

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 117**

21 Número de solicitud: 201830830

51 Int. Cl.:

C12Q 1/689 (2008.01)

C12Q 1/686 (2008.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

16.08.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.02.2019

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
(100.0%)**

**Avda. Ramiro de Maeztu, nº 7
28040 MADRID ES**

72 Inventor/es:

**SÁNCHEZ PARRA, Beatriz;
NÚÑEZ HERNÁNDEZ, Andrés y
MORENO GÓMEZ, Diego Alejandro**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier;

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **MÉTODO DE DETECCIÓN POR PCR DE LA BACTERIA Legionella pneumophila EN MUESTRAS AMBIENTALES Y/O CLÍNICAS**

57 Resumen:

Método de detección por PCR de la bacteria Legionella pneumophila en muestras ambientales y/o clínicas

La presente invención se refiere a un método para detectar la bacteria Legionella pneumophila en muestras ambientales y/o clínicas, preferentemente de aire, por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sin necesidad de cultivo previo.

Se basa en la detección de una región específica del gen 16S rRNA de la bacteria, concretamente en la sección comprendida entre las regiones hipervariables V3 y V5, mediante el uso de un par de cebadores o primers, de los cuales el que se une específicamente a la región V5 ha sido diseñado por primera vez en esta invención.

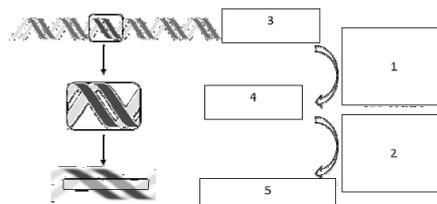


Fig. 1

ES 2 702 117 A1

DESCRIPCIÓN

MÉTODO DE DETECCIÓN POR PCR DE LA BACTERIA *Legionella pneumophila* EN MUESTRAS AMBIENTALES Y/O CLÍNICAS

5

Sector técnico de la invención

La presente invención se engloba en la Industria Biotecnológica, y más concretamente pertenece al sector del Medio Ambiente y la Salud. Se engloba en el campo de la detección de bacterias patógenas en muestras ambientales y clínicas, estando
10 especialmente dirigido a la detección de *Legionella pneumophila*.

Antecedentes de la invención

Legionella es un género de proteobacterias, Gram negativas, que comprende 61 especies diferentes, de las cuales 28 están asociadas con enfermedades humanas
15 (European Centre for Disease Prevention and Control. European Legionnaires' Disease Surveillance Network (ELDSNet). Operating procedures for the surveillance of travel-associated Legionnaires' disease in the EU/EEA. Stockholm: ECDC (2017)).

Normalmente, ocasionan la enfermedad del legionario ó legionelosis, que consiste
20 principalmente en fiebre muy alta y neumonía. Pero en algunas ocasiones pueden dar lugar a una infección más suave, similar a la de una gripe que se conoce como fiebre de Pontiac.

Hay dos especies: *Legionella longbeache* y *Legionella pneumophila* que aparecen en
25 todos los registros de salud como las dos especies causantes de la mayoría de las infecciones en humanos. De las dos, *Legionella pneumophila* es la que más casos ocasiona de legionelosis en Europa y en los Estados Unidos (European Centre for Disease Prevention and Control. European Legionnaires' Disease Surveillance Network (ELDSNet). Operating procedures for the surveillance of travel-associated Legionnaires'
30 disease in the EU/EEA. Stockholm: ECDC (2017); Fields, B. S., Benson, R. F. & Besser, R. E. *Legionella* and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 506–526 (2002); Van Heijnsbergen, E. *et al.* Confirmed and potential sources of *Legionella* reviewed. *Environ. Sci. Technol.* **49**, 4797–4815 (2015)).

Actualmente la legionelosis puede tratarse con antibióticos. No obstante la detección tardía de la presencia de *Legionella* patógena en un paciente puede hacer que éste empeore rápidamente y sufra fallo respiratorio, multiorgánico y le ocasione finalmente la muerte (World Health Organization (WHO). Legionellosis. (2017). Disponible en:
 5 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs285/en/>; Heath, C. H., Grove, D. I. & Looke, D. F. M. Delay in appropriate therapy of *Legionella pneumophila* associated with increased mortality. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **15**, 286–290 (1996)).

Entre las personas más susceptibles al contagio por *Legionella* patógena se encuentran
 10 aquellas de avanzada edad, normalmente hombres, fumadores, con trasplantes y/o inmunodeprimidos (Fields, B. S., Benson, R. F. & Besser, R. E. *Legionella* and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 506–526 (2002)). La *Legionella pneumophila* ocasiona brotes de infección cada año, afectando a un porcentaje significativo de la población humana.

15

La manera más habitual de contagio por *Legionella* es mediante la vía de la inhalación o aspiración de aerosoles conteniendo la bacteria patógena (European Centre for Disease Prevention and Control. European Legionnaires' Disease Surveillance Network (ELDSNet). Operating procedures for the surveillance of travel-associated Legionnaires' disease in the EU/EEA. Stockholm: ECDC (2017); Allegra, S. *et al.* Characterization of
 20 aerosols containing *Legionella* generated upon nebulization. *Sci. Rep.* **6**, 33998 (2016)). Estos aerosoles suelen provenir de dispositivos e instalaciones que utilizan agua en su funcionamiento como por ejemplo, las fuentes ornamentales, sistemas de aire acondicionado, torres de refrigeración, piscinas, spas, etc. (Van Heijnsbergen, E. *et al.*
 25 Confirmed and potential sources of *Legionella* reviewed. *Environ. Sci. Technol.* **49**, 4797–4815 (2015); Castillo, N. E., Rajasekaran, A. & Ali, S. K. Legionnaires' Disease. A Review *Infect. Dis. Clin. Pract.* **24**, 248–253 (2016); Vaqué Rafart, J. & Martínez Gómez, X. Epidemiología de la legionelosis. *Med. Integr.* **40**, 271–281 (2002)).

