

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 399**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6893 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.05.2016 PCT/IB2016/052655**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2016 WO16181297**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.05.2016 E 16730486 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 3294909**

54 Título: **Procedimiento de detección y/o identificación de protozoos del género Babesia, un cebador para su uso en el presente procedimiento y un kit para su uso en procedimientos de diagnóstico de babesiosis sintomática y asintomática**

30 Prioridad:

12.05.2015 PL 41230915

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

30.12.2019

73 Titular/es:

**NARODOWY INSTYTUT ZDROWIA
PUBLICZNEGO - PANSTWOWY ZAKLAD HIGIENY
(100.0%)
Ul. Chocimska 24
00-791 Warszawa, PL**

72 Inventor/es:

**ROZEJ-BIELICKA, WIOLETTA;
MASNY, ALEKSANDER y
GOLAB, ELZBIETA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 736 399 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de detección y/o identificación de protozoos del género *Babesia*, un cebador para su uso en el presente procedimiento y un kit para su uso en procedimientos de diagnóstico de babesiosis sintomática y asintomática

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento de detección y/o identificación de protozoos del género *Babesia*, que incluye en particular *B. microti*, *B. venatorum*, *B. canis* y/o *B. divergens* en muestras que contienen ácidos nucleicos, particularmente en un material genético aislado de seres humanos y animales, particularmente utilizando técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, especialmente la PCR y PCR en tiempo real, especialmente en un formato de tubo único. El objetivo de la invención es también un cebador para su uso en el procedimiento de detección
- 10 y/o identificación de protozoos del género *Babesia* y un kit para su uso en procedimientos de diagnóstico de una infección por *Babesia* o un estado portador de *Babesia*, para la detección y/o identificación de protozoos del género *Babesia*.

Técnica antecedente

- 15 Las babesias son pequeños parásitos protozoarios de los glóbulos rojos sanguíneos de seres humanos y animales. La enfermedad causada por la infección con *Babesia*, llamada babesiosis (o más ampliamente piroplasmosis), es un serio problema médico y veterinario. Hasta la fecha, se han encontrado más de 100 especies distintas o cepas de estos protozoos y se han descrito por todo el mundo. Los casos humanos son causados por varias especies de *Babesia* distintas, de las cuales los agentes causales de las infecciones registrados más frecuentemente eran: *B. microti*, *B. divergens* y *B. venatorum* este último también se conoce como sp. EU1 (ido: 10.1016/j.ijppaw.2012.11.003).
- 20 Mientras que en los perros la enfermedad está causada por 3 especies de *Babesia* y en Polonia más frecuentemente por *B. canis* (ido: 10.16/j.vet-par.2011.04.023).

- Los protozoos del género *Babesia* son organismos que necesitan dos huéspedes en su ciclo vital; un huésped intermediario - animales y seres humanos, y un huésped definitivo - una garrapata, más frecuentemente un Ixodes. La infección con una especie particular de *Babesia* depende de la región geográfica que se relaciona con la existencia
- 25 de vectores y huéspedes intermediarios apropiados (ido: 10.1186/1471-2334-13-99). Los datos epidemiológicos indican que la expansión geográfica y el crecimiento constante del número de casos de babesiosis. Las infecciones por *Babesia* que se diseminan por la corriente sanguínea mediante transfusiones (Kogut y col. Emerg Infect Dis. 2005;11(3):476-8) y trasplante de órganos (Slovut y col. Transplantation. 1996;62(4):537-9) son un problema creciente. También se han descrito varios casos de babesiosis innata (Yeruham y col. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 2003;50(2):60-2).
- 30

- La base de diagnóstico de las infecciones causadas por protozoos del género *Babesia* son los exámenes microscópicos de frotis de sangre: frotis grueso y frotis delgado. Debido a las limitaciones de los procedimientos microscópicos en el diagnóstico de infecciones causadas por protozoos del género *Babesia*, se aplican técnicas
- 35 adicionales de exámenes de laboratorio, tal como el examen serológico de existencia de anticuerpos IgG y/o IgM específicos mediante: inmunofluorescencia indirecta (IFA), ELISA, inmunotransferencia, inmunocromatografía, estos procedimientos sin embargo tienen ciertas limitaciones. La mayoría de los ensayos de IFA y ELISA disponibles se adaptan para la detección de infecciones causadas por *B. microti*, y no detectan infecciones causadas por las cepas dominantes en Europa, es decir, *B. divergens*, *B. tipo divergens* y *B. venatorum*. En pacientes con infecciones bacterianas y víricas, autoinmunitarias, enfermedades del tejido conjuntivo o malaria, se producen frecuentemente resultados falsos positivos (ido: 10.1115/2009/984568). Los ensayos serológicos no se recomiendan como ensayo
- 40 único en el diagnóstico de babesiosis, ni para la detección de niveles muy bajos de anticuerpo, ya que los ensayos pueden dar resultados falsos negativos en los ensayos de estadios tempranos de la enfermedad, en pacientes después de la esplenectomía, con inmunosupresión o que padecen SIDA (Schaarschmidt y col. Schweiz Arch Tierheilkd. 2006;148(12):633-40).

- 45 En los laboratorios de referencia, para la detección de infección de *Babesia* se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que es aprox. 10 veces más sensible en la detección de la fase aguda de babesiosis que el examen microscópico de frotis de sangre (ido: 10.1128/JCM.05848-11). En el mercado, están disponibles la PCR y la PCR en tiempo real, que se diseñaron principalmente para atender las necesidades de laboratorios diagnósticos veterinarios (Espy y col. Clin Microbiol Rev. 2006;19(1):165-256) pero habitualmente son específicos para una cepa o genotipo
- 50 seleccionado (Persing y col. J Clin Microbiol. 1992;30(8):2097-103; Kim y col. Am J Trop Med Hyg. 2007;77(5):837-41), tienen limitaciones para su uso en estudios ambientales (Herwaldt y col. Emerg Infect Dis. 2003;9(8):942-8), necesita la secuenciación o necesita la digestión adicional con enzimas de restricción para la determinación de la especie de *Babesia* (Bonnet y col. Parasitology. 2007;134(2):197-207).

Divulgación de la invención

- 55 La esencia de la invención es la detección y/o identificación y/o diferenciación de protozoos del género *Babesia*, en una única reacción o en una serie de reacciones separadas, basándose en la amplificación de ácidos nucleicos con el uso de cebadores específicos, diseñados basándose en la secuencia de genes de *Babesia* que codifican la subunidad ribosómica pequeña (ARNr 18S) depositado en la base de datos del GenBank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>): utilizando nuevos cebadores de acuerdo con la invención, es decir:

cebador en sentido **Cebador 1** (TGACCTAAACCTCACCAGAGTAAC), SEQ ID NO: 1,
 cebador en sentido **Cebador 2** (GAATCTAAACCTTCCCAGAGTATC), SEQ ID NO: 2,
 cebador antisentido **Cebador 3** (GCTTTCGCAGTAGTTCGTCTTTA), SEQ ID NO: 3.

