

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 943**

21 Número de solicitud: 201630002

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

04.01.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

05.05.2016

Fecha de la concesión:

08.02.2017

45 Fecha de publicación de la concesión:

15.02.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE LEÓN (100.0%)
Avda. de la Facultad, 25
24071 León (León) ES**

72 Inventor/es:

**ROJO VÁZQUEZ, Francisco Antonio y
MARTÍNEZ VALLADARES, María**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

54 Título: **Procedimiento de detección de Fasciola spp., oligonucleótidos utilizados y kit**

57 Resumen:

La presente invención es un procedimiento de detección de *Fasciola* spp. en una muestra, preferiblemente de heces de un sujeto, que comprende la extracción del ADN de *Fasciola* spp. de dicha muestra, al menos una reacción de amplificación isotérmica mediada por bucles, LAMP, sobre dicho ADN en presencia de al menos un cebador seleccionado entre las SEQ ID NO.:1-4 ó una variedad funcional de los mismos, o sus secuencias complementarias, y la detección de *Fasciola* spp. evaluando el resultado de dicha reacción LAMP. La invención también comprende los oligonucleótidos utilizados y su uso como cebadores, además del kit que los contiene para realizar el ensayo de detección.

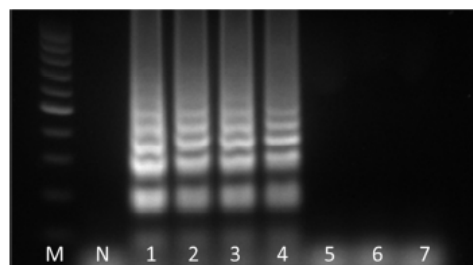


Figura 1

ES 2 568 943 B1

DESCRIPCIÓN

**PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN DE *FASCIOLA SPP.*,
OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS Y KIT**

SECTOR TÉCNICO

- 5 La presente invención refiere a la detección de *Fasciola spp.* a partir de muestras fecales utilizando la técnica de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos tipo LAMP, en el sector de la salud humana y veterinaria, con incidencia en la producción de productos derivados cárnicos y lácteos.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

- La infección producida por el parásito helminto *Fasciola spp.*, o fasciolosis, causa una enfermedad hepática muy severa en la salud de las personas y animales. En particular, en los rumiantes provoca una reducción de la tasa de crecimiento y producción de leche así como el decomiso de los hígados afectados. La prevalencia
15 de la fasciolosis en animales está aumentando debido a diferentes causas como la progresiva resistencia antihelmíntica y a modificaciones del medio ambiente que favorece la expansión del parásito. Desde el punto de vista económico la enfermedad resulta muy significativa.

- 20 En algunas regiones este parásito es también un patógeno humano. La enfermedad también es capaz de transmitirse a las personas siendo el ciclo biológico dentro del hospedador definitivo el mismo para los rumiantes y para el hombre.

- De forma convencional, el diagnóstico de la enfermedad se confirma por la
25 observación de huevos de los parásitos en las heces de animales infectados. Sin embargo esto sólo es posible a partir de las 7 semanas post-infección (p.i.) (Martínez-Pérez, J.M. y col. "Effect of lipopolysaccharide (LPS) from *Ochrobactrum intermedium* on sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*." Parasitol. Res. 112, 2913-23, 2013). La sensibilidad de este método se estima además sólo un 30%, lo que da lugar
30 a un alto número de falsos negativos.

- La detección de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha dado lugar a métodos más específicos para la detección de la infección por *Fasciola spp.* a partir de muestras recogidas de animales infectados. Por ejemplo Martínez-Pérez en la
35 publicación anterior diagnosticó la infección a partir de las 2 semanas p.i. utilizando

una PCR anidada, y a partir de las 3 semanas p.i. gracias a una PCR estándar, utilizando en ambos casos muestras de heces. En ese estudio la sensibilidad de ambas PCRs fue mayor que la detección por ELISA. También Robles-Pérez diagnosticó la infección por *F. hepatica* en animales positivos utilizando muestras de heces a partir de las 2 semanas p.i. por una PCR estándar amplificando un fragmento de la región del segundo espaciador transcrito interno ITS-2 (Robles-Pérez, D. y col. "The diagnosis of fasciolosis in faeces of sheep by means of a PCR and its application in the detection of anthelmintic resistance in sheep flocks naturally infected". Vet. Parasitol. 197, 277-282, 2013).