30 La detección de la presencia de *Legionella pneumophila* es uno de los procedimientos de control rutinarios que se hacen en estos sistemas y dispositivos humanos que llevan agua. En estos procedimientos, la detección de una dosis infectiva de *Legionella pneumophila* puede hacer que se cierre la instalación completa para poder proceder a su desinfección y limpieza antes de una nueva reapertura y un nuevo uso.

35

En la actualidad, hay diferentes mecanismos descritos que se utilizan para detectar e identificar *Legionella* spp. en los sistemas de agua que producen aerosoles y en posibles pacientes infectados. Estos mecanismos se basan en la detección por cultivo, test de
5 antígenos, serología, fluorescencia y ácidos nucleicos. Los dos primeros han sido muy utilizados por su alta especificidad (Fields, B. S., Benson, R. F. & Besser, R. E. *Legionella* and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 506–526 (2002)). Los análisis basados en serología y tinción de fluorescencia, aunque menos específicos, permiten detectar la bacteria pasado mucho tiempo, por ejemplo, en un
10 paciente ya fallecido. Finalmente, de todos estos métodos, aquel que se basa en ácidos nucleicos, como por ejemplo la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) es uno de los más utilizados hoy en día por su rapidez y porque se puede usar con muchos tipos de muestras clínicas (esputo, BAL, biopsia, post mortem, etc.) y también ambientales. Además, el uso de la PCR es el método descrito por el “European Working
15 Group for Legionella Infections” (EWGLI) para poder llegar a determinar el serotipo de una cepa de *Legionella* (Sequence-Based Typing (SBT); http://bioinformatics.phe.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php).

Sin embargo, un punto limitante para los métodos de detección de *Legionella* anteriormente descritos, es la necesidad de tener suficiente concentración bacteriana.
20 Por ello, estas técnicas habituales van frecuentemente acompañadas de un paso previo de cultivo en medios específicos requerido para obtener suficiente masa microbiana con la que poder llevar a cabo los análisis (Fragou, K., Kokkinos, P., Gogos, C., Alamanos, Y. & Vantarakis, A. Prevalence of *Legionella* spp. in water systems of hospitals and hotels in
25 South Western Greece. *Int. J. Environ. Health Res.* **22**, 340–354 (2012); Tabatabaei, M., Hemati, Z., Moezzi, M. & Azimzadeh, N. Isolation and identification of *Legionella* spp. from different aquatic sources in South-West of Iran by molecular and culture methods. *Mol. Biol. Res. Commun.* **5**, 215–223 (2016)).

30 La necesidad de realizar un cultivo bacteriano para *Legionella* spp. puede presentar un problema en aquellas muestras donde se vea afectada su viabilidad, como por ejemplo, algunas muestras ambientales como son las muestras de aire, que, además pueden presentar una gran cantidad de carga bacteriana muy diversa y donde los patógenos como *Legionella pneumophila* están representados en una menor proporción siendo
35 difíciles de detectar (Fronczek, C. F. & Yoon, J. Y. Biosensors for Monitoring Airborne

Pathogens. *J. Lab. Autom.* **20**, 390–410 (2015); Núñez, A. *et al.* Monitoring of airborne biological particles in outdoor atmosphere. Part 1: Importance, variability and ratios. *Int. Microbiol.* **19**, 1–13 (2016)).

5 En vista de las consideraciones anteriores sobre el estado actual del campo técnico de la detección rápida y eficiente de bacterias patógenas, la presente invención propone un método que permite detectar la bacteria *Legionella pneumophila* en muestras no cultivables (o sin necesidad de ser cultivadas), con baja concentración de DNA (ácido desoxirribonucleico) y que procedan de la principal vía de transmisión de la bacteria: los
10 aerosoles.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un método rápido (entendiéndose rápido como un tiempo igual o menor de 24 h) de detección de *Legionella pneumophila* en muestras
15 ambientales y/o clínicas, preferentemente de aire, que está basado en la técnica de PCR y no necesita de la realización de un cultivo previo de la bacteria.

La base fundamental de este método es una PCR anidada a partir de DNA extraído directamente de las muestras, sin pasar por un paso inicial de cultivo microbiológico.

20

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

La presente invención trata así de un método de detección de *Legionella pneumophila* en una muestra, sin cultivo previo de dicha muestra, que comprende:

- 25
- llevar a cabo una primera Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) sobre la muestra, utilizando un par de cebadores (*primers*) que amplifican una región del gen 16S rRNA bacteriano y aumentan el número de copias de una región génica que contiene la secuencia de interés; y
 - llevar a cabo una segunda PCR anidada, utilizando un par de cebadores
30 específicos de la especie *Legionella pneumophila* que se unen a una región del gen 16S rRNA amplificada en la primera PCR. Uno de los dos cebadores es el denominado VR5 que comprende al menos la siguiente secuencia:

CCACTAATTATTTTCATATAACCAAC (SEQ ID No. 1), o una secuencia homóloga que difiera en no más de 5 sustituciones de nucleótidos.