- 5 Los números de identificación de las secuencias de entrada (GenBank ID), las posiciones de los cebadores y el tamaño del amplicón obtenido, junto con su uso se presentan en el sumario posterior, en la Tabla 1:

Tabla 1: Cebadores para la detección y diferenciación de protozoos del género *Babesia*.

Especies patógenas ID del GenBank	Posición del cebador			Tamaño del amplicón obtenido (pb)
	Cebador 1	Cebador 2	Cebador 3	
<i>B. divergens</i> AY144688	35-59	-	393-415	381
<i>B. microti</i> JQ711225	-	21-45	406-428	407
<i>B. venatorum</i> JX040642	22-46	-	380-402	381
<i>B. canis</i> AY072926	481-503	-	839-861	381

- 10 Se descubrió inesperadamente que es posible detectar y/o identificar, preferentemente en tiempo real, protozoos de muchas especies distintas del género *Babesia*, incluyendo: *B. microti*, *B. venatorum* (= *Babesia* sp. EU1), *B. canis*, *B. divergens*, en muestras que contienen ácidos nucleicos con los procedimientos de acuerdo con la invención que implican una única reacción de amplificación de ácidos nucleicos utilizando dos, más preferentemente tres cebadores diseñados de acuerdo con la invención: Cebador 1, Cebador 2, Cebador 3. Como se determinó por los inventores, debido al riesgo de contaminación con un material genético de: *Plasmodium*, *Toxoplasma* o el huésped, con el fin de conseguir el resultado, que es para proporcionar la capacidad para detectar y/o identificar muchas especies distintas del género *Babesia*, utilizando una única reacción o amplificación de ácidos nucleicos, es necesario el uso de cebadores que se hibriden con precisión en los sitios indicados en la Tabla 1. Los inventores han demostrado que el desplazamiento del sitio de unión del cebador incluso en una única posición da como resultado una disminución de la eficacia de la reacción, por ejemplo, el desplazamiento del Cebador 3 un único nucleótido en dirección 3' reduce la estabilidad del extremo 3', da lugar a la generación de interacciones del cebador tipo dimérico (ΔG -6,09 kcal/mol) y también a la formación de una estructura en horquilla (la llamada horquilla, ΔG -1,59 kcal/mol), impidiendo de esta manera las interacciones apropiadas entre los cebadores y la matriz de ADN. El procedimiento de la invención hace posible la detección y/o identificación de protozoos de muchas especies diferentes del género *Babesia* para el diagnóstico de la babesiosis sintomática, así como de la babesiosis asintomática.
- 15 El objetivo de la invención es, por lo tanto, un procedimiento de detección y/o identificación de protozoos del género *Babesia*, que incluyen en particular *B. microti*, *B. venatorum*, *B. canis* y/o *B. divergens*, en muestras que contengan ácidos nucleicos, que implica las siguientes etapas de

- 20 a) amplificación de ácidos nucleicos en una reacción, utilizando los cebadores: Cebador 1 con una secuencia SEQ ID NO: 1 y/o el Cebador 2 con una secuencia SEQ ID NO: 2 y el Cebador 3 con una secuencia SEQ ID NO: 3;
- 25 b) detección y opcionalmente
- 30 c) identificación.

La detección se lleva a cabo con el objetivo de asegurarse de que se produjo la amplificación de los ácidos nucleicos y con el objetivo de analizar las propiedades, particularmente físicas de los productos de amplificación obtenidos.

- 35 La identificación se lleva a cabo basándose en análisis comparativos de los datos, de los ácidos nucleicos amplificados y no amplificados, obtenidos por el estudio de las muestras con los resultados obtenidos para los ácidos nucleicos amplificados y no amplificados de la muestra de control (particularmente la muestra de control positiva), ajustado al procedimiento de detección en particular.

- 40 Preferentemente, la identificación se lleva a cabo basándose en el análisis comparativo de los datos obtenidos del estudio de muestras y los resultados convencionalizados obtenidos de las muestras de control para distintas especies del ADN de control, particularmente para *B. microti* o *B. venatorum* o *B. canis*, o *B. divergens*. Esto permite acelerar el procedimiento de detección y/o identificación de los protozoos del género *Babesia*, permite obtener resultados fiables y da lugar a un uso prudente de reactivos, por lo tanto, tiene un aspecto económico.

- 45 Preferentemente, la identificación se lleva a cabo basándose en el análisis comparativo de curvas obtenidas de una muestra desconocida y la curva obtenida por la muestra de control que contienen por ejemplo 10 o 25 o 50 ng/ μ l de ADN de control de *B. microti* o *B. venatorum* o *B. canis*, o *B. divergens* mediante el análisis de las curvas de fusión en alta resolución (HRM) de los productos de amplificación obtenidos.

En una realización preferida, los tres cebadores se utilizan simultáneamente, el Cebador 1 con una secuencia SEQ ID NO: 1, el Cebador 2 con una secuencia SEQ ID NO: 2 y el Cebador 3 con una secuencia SEQ ID NO: 3.

En otra realización, se utilizan los cebadores Cebador 1 con una secuencia SEQ ID NO: 1 y el Cebador 3 con una secuencia SEQ ID NO: 3.

- 5 En otra realización, se utilizan el Cebador 2 con una secuencia SEQ ID NO: 2 y el Cebador 3 con una secuencia SEQ ID NO: 3.

En otra realización más, aparte de los cebadores Cebador 1 con una secuencia SEQ ID NO: 1, el Cebador 2 con una secuencia SEQ ID NO: 2 y el Cebador 3 con una secuencia SEQ ID NO: 3, se utilizan adicionalmente uno o más cebadores.

- 10 Preferentemente, en la etapa de amplificación del ácido nucleico, la hibridación del cebador se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de 55-63 °C.

Preferentemente, la etapa de amplificación de ácido nucleico se lleva a cabo utilizando un procedimiento de PCR clásico, una PCR múltiple, una PCR en tiempo real.

- 15 Preferentemente, en el procedimiento de detección y/o identificación de los protozoos del género *Babesia* la etapa de detección se lleva a cabo utilizando técnicas seleccionadas de entre el análisis de las propiedades físicas de los productos de amplificación obtenidos, preferentemente el análisis de curvas de fusión de los productos obtenidos en alta resolución (HRM), técnicas de detección utilizando sondas moleculares, secuenciación del producto de amplificación, análisis del tamaño y/o peso de los productos de amplificación, diferencias en las migración de conformeros de los productos de amplificación, amplificación y/o análisis de polimorfismos del sitio de restricción.

- 20 Preferentemente, en el procedimiento de detección y/o identificación de protozoos del género *Babesia*, la etapa de identificación se lleva a cabo basándose en el análisis comparativo de los datos obtenidos de las muestras de estudio y los resultados obtenidos de las muestras de control ajustadas a un procedimiento de detección en particular.

El procedimiento más preferido de detección y/o identificación de protozoos del género *Babesia*, tanto en la etapa de amplificación como en la etapa de detección se lleva a cabo en un único baso ("tubo único").