10

Una alternativa a la PCR es la técnica de amplificación isotérmica mediada por bucles o LAMP ("Loop Mediated Isothermal Amplification"; Notomi, T. y col. "Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids. Res. 28: E63, 2000). El método LAMP utiliza cuatro cebadores, dos internos y dos externos, que reconocen seis regiones en el ADN diana para conseguir una especificidad extremadamente alta. Las reacciones de auto-ciclismo dan lugar a la acumulación de una gran cantidad del ADN diana, mientras que otra reacción en presencia de pirofosfato de magnesio permite la detección visual rápida de la turbidez o fluorescencia visual en presencia de fluorescente colorantes intercalantes como SYBR Green I.

20

La patente CN 102021246 B describe la detección de *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica* utilizando la LAMP a partir de parásitos adultos de *Fasciola spp.*, huevos del parásito o cercarías del parásito. El método descrito aísla primero los huevos del parásito de las heces del animal, lo cual es un método largo y tedioso; o bien recupera los huevos de la vesícula biliar o los parásitos adultos del hígado de animales supuestamente infectados, lo que en ambos casos implica el sacrificio del animal. Esta misma técnica también se describe en la publicación de Ai (Ai, L. y col. "Rapid identification and differentiation of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay." Vet. Parasitol. 174, 228-233, 2010).

30

La presente invención tiene la ventaja que utiliza muestras de heces, de forma que puede realizar la identificación de *Fasciola spp.* en animales en los que no se conoce la presencia de la infección. Además, a diferencia de la publicación, la invención es capaz de diagnosticar la infección por cualquier especie de *Fasciola spp.*, ya que la secuencia de los cebadores es común para *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica*.

35

Actualmente esta técnica también ha sido descrita por Skuce et al. (2015) en la comunicación "DNA-based testing for liver fluke infection in sheep, an evaluation of Loop-mediated Isothermal Amplification" al "25th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology". Esta publicación se
 5 considera la más cercana de la técnica. Skuce utilizó la técnica LAMP a partir de heces de ovejas infectadas y detectó el parásito a partir de las 3 semanas post-infección. Por otro lado, los ensayos de Skuce presentaron reacciones cruzadas con *Calicophoron daubneyi*. La presente invención, sin embargo, no da reacciones cruzadas con el ADN de ningún otro helminto adulto de *Dicrocoelium dendriticum*,
 10 *Calicophoron daubneyi*, *Teladorsagia circumcincta*, *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis*, que normalmente parasitan a las ovejas en pastoreo. Además, fue capaz de detectar la infección a partir de la primera semana post-infección, lo que demuestra una mayor sensibilidad.

15 El problema que se plantea es la obtención de un método de detección de *Fasciola* spp. con mayor sensibilidad que en las enseñanzas de Skuce. La presente invención propone la realización del método LAMP utilizando los cebadores identificados por las SEQ. ID. NO.:1-4.

20 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención es un procedimiento de detección de *Fasciola* spp. en una muestra biológica, preferiblemente de heces de un sujeto, que comprende la extracción del ADN de *Fasciola* spp. de dicha muestra, al menos una reacción de amplificación isotérmica mediada por bucles, LAMP, sobre dicho ADN en presencia de
 25 al menos un cebador seleccionado entre las SEQ ID NO.:1-4 o una variedad funcional de los mismos, o sus secuencias complementarias, y la detección de *Fasciola* spp. evaluando el resultado de dicha reacción LAMP.

En el alcance de la presente invención, una "variante funcional" de un cebador es
 30 aquel fragmento o extensión o variación de la secuencia original de dicho cebador que mantiene una función similar, de forma que pueda ser utilizado en el procedimiento de la invención para obtener los mismos resultados.

Dicho sujeto es preferiblemente un rumiante. Pero la presente invención para la
 35 detección de la infección a partir de muestras fecales utilizando la técnica LAMP

podría también utilizarse para la detección de *Fasciola* spp. en otras especies animales como el hombre. Por tanto, otro aspecto muy preferible de la invención es que dicho sujeto sea un humano.

- 5 En otro aspecto preferible más, dicha *Fasciola* spp. es *Fasciola hepatica* o *Fasciola gigantica*.

En un aspecto preferible de la invención, dicha reacción LAMP se realiza en presencia de un sistema colorimétrico, más preferiblemente un colorante específico de ADN, aún
10 más preferiblemente SYBR Green I, calceína o Azul de hidroxinaftol.

En otro aspecto preferible del procedimiento de la invención, dicha evaluación comprende la comparación de dicha reacción LAMP con al menos una muestra control.

15 Otro aspecto de la presente invención son los oligonucleótidos identificados por las SEQ. ID. NO.:1-4, o sus secuencias complementarias. En la presente solicitud, los dos cebadores internos se denominan FIP y BIP, y los dos externos F3 y B3. En la Tabla 2 se especifican las secuencias respectivas.