35

Esta segunda reacción es la que detecta específicamente una región perteneciente a la especie bacteriana objetivo del presente método de invención.

5 A no ser que la presente memoria especifique lo contrario, todas las secuencias nucleotídicas descritas, tales como la secuencia de cebador anterior, se localizan entre los extremos 5'- y -3'. De este modo, por ejemplo, la secuencia de cebador CCACTAATTATTTTCATATAACCAAC (SEQ ID No. 1) puede ser igualmente escrita como 5'-CCACTAATTATTTTCATATAACCAAC-3' (SEQ ID No. 1).

10 El *primer* VR5 es complementario a las posiciones 831-856 del gen 16S rRNA y se corresponde con el *primer reverse* (o cebador antisentido), y ha sido específicamente diseñado para el método de la invención (aunque los últimos cinco nucleótidos coinciden con los iniciales de un cebador descrito por Jonas, D., Rosenbaum, A., Weyrich, S. & Bhakdi, S. Enzyme-Linked Immunoassay for Detection of PCR-Amplified DNA of
15 *Legionellae* in Bronchoalveolar Fluid. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 1247–1252 (1995). Preferentemente, el cebador VR5 consiste en la secuencia:

CCACTAATTATTTTCATATAACCAAC (SEQ ID No. 1), o una secuencia homóloga que difiera en no más de 5 sustituciones de nucleótidos.

20 En un caso particular, la secuencia homóloga de este cebador VR5 difiere en no más de 4 sustituciones de nucleótidos. En otro caso particular, la secuencia homóloga difiere en no más de 3 sustituciones de nucleótidos. En otro caso particular, la secuencia homóloga difiere en no más de 2 sustituciones de nucleótidos. En otro caso particular, la secuencia homóloga difiere en no más de 1 sustitución de nucleótidos.

25 En definitiva, el método de invención permite detectar la presencia de *Legionella pneumophila* a través de dos amplificaciones consecutivas o anidadas (en inglés, *nested*) de una región del gen 16S rRNA de la especie bacteriana de interés, *Legionella pneumophila*, en una muestra que puede ser ambiental y/o clínica.

30 Lo novedoso del método de invención es su alta sensibilidad en la detección de la bacteria objetivo, lo que permite poder aplicarlo preferentemente a muestras de aire que cuentan al menos con una baja concentración de DNA (ácido desoxirribonucleico) total de aproximadamente 10 pg/μL, equivalente a aproximadamente 12 pg de DNA por m³ de
35 aire. Como el origen de este material genético no procede de un único organismo sino

que resulta de la mezcla de muchas partículas biológicas (bacterias, hongos, polen, arqueas, etc.) que se encuentran presentes en el aire, la concentración de *Legionella pneumophila* es por tanto muy inferior. Por ello, este método de invención muestra una alta sensibilidad para la detección de *Legionella pneumophila*, eludiendo la presencia del
5 resto de partículas biológicas en la muestra de análisis.

De este modo, en una realización preferida, el método se aplica en una muestra de aire. Así, esta realización preferida del método de invención se aplica en muestras de DNA procedente de partículas biológicas presentes en muestras medioambientales de aire, no
10 cultivables o que no hayan sido previamente cultivadas, pero que hayan sido obtenidas por ejemplo y de manera no exclusiva, con un captador de partículas como el “Burkard 7 Day Recording Volumetric Spore Sampler” (de Burkard Scientific) o con filtros de membrana (nitrocelulosa, teflón, PTFE o similares) mediante aspiración.

15 El método de esta invención también destaca por la rapidez con la que se puede llevar a cabo, porque una vez que se tiene extraído el DNA a analizar, las dos reacciones de PCR se pueden realizar en un solo día, incluyendo la visualización de los resultados obtenidos. Dicha visualización puede hacerse por técnicas habituales conocidas en el campo científico, como por ejemplo mediante el uso, no exclusivo, de agentes intercalantes
20 como por ejemplo, el bromuro de etidio o SyBr safe y, después, observarse a través de una lámpara de ultravioleta o un transiluminador. Todos estos elementos están disponibles y forman parte de muchos laboratorios.

La detección de *Legionella pneumophila* se realiza comparando con una muestra control
25 positiva y otra negativa. Estas muestras control pueden ser, aunque sin limitarse a ellas, DNA de una cepa bacteriana de la misma especie objetivo (para el control positivo) o de otra especie del mismo género de *Legionella* (para el control negativo).

Si en la segunda PCR, se consigue amplificación del tamaño de ~400 pb (pares de
30 bases), se puede considerar que la bacteria patógena *Legionella pneumophila* está presente en la muestra analizada.

Este método de invención no necesita que el amplicón obtenido en la segunda reacción de PCR sea secuenciado, debido a la especificidad del método. No obstante, en una
35 realización preferida es recomendable purificar el DNA de dicho amplicón (por ejemplo,

con un Kit de purificación comercial, siguiendo las instrucciones del fabricante) y secuenciarlo por el método de “Sanger”. La secuencia obtenida, si se analiza con la herramienta *Blastn* (*Basic Local Alignment Search Tool of Nucleotide*) del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), confirma el resultado de la presencia de *Legionella pneumophila* en la muestra.