- 25 En una realización particularmente preferible del procedimiento de detección y/o identificación de protozoos del género *Babesia*, se lleva a cabo la amplificación de los ácidos nucleicos mediante un procedimiento de PCR en tiempo real y la etapa de detección se lleva a cabo utilizando un análisis de la curva de fusión de los productos de amplificación, que se lleva a cabo a alta resolución (HRM), con una etapa de identificación simultánea.

- 30 Preferentemente, en el procedimiento de detección y/o identificación de protozoos del género *Babesia*, las muestras que contienen los ácidos nucleicos se obtuvieron de tejidos de seres humanos y/o animales, incluyendo arácnidos, preferentemente, de la sangre de seres humanos y animales.

- 35 El procedimiento de detección y/o identificación de protozoos de acuerdo con la invención permite la detección de un material genético de muchas especies del género *Babesia* (incluyendo *B. canis*, *B. divergens*, *B. microti*, *B. venatorum*) utilizando distintos procedimientos basados en la PCR. En la bibliografía descrita y los ensayos disponibles en el mercado, que detectan protozoos del género *Babesia* basándose en técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, los cebadores empleados en la reacción definen estrictamente el tipo de PCR en la que se pueden utilizar. El procedimiento de amplificación de ADN de *Babesia* de acuerdo con la invención que utiliza los cebadores específicos de acuerdo con la invención, se caracteriza por la versatilidad, lo que significa que utilizando los cebadores: Cebador 1 y/o Cebador 2 y Cebador 3 es posible su uso en reacciones independientes o en forma de un kit para PCR múltiple.
- 40 El procedimiento de acuerdo con la invención permite el uso del mismo conjunto de cebadores de acuerdo con la invención en varios tipos de PCR: PCR clásica, PCR múltiple, PCR en tiempo real. Preferentemente, la reacción se lleva a cabo a una temperatura para la hibridación del cebador en el intervalo de 55-63 °C. La hibridación del cebador también se puede llevar a cabo en otros intervalos de temperatura.

- 45 En el procedimiento de acuerdo con la invención se obtienen amplicones, que se diferencian en tamaño desde aproximadamente 380 a aproximadamente 410 pares de bases, y/o en la secuencia de nucleótidos, dependiendo de la especie de *Babesia*. Preferentemente, las propiedades físicas de los productos de amplificación se investigan, particularmente la temperatura de fusión, utilizando un análisis de la curva de fusión.

- 50 La solución de acuerdo con la invención permite una identificación y/o detección del genotipo de *Babesia* más fácil que en el caso de los procedimientos de la técnica anterior, basándose en las diferencias de las propiedades físicas de los productos de la PCR, particularmente que se muestran en forma de curvas de fusión de ADN, en realizaciones preferidas en un formato de "tubo único" (la amplificación detección e identificación en un único vaso de reacción, en una reacción).

El procedimiento de detección y/o amplificación de protozoos de acuerdo con la invención también permite identificar el material genético de los protozoos del género *Babesia* secuenciando los productos de amplificación.

El procedimiento de acuerdo con la invención es aplicable al diagnóstico médico, diagnóstico veterinario, investigaciones epidemiológicas, e investigaciones ambientales.

5 El procedimiento de detección y/o amplificación de protozoos de acuerdo con la invención reduce el tiempo de ejecución de la detección y/o identificación de los protozoos del género *Babesia*. En una realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, el riesgo de contaminación de la muestra de estudio de ácido nucleico está reducido (reacción de tipo en un "único tubo").

El procedimiento de detección y/o identificación de protozoos de acuerdo con la invención permite reducir los costes del estudio, ya que reduce el consumo de reactivos, no necesita la secuenciación, no necesita la aplicación de enzimas de restricción.

10 El procedimiento de acuerdo con la invención permite detectar variantes genéticas de *Babesia* no descritas hasta ahora.

15 El procedimiento de acuerdo con la invención se puede adaptar para crear un ensayo diagnóstico comercial para laboratorios médicos. Dicho ensayo será aplicable en laboratorios, para la identificación de los casos de babesiosis, también será útil para el examen de los donantes de sangre y órganos en cuanto a infecciones de *Babesia* asintomáticas.

El procedimiento de acuerdo con la invención se puede adaptar para crear un ensayo diagnóstico comercial para laboratorios veterinarios.

El procedimiento de acuerdo con la invención se puede adaptar para crear un ensayo diagnóstico comercial que sea aplicable en investigaciones epidemiológicas y/o ambientales.

20 El procedimiento de detección y/o identificación de protozoos de acuerdo con la invención, al contrario que con los procedimientos conocidos anteriormente permite detectar infecciones con especies dominantes en Europa, es decir, *B. divergens*, *B. tipo divergens* y *B. venatorum* y no se limita a una cepa o genotipo seleccionado.

25 El uso del procedimiento de detección y/o identificación de protozoos de acuerdo con la invención permite evitar resultados falsos positivos y como resultado de un correcto diagnóstico del individuo evita un tratamiento innecesario y caro.

El uso del procedimiento de detección y/o identificación de protozoos de acuerdo con la invención permite evitar resultados falsos negativos y como resultado de un correcto diagnóstico el individuo infectado se somete al tratamiento necesario.

30 El uso del procedimiento de detección y/o identificación de protozoos de acuerdo con la invención debido al amplio espectro de especies de protozoos del género *Babesia* identificado de esta manera, se utiliza para el diagnóstico tanto de infecciones sintomáticas como asintomáticas causadas por los protozoos del género *Babesia*. Debido al amplio espectro identificado de especies de protozoos del género *Babesia* el procedimiento de detección y/o identificación de protozoos de acuerdo con la invención se utiliza preferentemente para el diagnóstico de infecciones sintomáticas y asintomáticas causadas por protozoos del género *Babesia* ya que proporciona una confirmación o exclusión de la
35 infección rápida y fiable, y como resultado tomar las medidas terapéuticas o preventivas adecuadas.

La presente invención también se refiere a un cebador para su uso en el procedimiento de detección y/o identificación de protozoos del género *Babesia*, que incluye en particular *B. microti*, *B. venatorum*, *B. canis* y/o *B. divergens*, en muestras que contiene ácidos nucleicos de acuerdo con la invención, teniendo el cebador la secuencia de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

40 La presente invención también se refiere a un kit para su uso en los procedimientos de diagnóstico de infecciones por *Babesia* y el estado portador de babesiosis, que se utiliza para detectar y/o identificar protozoos del género *Babesia*, incluyendo en particular: *B. microti*, *B. venatorum*, *B. divergens* y/o *B. canis* en muestras que contienen ácidos nucleicos, incluyendo el kit un Cebador 1 con una secuencia SEQ ID NO: 1 y/o el Cebador 2 con una secuencia SEQ ID NO: 2 y/o el Cebador 3 con una secuencia SEQ ID NO: 3 y preferentemente instrucciones para su uso y
45 preferentemente reactivos para la PCR.