20

Tabla 2:

Cebadores Secuencia (5'-3')

F3: SEQ ID NO.:1

B3: SEQ ID NO.:2

FIP: SEQ ID NO.:3

BIP: SEQ ID NO.:4

La traducción del texto libre del listado de secuencias es como sigue. "DNA" se traduce como "ADN"; "Artificial Sequence" se traduce como "Secuencia Artificial";
25 "Primer" se traduce como "cebador"; "Spacing Sequence" se traduce como "Secuencia espaciadora".

Un aspecto muy preferible es el uso de dichos oligonucleótidos de forma independiente como cebadores específicos para la secuencia correspondiente a la
30 región del segundo espaciador transcrito interno (ITS-2) del ADN ribosomal de

Fasciola spp (SEQ ID NO:5). Un aspecto más preferible aún es el uso de dichos oligonucleótidos en la detección de *Fasciola* spp en una reacción LAMP.

El procedimiento de la invención consigue una mayor sensibilidad y especificidad que otros procedimientos de la técnica en la detección de *Fasciola* spp.

El aspecto más preferible del procedimiento de la presente invención es un kit que comprende al menos uno de los cebadores identificados por las SEQ. ID. NO.:1-4, o sus secuencias complementarias.

10

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Resultado de la amplificación isotérmica tipo LAMP. Resultado de la amplificación isotérmica tipo LAMP y visualizado en gel de agarosa al 2%. Diluciones seriadas de ADN de adulto de *Fasciola hepatica* con un rango de 1 ng/ml (1) a 10^{-6} ng/ml (7). M: marcador. N: negativo.

15

Figura 2: Resultado de la PCR convencional utilizando los cebadores F3 y B3 con muestras de heces de animales recogidas antes del tratamiento (1-8) y después del tratamiento (9-16). P: positivo, N: negativo, M: marcador de peso molecular.

20

EJEMPLOS

Con la intención de mostrar la presente invención de un modo ilustrativo, aunque en ningún modo limitante, se aportan los siguientes ejemplos.

25 **Ejemplo 1: Toma de muestras de heces.**

Se recogieron semanalmente heces de siete (7) animales infectados experimentalmente con metacercarias de *F. hepatica* (Ridgeway Research Ltd. Co., Lydney, Reino Unido). Con cada toma de muestras se realizó una mezcla de heces de todos los animales de la misma semana. De cada mezcla semanal se guardaron 0,5 gr a -20°C para la posterior extracción del ADN.

30

Por otro lado, se recogieron muestras de heces de ocho (8) ovejas infectadas de forma natural con *Fasciola hepatica*. La infección en estos animales se confirmó de forma previa por la observación de los huevos del parásito al microscopio. De cada muestra individual se guardaron 0,5 gr de heces a -20°C para la posterior extracción de ADN.

35

De este grupo se recogieron muestras de heces después de 30 días de la administración de un tratamiento antihelmíntico con el fármaco triclabendazol, tal como se describe en el Ejemplo 7.

5 Ejemplo 2: Extracción de ADN de las heces de ovejas infectadas por *F. hepatica*

Cada extracción se realizó a partir de 0,5 gr de heces siguiendo las instrucciones del fabricante del kit "SpeedTools Tissue DNA Extraction Kit" (Biotools B&M Labs). Una vez extraído el ADN se precipitó con etanol según el protocolo siguiente:

- A la muestra de ADN se le añadió 1:10 de su volumen de acetato sódico 3M (ph=5,2) y 2 veces su volumen de etanol al 100% frío. La mezcla se dejó 1 hora a -20°C.
- Pasado ese tiempo se centrifugó en una microcentrífuga a 4°C y 12.000 rpm durante 15 minutos.
- Se descartó el sobrenadante y se añadieron 200 µl de etanol frío al 70% para volver a centrifugar en microcentrífuga a 4°C a 12.000 rpm durante 5 minutos.
- Se descartó el sobrenadante y se dejó la muestra a evaporar a 37°C para eliminar los restos de etanol.
- El pellet resultante se resuspendió con 20 µl de agua destilada y estéril.

20 De forma independiente se extrajo el ADN de parásitos adultos de los helmintos *Fasciola hepatica*, *Dicrocoelium dendriticum*, *Calicophoron daubneyi*, *Teladorsagia circumcincta*, *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis*.

Ejemplo 3. Diseño de cebadores para la detección de *Fasciola* spp.

25 Se diseñaron cebadores a partir de una región conservada para todas las especies de *Fasciola* spp., que fue la ITS-2. Inicialmente se realizó un alineamiento de varias secuencias de *F. hepatica* y *F. gigantica* que incluían esta región con el software MegAlign (DNASTAR, Inc.).

