210> 18  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador antisentido para la PCR anidada del gen 16S Pseudomonas spp.

<400> 18  
 aaccacatgc tccaccgctt gtg 23

<210> 19  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador sentido para la PCR anidada del gen ompU

<400> 19  
 caggttcaac cgtttacagc gcg 23

<210> 20  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador antisentido para la PCR anidada del gen ompU

<400> 20  
 gcgaagtaca ggttttccat gcgg 24

<210> 21  
 <211> 198  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Secuencia amplificada del gen mcyD de Microcystis aeruginosa PCC 7806

<400> 21  
 tcatagcccc atatccttta gcggtctaatc tctccaaaac attgcgatct actgctgcac 60  
 ctatttcact ccaaggacc caatttatga ccggtccggg taaatgatgc gtctgacgat 120



ES 2 395 798 A1

aatagataaa agcgtcttca aaggcattag ctgccgcagc attagcttgt cctgccgagc 180  
caattaaaga tacagcag 198

<210> 22  
<211> 113  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Secuencia amplificada del gen mip de Legionella pneumophila Philadelphia-1

<400> 22  
gaagcaatgg ctaaaggcat gcaagacgct atgagtggcg ctcaattggc tttaaccgaa 60  
cagcaaatga aagacgttct taacaagttt cagaaagatt tgatggcaaa acg 113

<210> 23  
<211> 297  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Secuencia amplificada del gen hsp65 de Mycobacterium tuberculosis H37Rv

<400> 23  
gagctggtca aggaagtcgc caagaagacc gacgacgtgg ccggtgacgg cacgacgagc 60  
gccacggtgc tggcccaggc gctggtgctc gagggcctgc gcaacgctgc ggccggcgcc 120  
aaccgctcg gcctgaagcg cggcatcgag aaggccgtcg agaaggtcac ggagaccctg 180  
ctgaagtcgg ccaaggaggt cgagaccaag gaccagatcg cggccaccgc cgcgatttcc 240  
gcgggcgacc agtcgatcgg cgacctgatc gccgaggcga tggacaaggt cggcaac 297

<210> 24  
<211> 476  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Secuencia amplificada del gen 16S de Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

<400> 24  
gacgttaccg acagaataag caccggctaa ctctgtgcca gcagccgagg taatacagag 60  
ggtgcaagcg ttaatcggaa ttactgggcg taaagcgcgc gtaggtgggt cgттаagttg 120  
gatgtgaaat ccccggtct aacctgggaa ctgcattcaa aactgtcgag ctagagtatg 180  
gtagagggtg gtggaatttc ctgtgtagcg gtgaaatgag tagatatagg aaggaacacc 240  
agtggcgaag gcgaccacct ggactgatac tgacactgag gtgcaaaagc gtggggagca 300  
aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat gtcaactagc cgttggggagc 360  
cttgagctct tagtggcgca gctaacgcat taagttgacc gcctggggag tacggccgca 420  
aggttaaac tcaaatgaat tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagcat gtgggtt 476

ES 2 395 798 A1

<210> 25  
 <211> 652  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Secuencia amplificada del gen ompU de Vibrio cholerae MJ-1236

<400> 25  
 caggttcaac cgtttacagc gcgaaaggta cttctctaga agttggtggc cgtgctgaag 60  
 ctcgcctatc tctgaaagat ggtaaggcac aagacaactc tcgcgtacgt ctaaacttct 120  
 tgggtaaagc agaaatcaat gacagcctat acggtgttgg tttctacgaa ggcgagttta 180  
 ctactaatga tcaaggtaaa aacgcgtcta acaacagcct agacaaccgt tatacctacg 240  
 ctggtatcgg tggcacttac ggtgaagtga cttacggtaa aaacgatggc gcattggggc 300  
 taatcactga cttcaccgat atcatgtctt accacggtaa cacagccgca gaaaaaattg 360  
 ctgtagcaga ccgtgttgac aacatgctgg cttacaaagg ccaatttggg gacctaggcg 420  
 taaaagcaag ctaccgtttt gctgaccgta acgctgttga cgcaatgggt aatgtttgtaa 480  
 ctgaaacaaa cgctgccaag tactctgaca acggtgaaga tggttactct ctgtctgcta 540  
 tctacacttt cggtgacact ggctttaaag taggtgctgg ctacgcagat caagacgatc 600  
 aaaacgaata catgctagcc gcttcttacc gcatggaaaa cctgtacttc gc 652

<210> 26  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador sentido para la PCR multiplex del gen 16S para Legionella pneumophila

<400> 26  
 gagggttgat aggttaagag c 21

<210> 27  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador antisentido para la PCR multiplex del gen 16S de Legionella pneumophila