La presente invención también se refiere al uso del cebador denominado Cebador 1 con una secuencia SEQ ID NO: 1 y/o el Cebador 2 con una secuencia SEQ ID NO: 2 y el Cebador 3 con una secuencia SEQ ID NO: 3 para la detección y/o identificación de protozoos del género *Babesia* que incluyen en particular: *B. microti*, *B. venatorum*, *B. canis* y/o *B. divergens*, en muestras que contienen ácidos nucleicos, preferentemente en muestras obtenidas de tejidos de seres humanos y/o animales, incluyendo arácnidos, preferentemente de la sangre de seres humanos y/o animales.
50

El kit de acuerdo con la invención que preferentemente contiene simultáneamente los tres cebadores, el Cebador 1 con una secuencia SEQ ID NO: 1, el Cebador 2 con una secuencia SEQ ID NO: 2 y el Cebador 3 con una secuencia SEQ ID NO: 3.

Breve descripción de los dibujos

La invención se explica con más detalle en los ejemplos que son, sin embargo, no limitantes del ámbito de la misma. Las realizaciones se ilustran en figuras, en las que:

- 5 La fig. 1 muestra una separación electroforética ejemplar de productos de la PCR, que se lleva a cabo sobre un gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio, en dos ejecuciones experimentales (A) lado izquierdo: Cebador 1 + Cebador 3 y (B) lado derecho: Cebador 2 + Cebador 3. Las muestras de ensayo se marcaron de 1 a 6 M (marcador) - peso convencional (GBP 600 pb DNA Ladder, GenoPlast).
- 10 La fig. 2 muestra las curvas de fusión de ADN de los productos de la PCR en tiempo real utilizando los cebadores: Cebador 1 + Cebador 2 + Cebador 3 para las muestras que contienen ADN de *Babesia*: *B. canis* (línea continua), *B. divergens* (-----) y *B. microti* (.....).
- La fig. 3 muestra un análisis de las curvas de fusión de los productos obtenidos en la PCR en tiempo real en comparación con la curva de fusión de ADN de referencia (ADN de *B. venatorum*). Se presentan los resultados para las muestras que contenían el ADN de control de *Babesia*: *B. canis* (línea continua), *B. divergens* (-----) y *B. microti* (.....), *B. venatorum* = *Babesia* sp EU1 (-·-·-·).
- 15 La fig. 4 muestra los resultados de la separación electroforética de los productos de la PCR múltiple en tiempo real que se llevó a cabo utilizando tres cebadores: Cebador 1 + Cebador 2 + Cebador 3, en gel de agarosa al 4 % teñido con bromuro de etidio.
- 20 La fig. 5 muestra los resultados del análisis de fusión de ADN obtenidos en la PCR en tiempo real utilizando los cebadores: Cebador 1, Cebador 2, Cebador 3 para las muestras aisladas de la sangre de perros con babesiosis y dos controles positivos que contenían ADN de *B. microti* (.....) y *B. canis* (-----). Las muestras de estudio se marcaron con una línea continua.

Descripción de las realizaciones

Con el fin de simplificar, en la descripción y los ejemplos se utilizan las siguientes abreviaturas:

- 25 ARNr 18S - subunidad ribosómica pequeña
- ADN - ácido desoxirribonucleico
- HRM - análisis de las curvas de fusión de ADN en alta resolución
- PCR múltiple - un procedimiento que permite la amplificación de múltiples matrices durante una única reacción de PCR.
- PCR - reacción en cadena de la polimerasa
- 30 pb - pares de bases
- PCR en tiempo real - Análisis de PCR en tiempo real

Ejemplo 1: Uso de los cebadores llamados Cebador 1, Cebador 2, Cebador 3 para la detección de *Babesia* mediante el procedimiento de PCR

- 35 El experimento se llevó a cabo sobre material genético aislado de la sangre de un topillo infectado naturalmente con *B. microti* (muestras marcadas como 2A y 2B), bazo de un ciervo infectado naturalmente con *B. divergens* (3A y 3B), sangre de un perro infectado con *B. canis* (4A y 4B). Los controles negativos: suspensión de un cultivo de protozoos *T. gondii* (5A y 5B), líquido amniótico humano (6A y 6B), agua desionizada (1A y 1B).

En las reacciones se utilizaron cebadores de las siguientes secuencias:

Cebador	Secuencia (5'→3')	ID de secuencia
Cebador 1	TGACCTAAACCCTCACCAGAGTAAC	SEQ ID NO: 1
Cebador 2	GAATCTAAACCCTTCCCAGAGTATC	SEQ ID NO: 2
Cebador 3	GCTTTCGCAGTAGTTCGTCTTTA	SEQ ID NO: 3

- 40 Se llevó a cabo la PCR en dos ejecuciones experimentales independientes, con las siguientes combinaciones: (parte A) Cebador 1 + Cebador 3 y (parte B) Cebador 2 + Cebador 3. En ambos casos se llevó a cabo la reacción en una mezcla de un volumen total de 25 µl en las siguientes condiciones:

Componentes	Volumen añadido (µl/reacción)
H ₂ O	12,375
Tampón Q	5
Tampón de PCR	2,5
dNTP	0,5
Cebador 1, 10 µM /o Cebador 2, 10 µM	1,25

(continuación)

Componentes	Volumen añadido (µl/reacción)
Cebador 3, 10 µM	1,25
Polimerasa Hot Star Taq® DNA	0,125
Aislados que contenían material genético (concentración de ADN total en la muestra: 10-500 ng/1 µl)	2

La reacción tuvo lugar en tubos de propileno libres de DNasa y RNasa de un volumen de 200 µl, para uso en PCR. La reacción se llevó a cabo en 40 ciclos de acuerdo con el perfil de temperaturas posterior:

Etapa		Condiciones
preincubación		95 °C, 15 min
amplificación	desnaturalización	95 °C, 60 s
	hibridación	60 °C, 90 s
	síntesis	72 °C, 60 s
Etapa final de la PCR		72 °C, 10 min
Enfriamiento de la mezcla de reacción		8 °C

5

Después de completarse la reacción, los productos obtenidos de la PCR (para *B. microti* - 407 pb, para *B. divergens* y *B. canis* -381 pb) se separaron por electroforesis sobre gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio añadido.

La Fig. 1 representa los resultados del experimento. La banda que confirmaba la presencia del ADN del parásito se observaba en dos pocillos: 2A - una muestra que contenía ADN de sangre de topillo infectado naturalmente con *B. microti*; 3A y 3B - muestras que contenían ADN del bazo de un ciervo infectado naturalmente con *B. divergens* y ADN de la sangre de un perro infectado naturalmente con *B. canis* (pocillo 4B). En ninguna de las dos ejecuciones experimentales investigadas se observaron productos de amplificación específicos en las muestras de control negativo: *T. gondii* (5A y 5B), ADN humano (6A y 6B), agua desionizada (1A y 1B).

Los resultados obtenidos indican la aplicabilidad del procedimiento de amplificación utilizado para la detección de ADN de las especies de *Babesia*: *B. microti*, *B. divergens*, *B. canis* en aislado de ADN de tejidos humanos y animales.

Ejemplo 2. Investigación de la especificidad de la amplificación de ADN en PCR con rampa descendente utilizando los cebadores diseñados Cebador 1, Cebador 2, Cebador 3.