De manera preferida, el par de cebadores de la primera PCR está compuesto por dos cebadores universales 5F y 907R (Lane, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons: New York, NY. pp. 115-175 (1991)), presentando dichos cebadores la siguiente secuencia:

- 5F: TGGAGATTTGATCCTGGCTCAG (SEQ ID No. 2), o una secuencia homóloga; y
- 907R: CCGTCAATTCCTTTGAGTTT (SEQ ID No. 3), o una secuencia homóloga.

De forma más preferida, estos dos cebadores amplifican una región de aproximadamente 900 pb del gen 16S rRNA bacteriano.

De manera también preferida, en la segunda PCR, el cebador que se utiliza junto al cebador VR5, es un cebador que se denomina VR3, también específico de la especie *Legionella pneumophila*, que comprende al menos la siguiente secuencia:

GGGTTGATAGGTTAAGAGCTGATTAAC (SEQ ID No. 4), o una secuencia homóloga que difiera en no más de 5 sustituciones de nucleótidos.

En una realización preferida, el cebador VR3 consiste en la secuencia:

GGGTTGATAGGTTAAGAGCTGATTAAC (SEQ ID No. 4), o una secuencia homóloga que difiera en no más de 5 sustituciones de nucleótidos.

En un caso particular, la secuencia homóloga del cebador VR3 difiere en no más de 4 sustituciones de nucleótidos. En otro caso particular, la secuencia homóloga difiere en no más de 3 sustituciones de nucleótidos. En otro caso particular, la secuencia homóloga difiere en no más de 2 sustituciones de nucleótidos. En otro caso particular, la secuencia homóloga difiere en no más de 1 sustitución de nucleótidos.

Así, en este caso particular de la invención, la segunda PCR se lleva a cabo con dos cebadores que se unen a una región amplificada que corresponde a las regiones hipervariables V3 y V5 del gen 16S rRNA. En este caso particular, el fragmento que amplifica este segundo par de cebadores tiene 424 pb. El *primer* VR3 está posicionado inicialmente en la base 439 y llegar hasta la 477 y se corresponde con el *primer forward* (o cebador sentido) de la reacción. Su secuencia al completo o con una diferencia de uno o dos nucleótidos ha sido anteriormente descrita (ES2395798A1, CN105219847A, US2007042422A1, CN105255876A, Jonas, D., Rosenbaum, A., Weyrich, S. & Bhakdi, S. Enzyme-Linked Immunoassay for Detection of PCR-Amplified DNA of Legionellae in Bronchoalveolar Fluid. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 1247–1252 (1995)).

En la realización más preferida del método de detección de *Legionella pneumophila*, este método comprende:

- 15 - llevar a cabo una primera Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) sobre la muestra, mediante un par de cebadores (*primers*) universales 5F y 907R (Lane, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons: New York, NY. pp. 115-175 (1991)), para amplificar una región de aproximadamente 900 pb del gen 16S rRNA bacteriano y aumentar el número de copias de una región génica que contiene la secuencia de interés, dichos cebadores presentan la siguiente secuencia:
 - 5F: TGGAGATTTGATCCTGGCTCAG (SEQ ID No. 2); y
 - 907R: CCGTCAATTCCTTTGAGTTT (SEQ ID No. 3); y
- 25 - llevar a cabo una segunda PCR anidada, mediante un par de cebadores denominados VR3 y VR5 específicos de la especie *Legionella pneumophila*, que se unen a una región amplificada en la primera PCR y que corresponden a las regiones hipervariables V3 y V5 del gen 16S rRNA, dichos cebadores comprendiendo al menos la siguiente secuencia:
 - 30 ○ GGGTTGATAGGTTAAGAGCTGATTAAC (SEQ ID No. 4), o una secuencia homóloga con cualquier sustitución en la secuencia descrita de 5 bases o menos en cualquier posición, independientemente unas de otras;
 - CCACTAATTATTTTCATATAACCAAC (SEQ ID No. 1), o una secuencia homóloga con cualquier sustitución en la secuencia descrita de 5 bases o
 - 35 menos en cualquier posición, independientemente unas de otras.

En un caso preferido, el kit comprende un cebador VR5 que consiste específicamente en la secuencia:

CCACTAATTATTTTCATATAACCAAC (SEQ ID No. 1), o una secuencia homóloga que difiera en no más de 5 sustituciones de nucleótidos.

5

Preferentemente, este kit es para la detección de la *Legionella pneumophila*.

En una realización particular del kit, este comprende al menos un par de cebadores, donde además del cebador VR5 también comprende el cebador VR3 antes descrito, que amplifican las regiones hipervariables del gen 16S rRNA: V3-V5.

10

El término "bacteria patógena" se refiere a aquella bacteria que puede provocar una enfermedad en un sujeto, preferentemente humano. Esta invención está dirigida concretamente a la bacteria patógena *Legionella pneumophila*.

15

Se entiende por *Legionella pneumophila* una bacteria del género *Legionella* que en situaciones naturales vive como parásita en amebas u otros protozoos ciliados de medios acuáticos (Fields, B. S. The molecular ecology of legionellae. *Trends Microbiol.* **4**, 286–290 (1996)), resiste a un amplio rango de temperaturas (20-50 °C) (Katz, S. M. & Hammel, J. M. The effect of drying, heat, and pH on the survival of *Legionella pneumophila*. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **17**, 150–156 (1987)) y es capaz de causar infección en un organismo vivo ocasionándole la fiebre de Pontiac, o incluso, la legionelosis.