<400> 27  
 gtcaacttat cgcgtttgct 20

<210> 28  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador sentido para la PCR anidada del gen 16S para Legionella pneumophila

<400> 28

ES 2 395 798 A1

ctggacgtta cccacagaag aagc 24

<210> 29  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador antisentido para la PCR anidada del gen 16S para Legionella pneumophila

<400> 29  
 gtttacagcg tggactacca ggg 23

<210> 30  
 <211> 431  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Secuencia amplificada del gen 16S de Legionella pneumophila Philadelphia-1

<400> 30  
 gagggttgat aggttaagag ctgattaact ggacgttacc cacagaagaa gcaccggcta 60  
 actccgtgcc agcagccgcg gtaatacggg gggtgcgagc gttaatcgga attactgggc 120  
 gtaaaggggtg cgtaggtggt tgattaagtt atctgtgaaa ttcctgggct taacctggga 180  
 cggtcagata atactggttg actcgagtat gggagagggt agtgggaattt ccggtgtagc 240  
 ggtgaaatgc gtagagatcg gaaggaacac cagtggcgaa ggcggctacc tggcctaata 300  
 ctgacactga ggcacgaaag cgtggggagc aaacaggatt agataccctg gtagtccacg 360  
 ctgtaaacga tgtcaactag ctgttggtta tatgaaaata attagtggcg cagcaaacgc 420  
 gataagttga c 431



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201131130

②② Fecha de presentación de la solicitud: 04.07.2011

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	WO2011/003184 A1 (NAT. RES. COUNCIL CANADA) 13-01-2011, ejemplo 1, página 5, línea 19 - página 8, línea 7; reivindicaciones 1-9;	1-23
X	OUAHID, Y. et al., 'Identification of potentially toxic environmental Microcystis by individual and multiple PCR amplification of specific microcystin synthetase gene regions.', ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY, 2005, Vol. 20, No. 3, páginas 235-242, ISSN: 1520-4081, Materiales y Métodos, Tabla 2.	1-23
X	STØLHAUG, A. et al., 'Identification and differentiation of Legionella pneumophila and Legionella spp. With real-time PCR targeting the 16S rRNA gene and species identification by mip sequencing.', APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 2006, Vol.72, No. 9, páginas 6394-6398, ISSN: 0099-2240, todo el documento, en particular, Tabla 1.	1-23
X	TOBLER, N.E. et al., 'Rapid detection and species identification of Mycobacterium spp. using real-time PCR and DNA-microarray', JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS, 2006, Vol. 66, No. 1, páginas 116-124, ISSN: 0167-7012, Materiales y Métodos, Resultados.	1-23

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

01.10.2012

Examinador

J. L. Vizán Arroyo

Página

1/6



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201131130

②② Fecha de presentación de la solicitud: 04.07.2011

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	LOCATELLI, L. et al., 'Specific PCR amplification for the genus Pseudomonas targeting the 3' half of 16S rDNA and the whole 16S-23S rDNA spacer', SYSTEMATIC AND APPLIED MICROBIOLOGY, 2002, Vol. 25, No.2, páginas 220-227, ISSN: 0723-2020, Materiales y Métodos.	1-23
X	RIVERA, I.N. et al., 'Genotypes associated with virulence in environmental isolates of Vibrio cholerae', APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 2001, Vol. 67, No. 6, páginas 2421-2419, ISSN: 0099-2240, Materiales y Métodos, Tabla 1.	1-23
A	PARK, S.H. et al., 'Multiplex PCR assay for the detection and quantification of Campylobacter spp., Escherichia coli O157:H7, and Salmonella serotypes in water samples', FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, 2011 Mar, Vol.316, No. 1, páginas 7-15, ISSN: 0378-1097, todo el documento.	1-23

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  
01.10.2012

Examinador  
J. L. Vizán Arroyo

Página  
2/6

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

C12Q

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

INVENES, EPODOC, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EMBL-EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 01.10.2012

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-23	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-23	<b>NO</b>

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	WO2011/003184 A1 (NAT. RES. COUNCIL CANADA)	13.01.2011
D02	OUAHID, Y. et al., <i>Environ. Toxicol.</i> , (2005), <u>20</u> (3): 235-42.	2005
D03	STØLHAUG, A. et al., <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> , (2006), <u>72</u> (9):6394-8.	2006
D04	TOBLER, N.E. et al., <i>J. Microbiol. Methods.</i> , (2006), <u>66</u> (1): 116-24.	2006
D05	LOCATELLI, L. et al., <i>Syst. Appl. Microbiol.</i> , (2002), <u>25</u> (2):220-7.	2002
D06	RIVERA, I.N. et al., <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> , (2001), <u>67</u> (6): 2421-9.	2001
D07	PARK, S.H. et al., <i>FEMS Microbiol. Lett.</i> , (2011 Mar), <u>316</u> (1): 7-15.	Mar 2011

En D1-D2 se describen procedimientos de detección de cianobacterias productoras de microcistina.