La amplificación se llevó a cabo en forma de PCR con rampa descendente en el intervalo de temperaturas desde 63 °C a 55 °C. En el experimento se utilizaron los siguientes cebadores: Cebador 1, Cebador 2, Cebador 3 de las secuencias descritas anteriormente en el Ejemplo 1. Se analizaron las muestras que contenían el material genético siguiente:

1 - ADN de *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa)

2 - ADN de *B. microti*

3 - ADN de *B. divergens*

25 4 - agua desionizada (H₂O)

5 - ADN de *B. canis*

6 - ADN humano

7 - ADN de la garrapata *I. ricinus*

30 Se llevó a cabo la PCR en tiempo real en la mezcla de reacción con un volumen total de 20 µl con el uso de reactivos del kit SsoFast™ EvaGreen® Supermix, en las siguientes proporciones:

Componentes	Volumen añadido (µl/reacción)
2X de Mezcla maestra	10
Cebador 1, 10 µM	0,8
Cebador 2, 10 µM	0,8
Cebador 3, 10 µM	0,8
H ₂ O	6,6
Matriz de ADN de <i>Babesia</i> (2-200 ng/1 µl)	1

La reacción tuvo lugar en tubos de propileno (PP) libres de DNasa y RNasa con transparencia aumentada, de un

volumen de 200 µl, para uso en PCR. La amplificación se llevó a cabo en 45 ciclos con reducción de la temperatura de hibridación de 0,2 °C en cada ciclo con las siguientes condiciones:

ciclo	condiciones
preincubación	Mantenimiento @ 98 °C, 2 min, 0 s
amplificación	Etapa 1 @ 98 °C, mantenimiento 10 s
	Etapa 2 @ 63 °C, mantenimiento 30 s
	Etapa 3 @ 72 °C, mantenimiento 30 s, adquisición de Cycling A ([verde])
Análisis de fusión	Fusión (70-90 °C), segundos de mantenimiento en la 1ª Etapa, mantenimiento de 3 segundos en las siguientes etapas, Fusión A ([HRM])

- Las curvas de fusión obtenidas como resultado del experimento que se llevó a cabo se muestran en la figura (fig. 2).
- 5 Los resultados del experimento que se llevó a cabo de acuerdo con la invención se pueden analizar en forma normalizada, que se muestra en la fig. 3. Después de completar la reacción, los amplicones obtenidos (para *B. microti* - 407 pb, *B. divergens* y *B. canis* - 381 pb) se visualizaron después de llevar a cabo la electroforesis en gel de agarosa con adición de bromuro de etidio utilizando una agarosa al 4 % (Prona) permitiendo observar las diferencias entre los productos de la amplificación obtenidos. La fotografía del gel se muestra en la fig. 4.
- 10 Los resultados obtenidos indican la aplicabilidad del procedimiento de amplificación utilizado para la detección y diferenciación de ADN del protozoo *Babesia* de las especies: *B. microti*, *B. divergens*, *B. canis* en muestras clínicas y ambientales.

Ejemplo 3. Detección e identificación de ADN de Babesia en el material genético aislado de muestras de sangre recolectadas de 5 perros con babesiosis clínicamente reconocida confirmada por examen microscópico.

- 15 Las muestras de estudio contenían ADN aislado de la sangre de perros con babesiosis confirmada. La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 25 µl utilizando el mismo conjunto de reactivos que en el Ejemplo 2, en las siguientes condiciones:

Componentes	Volumen añadido (µl/reacción)
2X Mezcla maestra	12,5
Cebador 1, 10 µM	1
Cebador 2, 10 µM	1
Cebador 3, 10 µM	1
H ₂ O	8,5
Matriz de ADN (ADN total 50-100 ng/1 µl)	1

- 20 La reacción se llevó a cabo en las condiciones descritas anteriormente en el Ejemplo 2. Los resultados de la reacción se muestran en la fig. 5 en la que: las muestras que contienen ADN aislado de la sangre de 5 perros con babesiosis se marcan con una línea continua, el control positivo que contenía ADN de *B. microti* se muestra con una línea de puntos (.....), y *B. canis* - una línea discontinua (---). El análisis comparativo de las curvas obtenidas para las muestras de estudio y las curvas de control de las muestras que contienen el ADN de referencia de *Babesia* indica que el agente etiológico de las infecciones detectadas eran de la especie *B. canis*.
- 25 Los resultados obtenidos indican la aplicabilidad del procedimiento de amplificación utilizado para la detección y diferenciación de ADN de los protozoos *B. microti* y *B. canis* en muestras clínicas.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 30 <110> NIZP_PZH
- <120> Procedimiento de detección y/o identificación de protozoos del género *Babesia*, cebador para su uso en este procedimiento y kit para su uso en los procedimientos de diagnóstico de babesiosis sintomática y asintomática
- 35 <130> PZ/3104/AGR/PCT
- <160> 3
- <170> PatentIn version 3.5
- 40 <210> 1
<211> 25
<212> ADN
<213> artificial

<220>
 <223> Cebador 1
 5 <400> 1
 tgacctaaac cctcaccaga gtaac 25
 <210> 2
 <211> 25
 10 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Cebador 2
 15 <400> 2
 gaatctaaac ccttcccaga gtatc 25
 <210> 3
 <211> 23
 20 <212> ADN <213> artificial
 <220>
 <223> Cebador 3
 25 <400> 3
 gctttcgag tagttcgtct tta 23

LISTADO DE SECUENCIAS

30 <110> NIZP_PZH
 <120> Procedimiento de detección y/o identificación de protozoos del género Babesia, cebador para su uso en este
 35 procedimiento y kit para su uso en los procedimientos de diagnóstico de babesiosis sintomática y asintomática
 <130> PZ/3104/AGR/PCT
 <160> 3
 40 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 25
 <212> ADN
 45 <213> artificial
 <220>
 <223> Cebador 1
 50 <400> 1
 tgacctaaac cctcaccaga gtaac 25
 <210> 2
 <211> 25
 55 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Cebador 2
 60 <400> 2
 gaatctaaac ccttcccaga gtatc 25
 <210> 3
 65 <211> 23