20

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

25

30

El término "muestra" se refiere a cualquier tipo de muestra sólida, gaseosa, líquida o en forma de aerosol. El término "muestra de aire" se refiere a cualquier muestra de aire, como por ejemplo, aire de una zona urbana, zona rural o incluso del interior de un edificio. Preferiblemente es una muestra de aire que transporta gotas de agua y que es recolectada en el exterior donde puede ser respirada por cualquier humano. El método de

35

la invención es por lo tanto útil para controlar la calidad de una muestra de aire, es decir, útil para conocer si una muestra de aire contiene bacterias patógenas como *Legionella pneumophila*.

- 5 El término “aerosol” es un conjunto de partículas microscópicas, sólidas o líquidas, que se encuentran suspendidas en un gas. En el contexto de la presente invención, un aerosol es una partícula líquida, normalmente de agua, que contiene a su vez a la bacteria patógena, y que es transportada por suspensión en el aire.
- 10 En el método de invención se detecta la presencia del gen 16S rRNA mediante una PCR inicial seguida (o acoplada) a otra PCR secundaria. Proceso que también se conoce como PCR anidada. La detección se realiza, preferentemente, del DNA de dicho gen.

15 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 (o *primers*) que se ubican dentro de la primera secuencia amplificada.

20 El término “cebador” (o *primer*) se refiere a una secuencia de nucleótidos de tamaño variable que es complementaria a un fragmento de la secuencia de un gen (el DNA molde) y que se utiliza en una reacción de PCR para amplificar una secuencia nucleotídica.

25 EL gen 16S rRNA (también llamado 16S, 16S ribosómico, r16S) es un componente de la subunidad 30S del ribosoma de procariontas. El gen 16S rRNA en la presente invención se refiere al 16S rRNA de *Legionella* spp.

30 En el presente método de invención se proporcionan ejemplos de cebadores que amplifican el gen descrito en la invención. Las secuencias nucleotídicas de estos cebadores descritos en la presente invención pueden ser susceptibles de variaciones. Estas variaciones podrían utilizarse para detectar otro/s microorganismo/s de interés para la salud humana, presente/s en una muestra medioambiental, preferiblemente de aire. Por este motivo, una realización preferida del método de la invención se refiere a la
35 detección de bacterias patógenas. En el ámbito de la presente invención, cuando se

define un cebador por su secuencia de nucleótidos caracterizante, la definición incluye también secuencias homólogas con un cierto grado de variabilidad con respecto a la secuencia definida, normalmente que no difieran en más de 5 sustituciones de nucleótidos.

5

El término de “región hipervariable” se refiere a cualquiera de las 9 secciones génicas del gen 16S rRNA que poseen las bacterias. Se encuentran distribuidas entre otras partes del gen altamente conservadas en las diferentes especies bacterianas que existen. Estas regiones hipervariables permiten distinguir a una especie bacteriana de otra, siempre que sus genomas estén secuenciados. En la presente invención se utilizan las regiones hipervariables comprendidas entre V3 y V5 para distinguir a *Legionella pneumophila* de otras bacterias.

El término “amplicón” (o banda) se refiere al producto amplificado de una reacción de PCR que tiene el tamaño esperado de pares de bases, de acuerdo a las zonas génicas a las que se unen los cebadores.

El término “pares de bases” (pb) se refiere a la unión que se produce entre dos nucleótidos que componen un ácido nucleico, mediante enlaces de hidrógeno.

20

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Representación esquemática y no limitante de los pasos utilizados para detectar *Legionella pneumophila* de acuerdo con el método de la presente invención. Dos reacciones de PCR (1 y 2) consecutivas o anidadas son la base del método de invención: la primera (1) está diseñada para amplificar una región parcial del gen 16S rRNA (4) a partir de muestras de DNA obtenidas del aire exterior (3), mientras que la segunda (2) usa cebadores o *primers* específicos para detectar *Legionella pneumophila* (5) a partir del DNA amplificado en la primera PCR, de los cuales, el *primer* VR5 se ha diseñado específicamente en este método de invención.

Figura 2: Detección de *Legionella pneumophila* en el DNA extraído de muestras de aire urbano, de acuerdo con el Ejemplo de realización. Bandas de DNA amplificado del gen 16S rRNA en la sección comprendida entre las regiones hipervariables V3 y V5. Se utilizó la pareja de cebadores “VR” (VR3 y VR5) para detectar la presencia de *Legionella*

35

pneumophila pero también la pareja de cebadores “LEG” (LEG 448 y LEG 858) que permite determinar la presencia o ausencia del género *Legionella* spp. Las bandas específicas de *Legionella pneumophila* aparecen en la muestra control positiva de *Legionella pneumophila* (*L.pn*) y en dos de las muestras recolectadas (No. 1 y 2). En estas muestras, también aparece la banda del género *Legionella* spp., al igual que en el control con *Legionella jordanis* (*L.jo*) y la muestra recolectada No. 3. Por el contrario, no se observa amplificación empleando las parejas de cebadores “LEG” o “VR” en las muestras con ausencia de *Legionella* spp. como el control con la bacteria *Escherichia coli* (*E.co.*).

En ocasiones aparecen restos de la banda de ~900 pb, resultante de la primera PCR del método de invención donde se utilizan los cebadores universales 5F y 907R. M, marcador de peso molecular (de 100 pb).