30 Tabla 1:

Aislados	Número de Acceso Banco de Genes (GenBank)
<i>Fasciola</i> spp.	JF708043.1
<i>F. hepatica</i>	GQ231547.1
<i>F. hepatica</i>	JF708026.1
<i>F. hepatica</i>	JF708036.1

<i>F. hepatica</i>	HM746786.1
<i>F. hepatica</i>	AM709622.1
<i>F. hepatica</i>	JF432071.1
<i>F. gigantica</i>	JF432074.1
<i>F. gigantica</i>	JF496714.1
<i>F. gigantica</i>	KF425321.1
<i>F. gigantica</i>	AM850108.1
<i>F. gigantica</i>	HM746788.1
<i>F. gigantica</i>	JN828956.1

De dicho alineamiento se obtuvo una secuencia consenso de 568 pares de bases a partir de la cual se diseñaron los cebadores para la amplificación isotérmica. Se diseñaron dos cebadores internos (FIP y BIP, SEQ ID NO.:1 y 2 respectivamente) y dos cebadores externos (F3 y B3, SEQ ID NO.:3 y 4, respectivamente) con el programa Primer Explorer V4 (<http://primerexplorer.jp/e/>).

Teniendo en cuenta la secuencia modelo JF708043.1 (Genbank), los cebadores de la presente invención son los siguientes: F3 (SEQ ID NO.:1) consta de 19 pares de bases y es la misma que la secuencia modelo entre las posiciones 630-648; la secuencia de B3 (SEQ ID NO.:2) consta de 20 bases y es la misma que la secuencia complementaria reversa entre las posiciones 97-116; FIP (SEQ ID NO.:3) consta de una secuencia de 41 bases cuyas 21 primeras se encuentran entre las posiciones 226-246 de la secuencia complementaria reversa de JF708043.1 (F1c) y las siguientes 20 bases entre las posiciones 260-279 de la secuencia molde (F2); BIP (SEQ ID NO.:4) consta de una secuencia de 38 bases cuyas 20 primeras se encuentran entre las posiciones 734-753 de la secuencia molde (B1c) y las siguientes 18 bases entre las posiciones 134-151 de la secuencia complementaria reversa de JF708043.1 (B2).

Tanto FIP como BIP contienen dos secuencias distintas que corresponden a las secuencias sentido y antisentido del ADN blanco, uno para cebar en la primera etapa y el otro para auto-cebarse en etapas posteriores.

El cebador interno FIP se une en el ADN blanco e inicia la síntesis de la hebra complementaria. El cebador externo F3, que es unas pocas bases más cortas y está en menor concentración que FIP, lentamente se une en el ADN blanco e inicia la síntesis de ADN por desplazamiento de la hebra. Al liberar una cadena complementaria unida a FIP, puede formar una estructura enrollada en bucle, crespo o

asa en un extremo. Esta hebra sencilla de ADN sirve como molde para la síntesis de ADN iniciada por BIP y la subsiguiente síntesis de ADN por desplazamiento de la hebra a partir del cebador B3 originando la producción de un ADN en forma de doble asa, que es rápidamente convertida a una forma de bucle en tallo por la síntesis de
5 ADN del autocebador. A continuación esta forma sirve de inicio para los ciclos de LAMP, la segunda etapa de la reacción de LAMP.

Para iniciar los ciclos de LAMP, FIP se une a la estructura en herradura de ADN y se inicia la síntesis por desplazamiento de la hebra, lo que genera una separación
10 intermedia en la estructura en herradura de ADN con una copia invertida adicional de la secuencia blanco en la base y un asa o bucle formada en el extremo opuesto a través de la secuencia BIP. Posteriormente, la síntesis de ADN por desplazamiento de la hebra produce una estructura complementaria a la herradura de ADN original y un
15 ADN en herradura reparado con una base elongada dos veces (hasta el doble de copias de la secuencia blanco) y un bucle en el extremo opuesto. Ambos productos sirven luego como molde para un cebador BIP en los ciclos siguientes de la reacción por desplazamiento de la hebra, de los cuales, una parte es denominada elongación y reciclaje. Así, la secuencia original de LAMP es amplificada tres veces cada medio ciclo. Los productos finales son una mezcla de ADN en herradura con
20 diferentes longitudes en su tallo y con estructuras similares a una coliflor con múltiples bucles formados por la unión entre repeticiones invertidas alternativas de la secuencia blanco en la misma cadena.

Se comprobó *in silico* la especificidad de los cebadores al realizar un alineamiento con
25 el programa Blast.

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome).

Ejemplo 4: Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos tipo LAMP para la detección de *Fasciola* spp.

