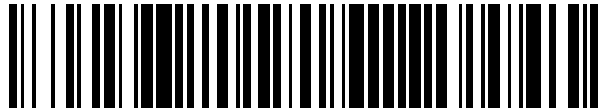


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 287**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2007 E 07119610 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.11.2014 EP 2014775**

54 Título: **Método para la detección de especies bacterianas de los géneros Anaplasma/Ehrlichia y Bartonella**

30 Prioridad:

29.06.2007 ES 200701830

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

22.01.2015

73 Titular/es:

**INSTITUTO DE SALUD CARLOS III (100.0%)
C/ SINESIO DELGADO 6
28029 MADRID, ES**

72 Inventor/es:

**ANDA FERNÁNDEZ, PEDRO;
GIL GIL, HORACIO;
ESCUDERO NIETO, RAQUEL;
JADO GARCÍA, ISABEL y
RODRÍGUEZ MORENO, ISABEL**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 527 287 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para la detección de especies bacterianas de los géneros *Anaplasma*/*Ehrlichia* y *Bartonella*

5 La presente invención, que se refiere a un método de detección e identificación de las especies bacterianas pertenecientes a los géneros *Anaplasma*/*Ehrlichia* y *Bartonella*, es una patente de adición a la solicitud de patente española con número de publicación 2.264.642. Junto con este método, la invención también proporciona los cebadores y sondas necesarios para llevarlo a cabo.

10 **Estado de la técnica anterior**

Actualmente, hay descritas unas 200 enfermedades zoonóticas (bartonelosis, leptospirosis, borreliosis de Lyme...) que el hombre puede padecer y que en países en vías de desarrollo constituyen una importante causa de mortandad y suponen cuantiosas pérdidas económicas. La convivencia con animales, la ausencia de infraestructuras sanitarias y el bajo nivel cultural continúan siendo los principales aliados de estas enfermedades.

Del mismo modo, determinados tipos de zoonosis que están ampliamente extendidas en los países en vías de desarrollo, se están extendiendo en los países desarrollados como consecuencia de los aumentos de población en zonas urbanas y periurbanas, además del aumento de tráfico de animales a través de fronteras internacionales. Estas circunstancias, entre otras, conllevan un creciente riesgo de introducción de enfermedades exóticas en nuestro entorno.

Además, el hecho frecuente del hallazgo de artrópodos infectados por más de un patógeno incluido en la presente invención, aumenta las posibilidades de transmisión de más de una zoonosis a través de una única picadura. En este sentido, cada vez son más comunes las hospitalizaciones de individuos que presentan cuadros clínicos producidos por el contacto con animales o artrópodos, tales como mosquitos, garrapatas, pulgas, piojos, ácaros, etc., los cuales actúan como vectores o como reservorios de patógenos. Dichos cuadros clínicos, debido a su gran similitud, no permiten una identificación rápida y fiable del agente causante de la patología, no siendo posible la aplicación rápida de tratamientos específicos, que en ocasiones llegan demasiado tarde. Esta circunstancia justifica la necesidad de un método integrado de detección e identificación de especies bacterianas causantes de zoonosis.

Hasta el momento, los métodos de diagnóstico molecular disponibles se limitan básicamente a la detección de los patógenos mediante tecnología de anticuerpos. Este tipo de análisis, generalmente retrospectivo y en ocasiones de baja sensibilidad, suelen ser de escasa ayuda en para tratamiento de enfermedades en fase aguda.

Otra alternativa para la detección e identificación de patógenos se basa en la aplicación de medios de cultivo. Este tipo de técnicas es de escasa aplicabilidad para determinadas especies de géneros como *Bartonella* y *Anaplasma*/*Ehrlichia*, debido a que éstas no crecen generalmente en los medios de cultivo habituales e incluso pueden llegar a necesitar cultivos celulares. En consecuencia, estas metodologías están apartadas de las prácticas habituales en los laboratorios de microbiología de los hospitales. Una de las alternativas más eficaces a este tipo de metodologías la constituye el análisis directo de material genético, fundamentado en la tecnología de la PCR. Esta tecnología, aunque muy efectiva, encuentra su mayor limitación en la dificultad para encontrar marcadores o regiones específicas, así como cebadores y sondas, que permitan un análisis fiable de las muestras.