En D3-D6 se describen respectivamente procedimientos de detección de *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium* spp. y *Pseudomonas* 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 y Reivindicación 1 en combinación con Reivindicación 2.

1.1.1. El objeto de la reivindicación 1 consiste en un procedimiento de detección de cianobacterias del género *Microcystis* spp. productoras de microcistina y de al menos una de las bacterias patógenas seleccionadas de entre *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas* spp. o *Vibrio cholerae* basado en la detección y cuantificación mediante PCR multiplex seguida de PCR anidada del gen *mcyD* y de la menos uno de los genes *mip*, *hsp65*, *16S* o *ompU*. En el estado de la técnica más próximo, constituido por los documentos D1-D6, no se ha divulgado ningún procedimiento que comparta las mismas características técnicas del reivindicado en la solicitud de patente.

1.2. La presente solicitud satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 1-23 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 y Reivindicación 1 en combinación con Reivindicación 2.

2.1.1. Los documentos D1 a D6 constituyen el estado de la técnica más próximo. En D1-D2 se describe un procedimiento de detección de *Microcystis* spp. que consiste básicamente en la detección mediante PCR del gen *mcyD* (cf. D1: Página 5, línea 19 - Página 8, línea 7; Ejemplo 1, Reivindicaciones 1-9. D2: Materiales y Métodos, Tabla 2). En D3-D6 se describen procedimientos de detección de *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas* spp. o *Vibrio cholerae* basados en la identificación mediante PCR de los genes *mip*, *hsp65*, *16S* o *ompU*, respectivamente (cf. D3: Tabla 1. D4: Materiales y Métodos; Resultados. D5: Materiales y métodos. D6: Materiales y Métodos, Tabla 1).

2.1.2. El problema técnico a resolver por el objeto de la reivindicación 1 puede ser considerado, por consiguiente, como la provisión de un nuevo procedimiento de detección de cianobacterias del género *Microcystis* spp. y de al menos una de las bacterias patógenas seleccionadas de entre *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas* spp. o *Vibrio cholerae*.

2.1.3. La solución propuesta es el procedimiento de la reivindicación 1. Este procedimiento se diferencia básicamente de los descritos en D1-D6 en los oligonucleótidos usados como cebadores para la detección de los genes *mcyD*, *mip*, *hsp65*, *16S* o *ompU* y en la reacción PCR multiplex seguida de la reacción PCR anidada que facilita la detección simultánea del gen *mcyD* de *Microcystis* spp. y de al menos uno de los genes seleccionados de entre *mip*, *hsp65*, *16S* o *ompU* de las especies *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas* spp. y *Vibrio cholerae*. Las secuencias de la invención SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 2, SEQ ID No: 11 y SEQ ID No: 12 empleadas como cebadores para la



detección del gen *mcyD* de *Microcystis* spp y las descritas para el mismo fin en D1-D2 se corresponden con regiones altamente conservadas de dicho gen. Puesto que en la solicitud no se explicita ningún efecto sorprendente e inesperado derivado del uso de estos cebadores frente a los descritos en D1-D2 con relación a la detección del gen indicado, se considera que la solución propuesta por la solicitud 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. Análogamente, los cebadores propuestos en la solicitud para la detección de los genes *mip*, *hsp65*, *16S* y *ompU* constituyen alternativas no inventivas frente a los propuestos en D3-D6 con esos mismos fines.

La técnica de la reacción PCR multiplex permite la detección simultánea de secuencias procedentes de orígenes diferentes mediante su amplificación con cebadores específicos. La aplicación de dicha técnica para la detección e identificación de agentes patógenos en muestras de agua ya ha sido descrita en el estado de la técnica (cf. D7). Por consiguiente, ante el problema de detectar el gen *mcyD* de *Microcystis* spp. y al menos uno de los genes seleccionados de entre *mip*, *hsp65*, *16S* o *ompU* de las especies *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas* spp. y *Vibrio cholerae*, el experto en la materia combinaría la enseñanzas divulgadas en D1 y D2 con las de los documentos D3-D6 llegando como resultado a la solución propuesta en la reivindicación 1 en combinación con la reivindicación 2 o a una equivalente. Por todo ello, se considera que la reivindicación 1 y las reivindicaciones dependiente 2-23 no son inventivas.

- 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 1-23, no implica actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1. de la Ley de Patentes.