30 Para realizar la amplificación se realizó una mezcla cuyo volumen final de reacción fue de 25 µl, que contenía 40 pmol de los cebadores FIP y BIP, 5 pmol de los cebadores F3 y B3, y las siguientes concentraciones finales: 1,4 mM de cada dNTPs, 1M de betaína, 8mM de MgSO₄ y 1x tampón "Isothermal Amplification Buffer" (New England Biolabs, UK); en la misma mezcla también se incluyeron 8U de la enzima Bst 2.0
35 WarmStart DNA polymerase (New England Biolabs, UK) y 1 µl de una muestra de

ADN del Ejemplo 2. La incubación de la mezcla se realizó en un termociclador (Bio-Rad) a 63°C durante 60 min y después a 80° durante 10 min para finalizar la reacción. Para la visualización del resultado se añadió a cada reacción 2 µl de una dilución 1:10 del colorante SYBR Green I 10.000 x (Invitrogen, USA). Este colorante se intercala en el surco menor de la molécula de ADN y solamente emite fluorescencia cuando está unido a ADN de doble cadena. Para un resultado positivo se observó una fluorescencia verde y en las muestras negativas se mantuvo la coloración naranja del colorante original. Además, para confirmar la amplificación, en algunas muestras se comprobó el resultado por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con GelRed y visualizado por el software Image Lab statistical software (Bio-Rad) (Figura 1).

Ejemplo 5: Especificidad de la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos tipo LAMP para la detección de *Fasciola* spp.

La especificidad de los cebadores se comprobó con muestras de ADN de adultos de *Fasciola hepatica* y también de los helmintos *Dicrocoelium dendriticum*, *Calicophoron daubneyi*, *Teladorsagia circumcincta*, *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis* (Fig 2). Estos parásitos adultos se recogieron a partir del hígado, rumen y abomaso de 5 ovejas adultas sacrificadas en un matadero municipal. Los cebadores de la invención no presentaron reacciones cruzadas con ninguna de las otras especies.

Ejemplo 6. Sensibilidad de la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos tipo LAMP para la detección de *Fasciola* spp.

La sensibilidad de los cebadores se demostró al utilizar la técnica con diluciones seriadas en base 10 de una muestras de ADN del parásito adulto de *Fasciola hepatica*, de entre 1 ng/µl y 10⁻⁶ ng/µl. Los resultados demuestran que el límite de detección de la invención es de 10⁻³ ng/µl.

En animales experimentalmente infectados también se determinó el margen de tiempo a partir del cual era posible la detección. Para ello se tomaron muestras de heces de 7 animales infectados experimentalmente con metacercarias de *F. hepatica* tal y como se indica en el Ejemplo 1. Con la presente invención fue posible la detección de la infección a partir de la primera semana tras la infección experimental.

Ejemplo 7. Análisis de muestras de heces de animales naturalmente infectados por *F. hepatica* mediante la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos tipo LAMP.

El procesado de las muestras de heces, extracción de ADN y amplificación se realizaron según lo descrito en los Ejemplos 1, 2 y 4. Se analizaron muestras de heces de ocho (8) ovejas previamente diagnosticadas como positivas por la observación de los huevos al microscopio. A cada uno de los animales se les trató con una única dosis de triclabenzadol (Fasinex®, 10 mg/kg) y a los 30 días después del tratamiento se volvió a comprobar la presencia de *F. hepatica* siguiendo el procedimiento de los Ejemplos anteriores (Figura 2). Los resultados según el método de la invención mostraron que después del tratamiento dos (2) animales continuaron infectados por *F. hepatica*.

Se compararon estos resultados con una PCR convencional utilizando los cebadores externos F3 y B3. Para ello se realizó una mezcla, cuyo volumen final de la reacción fue de 20 µl, que contenía una serie de componentes con las siguientes concentraciones finales: 1,5 µM de tampón suplementado con MgCl₂ (Biotools, España), 0,2 mM de cada dNTPs (Biotools, España) y 0,5 µM de cada cebador; en la misma mezcla también se incluyó 0,4 µl de Taq polimerase (Biotools, España), y 1 µl de ADN de cada parásito. El termociclador (Bio-Rad) se programó con las siguientes condiciones: 5 min a 95°C, seguido de 40 ciclos cada uno con 30 sg a 95°C, 30 sg a 63°C, y 30 sg a 72°C, y un paso de extensión final de 10 min a 72°C. El producto de amplificación se analizó en un gel de agarosa al 2% teñido con GelRed y visualizado con el software Image Lab statistical (Bio-Rad) (Figura 2). Los resultados mostraron que según la PCR convencional solamente 1 de las 8 muestras resultaba positiva.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de detección de *Fasciola spp.* en una muestra biológica, que comprende:
 - extracción del ADN de *Fasciola spp.* de dicha muestra,
 - 5 - al menos una reacción de amplificación isotérmica mediada por bucles, LAMP, sobre dicho ADN en presencia de al menos un cebador seleccionado entre las SEQ ID NO.:1-4 o una variedad funcional de los mismos, o sus secuencias complementarias, y
 - 10 - detección de *Fasciola spp.* evaluando el resultado de dicha reacción de amplificación isotérmica mediada por bucles.
2. Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que dicha muestra biológica es una muestra de heces de un sujeto.
3. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por que dicho sujeto es un rumiante.
- 15 4. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por que dicho sujeto es un humano.
5. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que dicha *Fasciola spp.* es *Fasciola hepatica* o *Fasciola gigantica*.
6. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que dicha reacción LAMP se realiza en presencia de un sistema colorimétrico.
- 20 7. Un procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado por que dicho sistema colorimétrico es un colorante específico de ADN.
8. Un procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado por que dicho colorante específico de ADN es SYBR Green I, calceína o Azul de hidroxinaftol
- 25 9. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicha evaluación comprende la comparación de dicha reacción LAMP con al menos una muestra control.
10. Oligonucleótido identificado por una de las SEQ. ID. NO.:1-4, o sus secuencias complementarias.
- 30 11. Uso de un oligonucleótido identificado por una de las SEQ. ID. NO.:1-4 como cebador específico para la secuencia correspondiente a la región del segundo espaciador transcrito interno ITS-2 del ADN ribosomal del genoma de *Fasciola spp.*
12. Uso de un oligonucleótido según la reivindicación 11, en la detección de *Fasciola*