45 Recientemente, se ha publicado un trabajo (Blaskovic D. et al. 2005. FEMS Microbiology Letters 243:273-8), que describe un método basado en el análisis de ADN ribosomal, aunque emplea cebadores universales, que amplifican material genético tanto de bacterias diana como de otras que no los son, lo que ocasiona que su sensibilidad sea bastante reducida.

50 Otros métodos como los descritos por las patentes americanas US 6.300.072 y 6.518.020 son capaces de detectar e identificar bacterias del género ***Bartonella***, mediante el empleo de la misma región (16S-23S), aunque sin embargo el número de especies dentro de este género ha aumentado sensiblemente desde el depósito de dichas patentes y su aproximación, que consiste en una discriminación entre especies según el tamaño del amplicón obtenido en una PCR, no es útil para determinadas especies del género actualmente conocidas que comparten un tamaño de fragmento amplificado similar.

Schoulds L.M. et al. 1999 (Journal of clinical Microbiology, 37(7): 2215-2222) divulga un método para la detección simultánea de especies bacterianas que causan zoonosis pertenecientes a los géneros *Ehrlichia* y *Bartonella* mediante cebadores y sondas que amplifican regiones dentro del gen de ARNs 16S. Massung R.F. et al. 2003 (Journal of Clinical Microbiology, 41(2): 717-722) divulga una comparación de diferentes ensayos de PCR para determinar su sensibilidad analítica para detectar *Anaplasma phagocytophilum*. Los ensayos que proporcionan la mayor sensibilidad y especificidad para detectar células infectadas por *Anaplasma phagocytophilum* fueron el ensayo anidado de 16S y el ensayo de msp2.

65

Breve descripción de la invención

La presente invención propone el empleo de los genes 16S y msp2 y el espacio intergénico 16S-23S para la detección e identificación de diferentes especies y grupos de especies bacterianas zoonóticas, aportando mejoras respecto de los procedimientos descritos anteriormente, puesto que éste es capaz de detectar específicamente un número muy elevado especies bacterianas, mediante el empleo de sondas y cebadores con unos niveles de sensibilidad bastante elevados.

Así, la presente invención consigue resolver el problema de lo tedioso y complicado que resulta detectar un elevado número de especies bacterianas zoonóticas, que pueden ser clínica y/o epidemiológicamente indistinguibles, mediante el desarrollo de un método y un Kit de detección basado en la tecnología de la PCR. Concretamente, la invención permite analizar diferentes regiones del ADN bacteriano que pertenece a los géneros *Anaplasma*/*Ehrlichia* y *Bartonella* para identificar ambos géneros y especies, según se muestra en la siguiente tabla (Tabla 1).

En la mayoría de los casos, las especies identificadas se corresponden a especies cultivadas y en otros se refieren a especies aisladas por primera vez (especies no cultivadas). Dichas especies han sido obtenidas a partir de muestras de las especies *Meles meles* (tejón), *Ixodes ricinus* y *Apodemus sylvaticus* y han sido caracterizadas por las secuencias AJ269792, SEQ ID NO:44-46, según se muestra en la tabla 3.

ESPECIE BACTERIANA	GEN
Anaplasma/Ehrlichia	
<i>A. phagocytophilum msp2</i>	msp2
<i>Ehrlichia ruminantium</i>	16S
<i>E. sennetsu</i>	16S
<i>E. risticii</i>	16S
<i>E. muris</i>	16S
<i>A. platys</i>	16S
<i>E. canis/E. ovina</i>	16S
Bartonella	
Genérica	16S
<i>B. talpae</i>	16S-23S
<i>Bartonella sp. *</i>	16S-23S
<i>B. phoceensis</i>	16S-23S
<i>B. rattimasiliensis</i>	16S-23S
<i>Bartonella sp. detectada en Apodemus sylvaticus</i>	16S-23S
<i>B. rochalimae</i>	16S-23S
<i>Bartonella sp. detectada en un tejón.</i>	16S-23S
<i>Bartonella sp* detectada en Ixodes ricinus</i>	16S-23S
<i>Bartonella sp detectada en Ixodes ricinus</i>	16S-23S
* <i>B. chomeli/schoenbuchensis/capreoli/birtlesii</i>	