Ejemplos

Ejemplo 1: Detección de *Legionella pneumophila* en muestras de aire mediante el método de la presente invención.

El siguiente ejemplo ilustra una aplicación real del método de invención llevada a cabo con el método de la presente invención.

Materiales:

- Muestras a estudio:

Se han utilizado 12 muestras de aire recogidas durante el período de un año, abarcando las cuatro estaciones anuales: primavera, verano, otoño e invierno.

Las muestras fueron recogidas siguiendo el protocolo descrito en Núñez y col. (Núñez, A. *et al.* Validation of the Hirst-type spore trap for simultaneous monitoring of prokaryotic and eukaryotic biodiversities in urban air samples by next-generation sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**, e00472-17 (2017)) y después se utilizó para secuenciar por secuenciación masiva el gen 16S rRNA (regiones V3-V4) usando una plataforma Illumina MiSeq (2x300 *reads*). Dicha secuenciación detectó las 12 muestras con presencia de *Legionella* spp. que se han utilizado en este ensayo.

La Tabla 1 muestra la concentración de DNA de cada una de estas muestras, reflejando la pequeña cantidad de la que se parte para su posterior detección de *Legionella*

pneumophila. La concentración de DNA de las muestras de aire fue determinada por un ensayo PicoGreen.

Tabla 1: Información de las muestras utilizadas en el ejemplo de realización del método de invención

5

Muestras	Estación del año de muestreo	Concentración (ng/μL) ^a
1	Invierno	0,01
2	Primavera	0,12
3	Primavera	0,07
4	Verano	0,27
5	Otoño	0,12
6	Otoño	0,03
7	Otoño	0,03
8	Otoño	0,05
9	Otoño	0,04
10	Invierno	0,28
11	Primavera	0,26
12	Primavera	0,17

- Muestras Control:

Como muestras control, se utilizó el DNA extraído de la bacteria *Escherichia coli* CECT, 516 (*Spanish Type Culture Collection*), y el DNA genómico de las cepas comerciales *Legionella pneumophila* DMSZ, 7513 (*German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*; MinervaBiolabs), y *Legionella jordanis* NCTC, 11533 (*National Collection of Type Cultures*; MinervaBiolabs).

- Cebadores utilizados en la PCR anidada del método de invención:

Se utilizaron dos pares de cebadores (o *primers*), cada uno para una PCR. El primero está compuesto por dos *primers* universales (5F, TGGAGATTTGATCCTGGCTCAG (SEQ ID No. 2) y 907R, CCGTCAATTCCTTTGAGTTT (SEQ ID No. 3)) (Lane, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons: New York, NY. pp. 115-175 (1991)) y se utilizan para llevar a cabo la primera reacción de PCR amplificando un fragmento de 900 pb en una región del gen 16S rRNA. El segundo par de cebadores se utiliza para detectar específicamente la especie *Legionella pneumophila*. Estos *primers*, denominados como "VR" son: VR3: GGGTTGATAGGTTAAGAGCTGATTAAC (SEQ ID No. 4) posicionado inicialmente en la base 439 y llegando hasta la 477 y el *primer* VR5: CCACTAATTATTTTCATATAACCAAC

(SEQ ID No. 1), complementario a las posiciones 831-856. El fragmento que amplifica este segundo par de cebadores tiene 424 pb.

Los dos pares de cebadores se adquirieron a Roche Diagnostics S.L.

5

Métodos:

Primera PCR: el aumento del número de copias de la región génica que se usa como molde para la segunda PCR, se realizó añadiendo (para un volumen final de reacción de 25 µL, aunque se puede adaptar a otros volúmenes) 2 µL (20-560 pg) del DNA extraído de las muestras de aire y 1,25 U de Taq polimerasa. La reacción se realizó siguiendo los protocolos conocidos por cualquier experto/a en la materia. La Taq polimerasa, tampón y dNTPs (mezcla de desoxirribonucleósidos trifosfato) eran de Promega (USA).

El tubo con todos los elementos de la mezcla final de PCR se introdujo en el termociclador para llevar a cabo la primera amplificación en las siguientes condiciones:

- Paso inicial de calentamiento a 95 °C, 5 minutos.
- Segundo paso que consta de 35 ciclos que consisten, cada uno, de:
 - Desnaturalización a 95 °C, 30 segundos.
 - Anillamiento o *Annealing* a 55 °C, 1 minuto.
 - Extensión a 72 °C, 1 minuto.
- Extensión final 72 °C, 10 minutos.

Segunda PCR: se tomaron 2 µL del producto de amplificación de la primera PCR para usarlos como molde en esta segunda reacción. A la mezcla de la reacción se añadieron 1,25 U de Taq polimerasa y el resto de componentes, siguiendo los protocolos conocidos por cualquier experto/a en la materia. La Taq polimerasa, tampón y dNTPs eran de Promega (USA).

El tubo con todos los elementos de la mezcla final de PCR se introdujo en el termociclador para llevar a cabo la segunda amplificación en las siguientes condiciones:

- Paso inicial de calentamiento a 95 °C, 5 minutos.
- Segundo paso que consta de 35 ciclos que consisten, cada uno, de:
 - Desnaturalización a 95 °C, 30 segundos.
 - Anillamiento o *Annealing* a 55 °C, 1 minuto.
 - Extensión a 72 °C, 1 minuto.