35 *spp* en una reacción LAMP.

13. Kit para realizar el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende al menos uno de los cebadores identificados por las SEQ. ID. NO.:1-4, o sus secuencias complementarias.

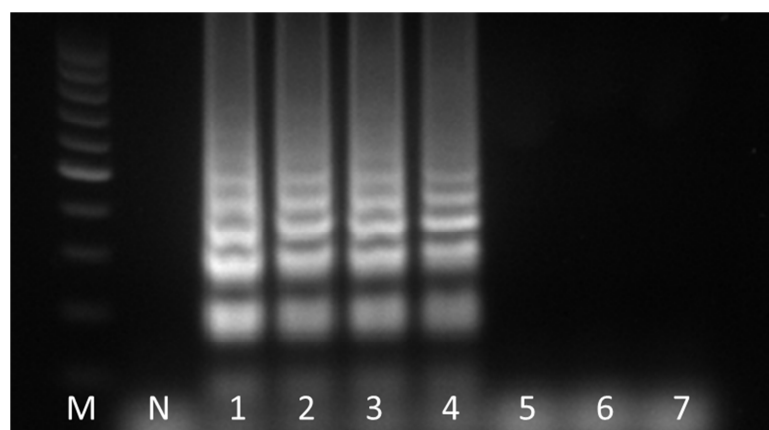


Figura 1

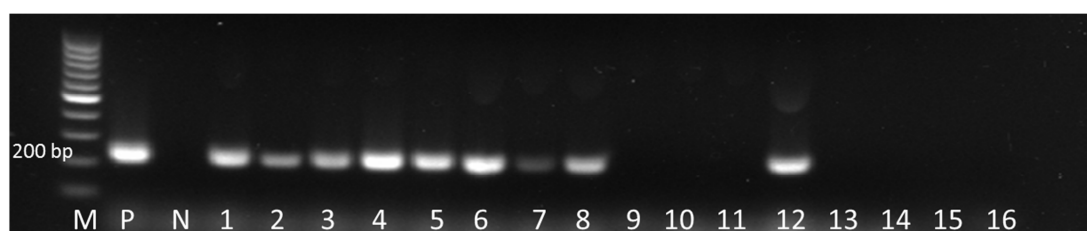


Figura 2

ES 2 568 943 B1

Listado de Secuencias

<110> UNIVERSIDAD DE LEÃN

<120> PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN DE FASCIOLA SPP.,
OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS Y KIT

<130> IC 2015-17221

<160> 5

<170> BiSSAP 1.3

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer F3

<400> 1

gctggcgtga tctcctcta

19

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer B3

<400> 2

aacgtgcctg gtatggaatt

20

<210> 3

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer FIP

<400> 3

tctgccaaaga caagggtgca tgtgaggtgc cagatctatg g

41

<210> 4

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

ES 2 568 943 B1

<220>

<223> Primer BIP

<400> 4

gtgcagtggc ggaatcgtgg tgtgccgact aggggatc
38

<210> 5

<211> 563

<212> DNA

<213> Fasciola sp.