<212> ADN <213> artificial

<220>

<223> Cebador 3

5

<400> 3

gctttgcag tagtctgtct tta 23

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de detección y/o identificación de protozoos del género *Babesia*, que incluyen en particular *B. microti*, *B. venatorum*, *B. canis* y/o *B. divergens*, en muestras que contengan ácidos nucleicos, **que se caracteriza porque** el procedimiento comprende las siguientes etapas:
- 5 a) la amplificación de ácidos nucleicos en una única reacción, utilizando los cebadores: Cebador 1 con una secuencia que consiste en SEQ ID NO: 1 y/o el Cebador 2 con una secuencia que consiste en SEQ ID NO: 2 y el Cebador 3 con una secuencia que consiste en SEQ ID NO: 3;
b) detección; y opcionalmente
c) identificación.
- 10 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **que se caracteriza porque** los tres cebadores, el Cebador 1 con una secuencia SEQ ID NO: 1, el Cebador 2 con una secuencia SEQ ID NO: 2 y el Cebador 3 con una secuencia SEQ ID NO: 3 se utilizan simultáneamente.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que **se caracteriza porque**
- 15 a) se utilizan los cebadores Cebador 1 con una secuencia SEQ ID NO: 1 y el Cebador 3 con una secuencia SEQ ID NO: 3, o
b) se utilizan los cebadores Cebador 2 con una secuencia SEQ ID NO: 2 y el Cebador 3 con una secuencia SEQ ID NO: 3.
4. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, **que se caracteriza porque** se utilizan adicionalmente uno o más de otros cebadores.
- 20 5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, **que se caracteriza porque** en la etapa de amplificación de ácidos nucleicos, la hibridación del cebador se lleva a cabo en un intervalo de temperaturas de 55-63 °C.
6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, **que se caracteriza porque** la etapa de amplificación de ácidos nucleicos se lleva a cabo mediante un procedimiento de PCR clásica, PCR múltiple, PCR en tiempo real.
- 25 7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, **que se caracteriza porque** la etapa de detección se lleva a cabo con técnicas seleccionadas de entre el análisis de las propiedades físicas de los productos de amplificación obtenidos, preferentemente el análisis de curvas de fusión de los productos de amplificación obtenidos, en alta resolución (HRM), técnicas de detección utilizando sondas moleculares, secuenciación del producto de amplificación, análisis del tamaño y/o peso de los productos de amplificación, diferencias en la migración de conformeros de los productos de amplificación, amplificación y/o análisis del polimorfismo del sitio de restricción.
- 30 8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, **que se caracteriza porque** la etapa de identificación se lleva a cabo basándose en el análisis comparativo de los datos obtenidos de las muestras de estudio y los resultados obtenidos de controles adecuados para un procedimiento de detección en particular.
- 35 9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, **que se caracteriza porque** las etapas tanto de amplificación de ácidos nucleicos como de detección se llevan a cabo en un vaso ("tubo único").
10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, **que se caracteriza porque** la etapa de amplificación de ácidos nucleicos se lleva a cabo por el procedimiento de PCR en tiempo real y la etapa de detección se lleva a cabo por un procedimiento de análisis de la curva de fusión de los productos de amplificación obtenidos, en alta resolución con una etapa de identificación simultánea.
- 40 11. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, **que se caracteriza porque** las muestras que contienen los ácidos nucleicos se obtuvieron de tejidos de seres humanos y/o animales, incluyendo arácnidos, preferentemente de la sangre de seres humanos y/o animales.
- 45 12. Un cebador para su uso en un procedimiento de detección y/o identificación de protozoos del género *Babesia*, que incluyen en particular *B. microti*, *B. venatorum*, *B. canis* y/o *B. divergens*, en muestras que contengan ácidos nucleicos como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-11, **que se caracteriza porque** tiene la secuencia que consiste en SEQ ID NO: 1 o la secuencia que consiste en SEQ ID NO: 2 o la secuencia que consiste en SEQ ID NO: 3.
- 50 13. El uso del Cebador 1 con una secuencia que consiste en SEQ ID NO: 1 y/o el Cebador 2 con una secuencia que consiste en SEQ ID NO: 2 y el Cebador 3 con una secuencia que consiste en SEQ ID NO: 3 en el procedimiento de detección y/o identificación de protozoos del género *Babesia*, que incluye en particular *B. microti*, *B. venatorum*, *B. canis* y/o *B. divergens* en muestras que contengan ácidos nucleicos, preferentemente en muestras obtenidas de tejidos humanos y animales, incluyendo arácnidos, preferentemente de la sangre de seres humanos y animales, en el que el procedimiento de detección y/o identificación de protozoos del género *Babesia* comprende la amplificación de ácidos nucleicos utilizando los cebadores: Cebador 1 con una secuencia que consiste en SEQ ID NO: 1 y/o el Cebador 2 con

una secuencia que consiste en SEQ ID NO: 2 y el Cebador 3 con una secuencia que consiste en SEQ ID NO: 3, y en el que la etapa de amplificación de ácidos nucleicos se lleva a cabo mediante un procedimiento de PCR clásica, PCR múltiple, PCR en tiempo real.

- 5 14. Un kit para su uso en los procedimientos de diagnóstico de una infección por *Babesia* o un estado portador de *Babesia*, incluyendo la detección y/o identificación de protozoos del género *Babesia*, incluyendo en particular *B. microti*, *B. venatorum*, *B. canis* y/o *B. divergens*, en muestras que contengan ácidos nucleicos, **que se caracteriza porque** comprende el Cebador 1 con una secuencia que consiste en SEQ ID NO: 1 y/o el Cebador 2 con una secuencia que consiste en SEQ ID NO: 2 y el Cebador 3 con una secuencia que consiste en SEQ ID NO: 3 y preferentemente instrucciones para su uso y preferentemente reactivos para la PCR.
- 10 15. El kit de acuerdo con la reivindicación 14, **que se caracteriza porque** contiene simultáneamente los tres cebadores, el Cebador 1 con una secuencia SEQ ID NO: 1, el Cebador 2 con una secuencia SEQ ID NO: 2 y el Cebador 3 con una secuencia SEQ ID NO: 3.

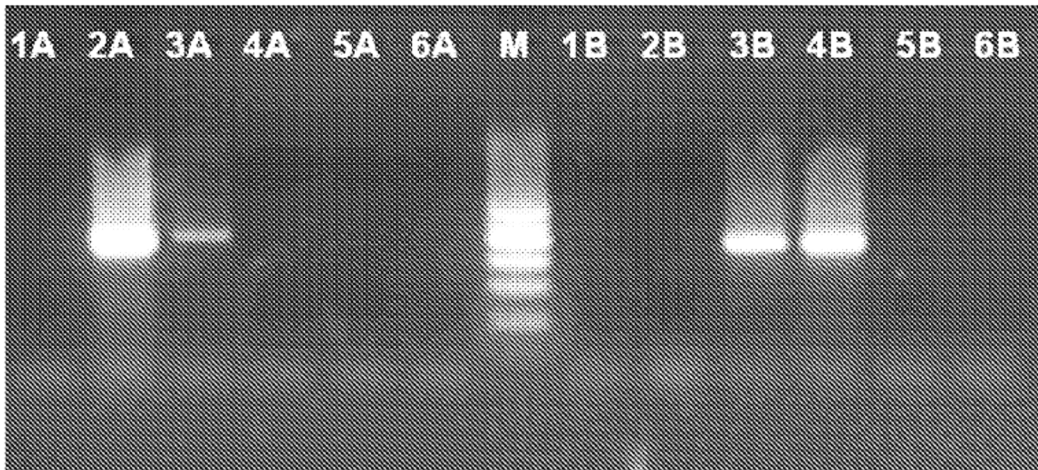


Fig. 1.