- Extensión final 72 °C, 10 minutos.

Visualización de los resultados:

5 Para la visualización de los resultados, se utilizó gel de agarosa al 1,5% con bromuro de etidio o SyBr safe. Se cargaron 15 µL del producto de PCR junto con 5 µL de tampón de carga, en cada pocillo del gel. Del marcador BenchTop de 100-pb (Promega) se cargaron 6 µL junto con 6 µL de tampón de carga. La electroforesis se realizó a 100 V durante 50 minutos. Finalmente, los resultados se visualizaron en un transiluminador.

Dichos resultados se muestran en la Figura 2.

10

En todos los controles utilizados, al igual que en todas las muestras de aire recolectadas se obtuvo una amplificación de 900 pb en la primera PCR. Sin embargo, en la segunda PCR, se obtuvo amplificación de 424 pb en el control positivo (*Legionella pneumophila* DMSZ, 7513) y en 7 de las 12 muestras analizadas.

15

Las 5 muestras restantes eran positivas para *Legionella* spp., pero no para la especie *L. pneumophila*. Esto se comprobó con una tercera reacción de PCR en la que se emplearon *primers* que previamente en la literatura ya se habían descrito como “LEG” y utilizado para detectar este género bacteriano (Yamamoto, H., Hashimoto, Y. & Ezaki, T. Comparison of detection methods for *Legionella* species in environmental water by colony isolation, fluorescent antibody staining, and polymerase chain reaction. *Immunol.* **37**, 617–622 (1993)). La secuencia nucleotídica de cada uno de los *primers* LEG es:

20

- LEG 448 (*Primer forward*): GAGGGTTGATAGGTTAAGAGC (SEQ ID No. 5).
- LEG 858 (*Primer reverse*): GTCAACTTATCGCGTTTGCT (SEQ ID No. 6).

25

Las 12 muestras resultaron ser positivas para *Legionella* spp. Esta comprobación extra permite definir el método de invención como muy específico para *Legionella pneumophila*.

CCACTAATTATTTTCATATAACCAAC (SEQ ID No. 1), o una secuencia homóloga que difiera en no más de 5 sustituciones de nucleótidos.

7. Uso del cebador descrito en una cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6 en una PCR para la detección de una bacteria patógena, que es *Legionella pneumophila*.

8. El uso de la reivindicación anterior, donde la PCR es una segunda PCR anidada en un método de detección que comprende dos PCR de amplificación del gen 16S rRNA bacteriano.

10

9. Un kit para la detección de una bacteria patógena que comprende una pluralidad de cebadores para PCR, siendo uno de estos cebadores un cebador que comprende al menos la siguiente secuencia:

CCACTAATTATTTTCATATAACCAAC (SEQ ID No. 1), o una secuencia homóloga que difiera en no más de 5 sustituciones de nucleótidos.