<220>

<223> Spacing sequence ITS2

<400> 5

tgcacgtacg tcgcccggcg gtgcctatcc cgggttggac tgataacctg
gtctttgacc 60

atacgtacaa ctctgaacgg tggatcactc ggctcgtgtg tcgatgaaga
gcgcagccaa 120

ctgtgtgaat taatgcaaac tgcatactgc tttgaacatc cacatcttga
acgcatattg 180

cggccatggg ttagcctgtg gccacgcctg tccgagggtc ggcttataaa
ctatcacgac 240

gcccaaaaag tcgtggcttg ggttttgcca gctggcgtga tctcctctat
gagtaatcat 300

gtgaggtgcc agatctatgg cgtttcccta atgtatccgg atgcaccctt
gtcttggcag 360

aaagccgtgg tgaggtgcag tggcggaatc gtggtttaat aatcgggttg
gtactcagtt 420

gtcagtgtgt ttggcgatcc cctagtcggc acacttatga tttctgggat
aattccatac 480

caggcacgtt ccgtcactgt cactttgtca ttggtttgat gctgaacttg
gtcatgtgtc 540

tgatgctatt tctatagcga cgg
563



- ②① N.º solicitud: 201630002
②② Fecha de presentación de la solicitud: 04.01.2016
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ROBLES-PÉREZ, D. et al., 'The diagnosis of fasciolosis in feces of sheep by means of a PCR and its application in the detection of anthelmintic resistance in sheep flocks naturally infected', VETERINARY PARASITOLOGY, 2013, Vol. 197, Nos. 1-2, Págs 277-282, ISSN: 0304-4017 (print), ISSN: 1873-2550 (electronic), doi: 10.1016/j.vetpar.2013.05.006, Materiales y Métodos, Resultados.	1-13
Y	Al, L. et al., 'Rapid identification and differentiation of Fasciola hepatica and Fasciola gigantica by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay', VETERINARY PARASITOLOGY, 2010, Vol. 174, Nos. 3-4, Págs 228-233, ISSN: 0304-4017 (print), doi: 10.1016/j.vetpar.2010.09.005, Materiales y Métodos, Resultados.	1-9
Y	ALASAAD, S. et al., 'Characterization of Fasciola samples from different host species and geographical localities in Spain by sequences of internal transcribed spacers of rDNA', PARASITOLOGY RESEARCH, 2007, Vol. 101, No. 5, Págs 1245-1250, ISSN: 0932-0113, doi:10.1007/s00436-007-0628-2, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión.	10-13
Y	FARJALLAH, S. et al., 'Genetic characterization of Fasciola hepatica from Tunisia and Algeria based on mitochondrial and nuclear DNA sequences', PARASITOLOGY RESEARCH, 2009, Vol. 105, No. 6, Págs 1617-1621, ISSN: 0932-0113, doi:10.1007/s00436-009-1601-z6, todo el documento.	10-13
A	MARTÍNEZ-PÉREZ, J.M. et al., 'Comparison of three different techniques to diagnose Fasciola hepatica infection in experimentally and naturally infected sheep', VETERINARY PARASITOLOGY, 2012, Vol. 190, Nos. 1-2, Págs 80-66, ISSN: 0304-4017 (print), ISSN: 1873-2550 (electronic), doi: 10.1016/j.vetpar.2012.06.002, todo el documento.	1-13
A	NOTOMI, T. et al., 'Loop-mediated isothermal amplification of DNA', NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 2000, Vol. 28, No. 12, Pág E63, ISSN: 1362-4962 (Electronic), todo el documento.	1-13

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
26.04.2016

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
1/5

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

C12Q

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

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

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.04.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-13	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-13	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ROBLES-PÉREZ, D. et al., <i>Vet. Parasitol.</i> , (2013), 197(1-2): 277-82.	2013
D02	Al, L. et al., <i>Vet. Parasitol.</i> , (2010), 174(3-4): 228-33.	2010
D03	ALASAAD, S. et al., <i>Parasitol. Res.</i> , (2007), 101(5): 1245-50.	2007
D04	FARJALLAH, S. et al., <i>Parasitol. Res.</i> , (2009), 105(6):1617-21.	2009
D05	MARTÍNEZ-PÉREZ, J.M. et al., <i>Vet. Parasitol.</i> , (2012), 190(1-2): 80-6.	2012
D06	NOTOMI, T. et al., <i>Nucleic Acids Res.</i> , (2000), 28(12): E63.	2000

En D01-D05 se divulgan diferentes procedimientos de detección de *Fasciola* spp.

En D06 se describe la reacción de amplificación isotérmica mediada por bucles (LAMP) como método de amplificación de ADN.

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. Reivindicaciones independientes 1 y 10.**

1.1.1. El objeto de la reivindicación 1 consiste en procedimiento de detección de *Fasciola* spp en una muestra biológica que comprende la extracción de ADN de dicha muestra, al menos una reacción de amplificación isotérmica mediada por bucles (LAMP) en presencia de al menos un cebador seleccionado de entre SEQ ID NO: 1-4 y la detección de *Fasciola* spp según el resultado de dicha reacción de amplificación. En particular, la muestra biológica considerada es una muestra de heces (reivindicación 2). La reivindicación 10 trata de un oligonucleótido caracterizado por una de las secuencias SEQ ID NO: 1-4.