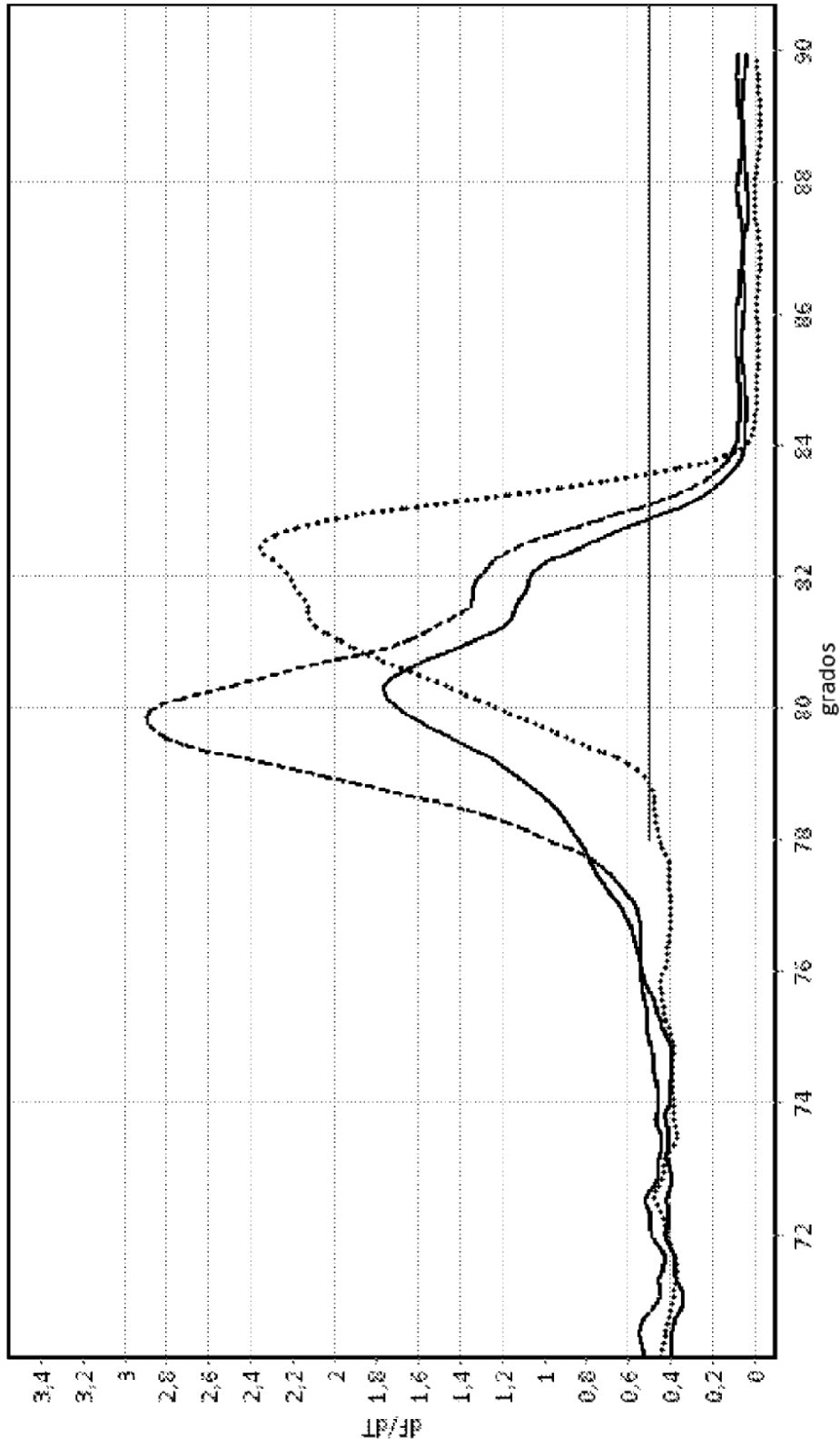


Fig. 2

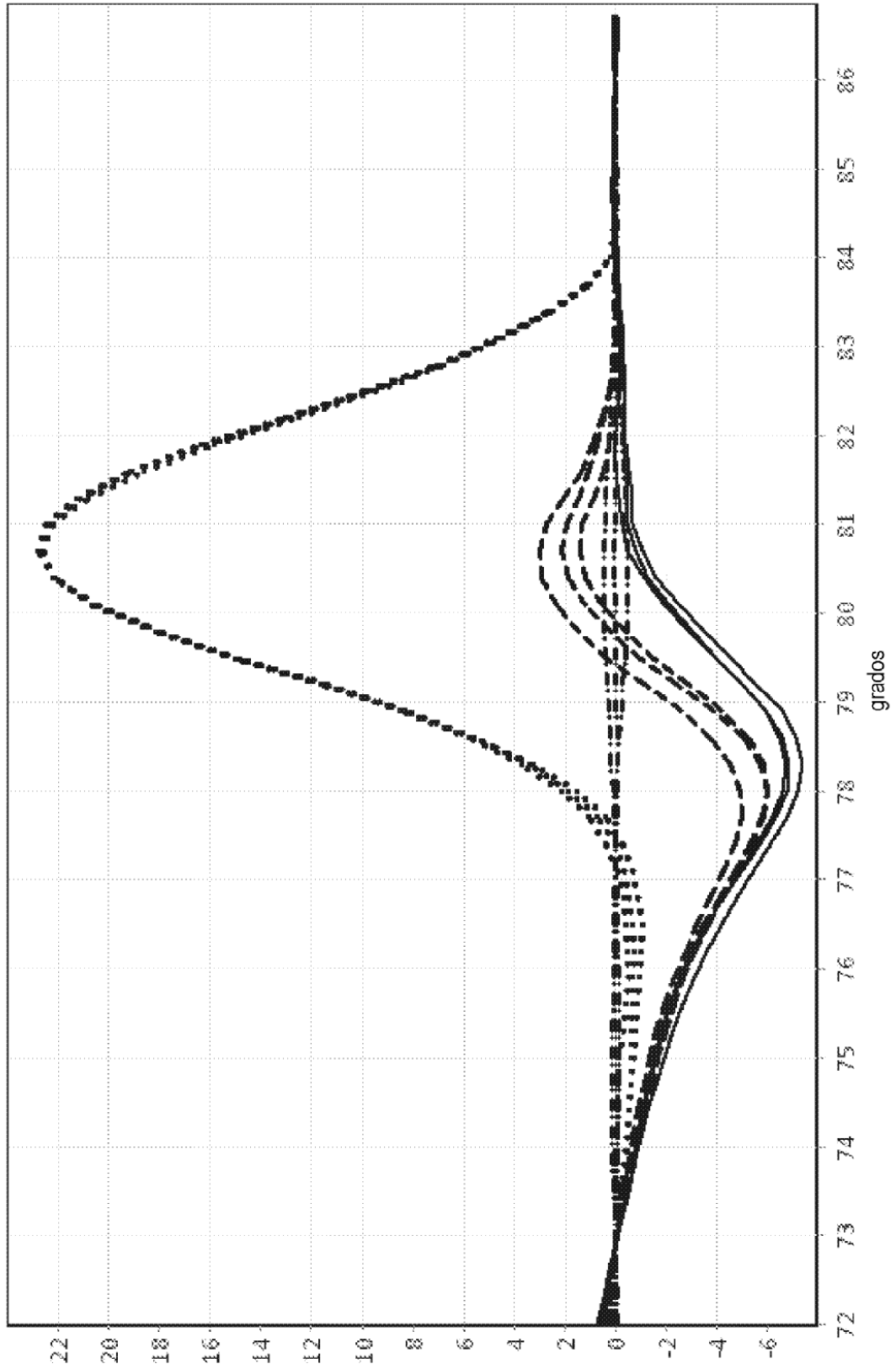


Fig. 3