15

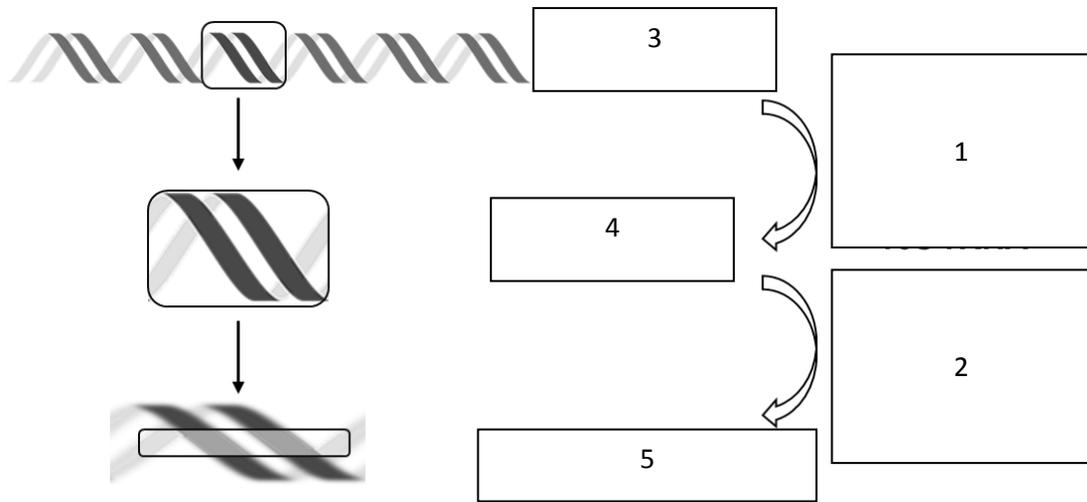


Fig. 1

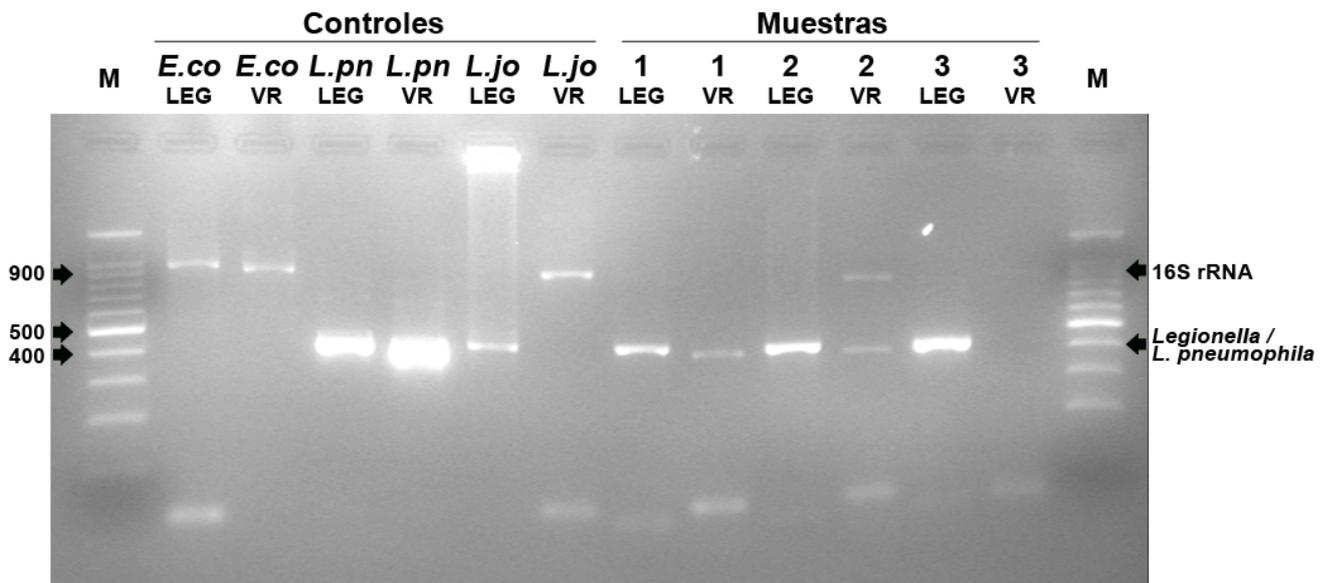


Fig. 2



②① N.º solicitud: 201830830

②② Fecha de presentación de la solicitud: 16.08.2018

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/689** (2018.01)
C12Q1/686 (2018.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	REISCHL, U. et al. Direct detection and differentiation of <i>Legionella</i> spp. and <i>Legionella pneumophila</i> in clinical specimens by dual-color real-time PCR and melting curve analysis. Journal of Clinical Microbiology. Octubre 2002, Vol. 40, N° 10, páginas 3814 - 3817, ISSN 0095-1137 (impreso), <DOI:10.1128/JCM.40.10.3814-3817.2002>. Todo el documento.	1-9
X	ES 2395798 A1 (UNIV ZARAGOZA) 15/02/2013, ejemplo 1.2; figura 2B; SEQ ID NO: 28, 29.	1-9
X	ZHAN, X.-Y. et al. Two-step scheme for rapid identification and differentiation of <i>Legionella pneumophila</i> and non- <i>Legionella pneumophila</i> species. Journal of Clinical Microbiology. Febrero 2010, Vol. 48, N° 2, páginas 433 - 439, ISSN 1098-660X (electrónico), <DOI: 10.1128/JCM.01778-09>. Especialmente páginas 433-434; tabla 1; apartado "Discussion".	6, 7
Y		1-5, 8, 9
Y	HUANG, W.-C. et al. Approach to determine the diversity of <i>Legionella</i> species by nested PCR-DGGE in aquatic environments. PLoS One. Febrero 2017, Vol. 12, N° 2, N° artículo e0170992, ISSN 1932-6203 (impreso), ISSN 1932-6203(electrónico), <DOI: 10.1371/journal.pone.0170992>. Especialmente páginas 1-4, 7-8.	1-5, 8, 9
A		6, 7
X	US 7553626 (OH, J.-Y. et al) 30/06/2009, Columna 1, línea 60 - columna 2; columna 3, líneas 29 – 35; SEQ ID NO 11	7
A		1, 2, 4-6, 8, 9
X	US 2007/0042422 A1 (STUBER, F. et al.) 22/02/2007, ejemplo 10; SEQ ID NO: 22.	7
A		1, 2, 4-6, 8, 9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
15.02.2019

Examinador
E. Relañó Reyes

Página
1/3



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201830830

22 Fecha de presentación de la solicitud: 16.08.2018

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: **C12Q1/689** (2018.01)
C12Q1/686 (2018.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MIRZAEI, S. A. et al. Detection of <i>Legionella</i> spp. by a nested-PCR assay in air samples of a wastewater treatment plant and downwind distances in Isfahan. <i>Advanced Biomedical Research</i> . 2015, Vol. 4, N.º art. 48, ISSN 2277-9175 (impreso), <DOI:10.4103/2277-9175.151540>. Todo el documento.	1-3
A	WALSER, S. M. et al. Detection of <i>Legionella</i> -contaminated aerosols in the vicinity of a bio-trickling filter of a breeding sow facility - A pilot study. <i>The Science of the Total Environment</i> . Enero 2017, Vol. 575, páginas 1197 - 1202, ISSN 1879-1026 (electrónico), <DOI:10.1016/j.scitotenv.2016.09.191>. Especialmente apartados 2.4, 3.2, 4	1-3
A	US 5571674 A (HOSHINA, S. et al.) 05/11/1996, ejemplo 2, ejemplo 3, SEQ ID NO: 6.	1, 4, 9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
15.02.2019

Examinador
E. Relaño Reyes

Página
2/3

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, EMBASE, MEDLINE, INSPEC, COMPDX, NPL, XPESP, XPOAC, EM_REL_PRO, EM_REL_SYN, NRNL1