En el estado de la técnica más próximo, constituido por los documentos D01-D06, no se ha divulgado ningún procedimiento de detección de *Fasciola* spp, ni oligonucleótido, con las características técnicas referidas. Por consiguiente, el objeto de las reivindicaciones independientes 1 y 10 y el de las dependientes 2-9, 11-13 se considera nuevo sobre la base de los documentos D01-D06.

1.2. La presente solicitud satisface el criterio de patentabilidad establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes en cuanto al objeto definido en las reivindicaciones 1-13, pues es nuevo según 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.**

2.1.1. El objeto de la reivindicación 1 consiste en un procedimiento de detección de *Fasciola* spp en una muestra biológica que comprende las características técnicas referidas anteriormente. Por consiguiente, el problema técnico planteado es la provisión de un nuevo método de detección de *Fasciola* spp.

El procedimiento reivindicado se caracteriza por una reacción LAMP que amplifica, mediante cebadores específicos, la región ITS-2 ('internal transcribed spacer 2') del ADN ribosomal del genoma de *Fasciola* spp, conservada en todas las especies (cf. página 5, línea 16- página 6, línea 2, Ejemplo 3).

En el estado de la técnica más próximo se ha descrito un procedimiento de detección de *Fasciola* spp en muestras fecales basado en la amplificación mediante PCR de la secuencia del segundo espaciador transcrito interno (ITS-2) del ADN ribosomal del genoma de *Fasciola* spp, en particular, la amplificación de un fragmento de 292pb de ITS-2 (cf. D01: Materiales y Métodos, Resultados, Figura 1 y 2). Por consiguiente, la diferencia técnica entre el procedimiento reivindicado y el descrito en D01 radica en la diferente reacción de amplificación aplicada en cada caso. La reacción de amplificación isotérmica mediada por bucles (LAMP) está ampliamente descrita en el estado de la técnica y caracterizada como un procedimiento altamente específico, eficiente y rápido de amplificación de ADN (cf. D06). En particular, se ha divulgado un método de detección de *Fasciola* spp basado en una reacción LAMP que amplifica, mediante cebadores específicos la secuencia del espaciador intergénico ribosomal (IGS) del genoma de *Fasciola* spp (cf D02: Materiales y Métodos, Resultados, Tabla 2).

Por consiguiente, se considera que, teniendo en cuenta la información técnica divulgada en D01 y D02, el experto en la materia llegaría a la solución propuesta en la reivindicación 1 o a una equivalente para el problema técnico planteado. Por todo ello, se estima que el objeto de las reivindicación independiente 1, y el de las dependientes 2-9 no tiene actividad inventiva sobre la base de los documentos D01 y D02.

2.2. Reivindicación independiente 10.

2.2.1. El objeto de la reivindicación 10 consiste en un oligonucleótido caracterizado por una de las secuencias SEQ ID NO: 1-4.

Según la descripción, dichos oligonucleótidos son utilizados como cebadores específicos en una reacción LAMP de amplificación de la región ITS-2 del ADN ribosomal del genoma de *Fasciola* spp (cf página 5, línea 16- página 6, línea 2). Por consiguiente, el problema técnico planteado es la provisión de nuevos oligonucleótidos-cebadores para la detección de *Fasciola* spp.

En el estado de la técnica más próximo se ha descrito la secuencia de la región ITS-2 del ADN ribosomal del genoma de aislados de *Fasciola* spp, *Fasciola hepática* y *Fasciola gigantica*, y se han descrito oligonucleótidos-cebadores específicos para la amplificación de dicha región ITS-2 (cf, D01, D03, D04).

Puesto que en la solicitud no se describe ningún efecto inesperado y/o sorprendente asociado al uso de SEQ ID NO: 1-4 como cebadores para la amplificación específica de la región ITS-2 del ADN ribosomal del genoma de *Fasciola* spp frente a los cebadores descritos en D01, D03 y D04 con ese mismo fin, se considera que la solución propuesta en la reivindicación 10 al problema técnico planteado es una mera alternativa no inventiva a la divulgada en el estado de la técnica.

Por todo ello, se considera que la reivindicación 10, y las reivindicaciones dependientes 11-13 no son inventivas sobre la base de los documentos D01, D03 y D04.

2.3. La presente invención no satisface el criterio de patentabilidad establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes en cuanto al objeto definido en las reivindicaciones 1-13, pues no implica actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1. de la Ley de Patentes.