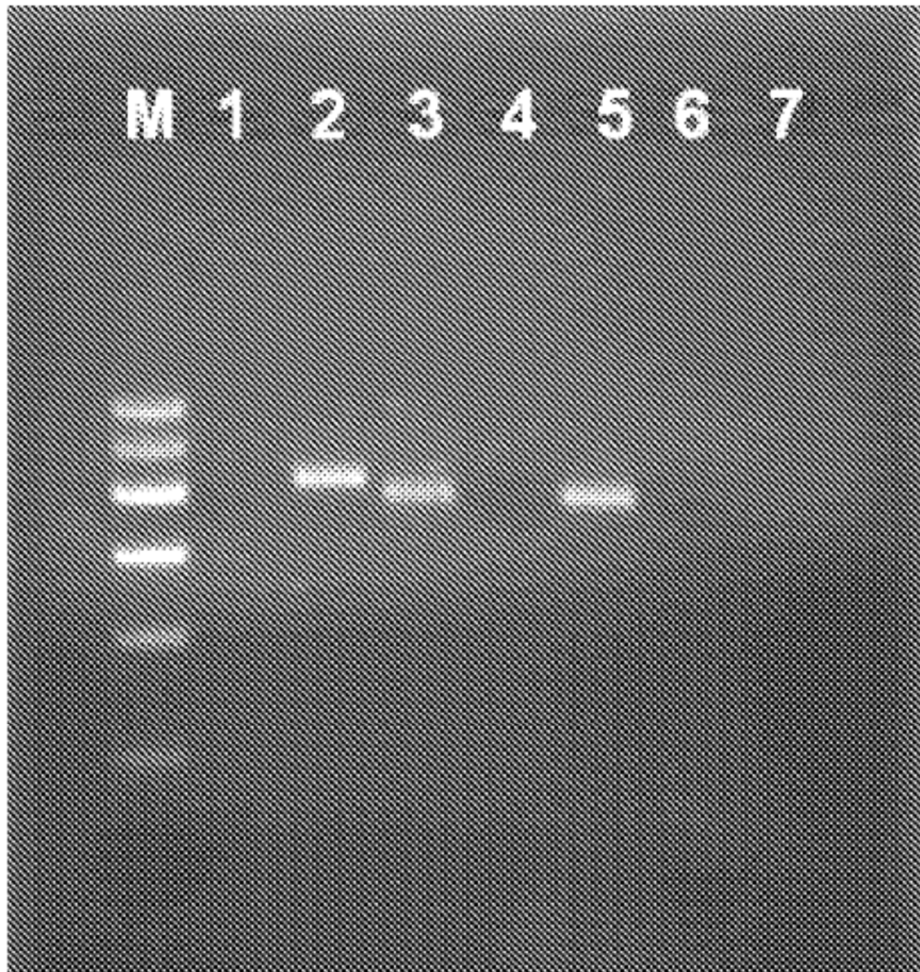


Fig. 4.

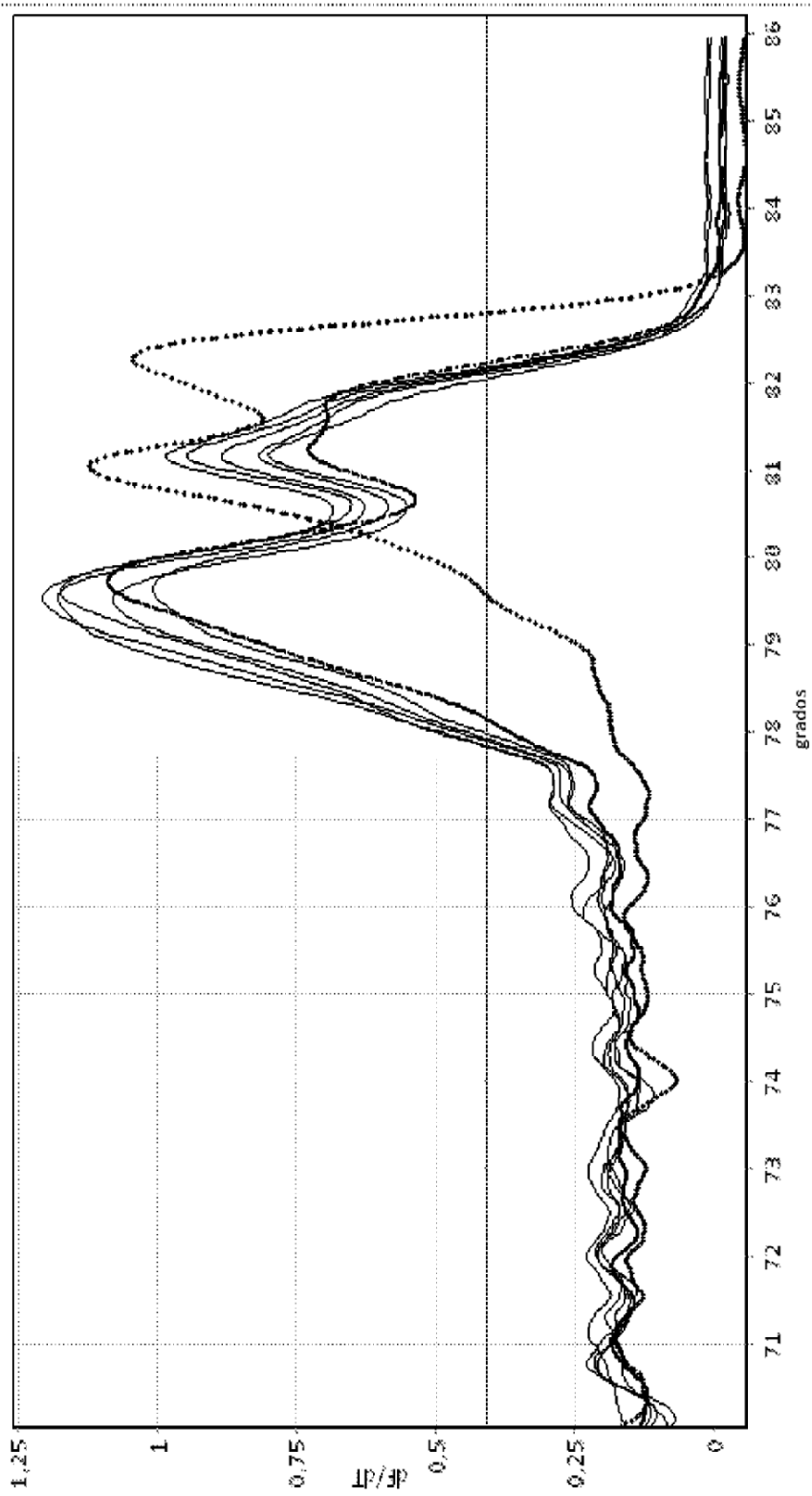


Fig. 5.