Breve descripción de las figuras

Figura 1.- Esta figura muestra dos membranas de hibridación para la validación de los cebadores y sondas empleados en las detecciones del género *Bartonella*. En la membrana de la izquierda se observa la ausencia de reactividad cruzada entre las diferentes sondas dentro del género. En la membrana de la derecha puede observarse como no existe reactividad cruzada de las sondas con muestras ajenas al propio género *Bartonella*. La sonda S-C12 hace referencia a la sonda empleada como CIA.

Figura 2.- Esta figura muestra dos membranas de hibridación para la validación de los cebadores y sondas empleados en las detecciones del género *Anaplasma*/*Ehrlichia*. En la membrana de la izquierda se observa la ausencia de reactividad cruzada entre las diferentes sondas dentro del género. En la membrana de la derecha puede observarse como no existe reactividad cruzada de las sondas con muestras ajenas al propio género *Anaplasma*/*Ehrlichia*. La sonda S-C12 hace referencia a la sonda empleada como CIA.

Descripción detallada de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, ésta se refiere a un método (en adelante, método de la invención) para la detección e identificación simultánea de bacterias que causan zoonosis que pertenecen a los géneros *Anaplasma*/*Ehrlichia* y al género *Bartonella* que comprende las siguientes etapas:

- a. Poner la muestra a analizar en contacto con una mezcla de reacción que contiene los cebadores que amplifican de manera selectiva las secuencias SEQ ID NO: 1-7 de las especies *Anaplasma/Ehrlichia* y las secuencias SEQ ID NO: 8-17 de especies de *Bartonella*, o sus respectivas secuencias complementarias.
- 5 b. Amplificar de manera simultánea las secuencias de la etapa (a) mediante reacción en cadena de la polimerasa,
- c. Identificar las secuencias amplificadas de la etapa (b) usando las sondas que consisten en SEQ ID NO: 26-42, y
- 10 d. Detectar la presencia o ausencia de bacterias causantes de zoonosis asociando las secuencias identificadas de la etapa (c) con las especies bacterianas que pertenecen a los géneros *Anaplasma/Ehrlichia* o al género *Bartonella*,

en el que las especies bacterianas que pertenecen a los géneros *Anaplasma/Ehrlichia* se seleccionan de la lista que consiste en *A. phagocytophilum*, *E. ruminantium*, *E. sennetsu*, *E. risticii*, *E. muris*, *A. platys*, *E. canis* y *E. ovina*.

- 15 Los cebadores necesarios para llevar a cabo el método de la invención pueden diseñarse por alineamiento múltiple de las secuencias que comprenden las SEQ ID NO: 1-17 con programas informáticos como CLUSTAL X, permiten la identificación de regiones muy conservadas que servirán molde para el diseño de los cebadores, que deben ser validados posteriormente empíricamente.
- 20 De acuerdo con una realización preferida de este aspecto de la invención, los cebadores son capaces de hibridar con diferentes regiones nucleotídicas de los genes 16S, mp2 y espacio intergénico 16S-23S (tablas 2 y 3), dichos cebadores se seleccionan del grupo de SEQ ID NO: 18-25 o sus secuencias complementarias, siendo éstos capaces de amplificar las SEQ ID NO: 1-17 o sus secuencias complementarias, preferentemente de manera simultánea. Estos cebadores, además de simplificar el método, tienen la ventaja de presentan una baja o nula reactividad frente a muestras procedentes de otras especies (ver tabla 5).
- 25

La detección de las secuencias SEQ ID NO:1-17 o sus complementarias puede realizarse con metodologías sobradamente conocidas en el estado de la técnica usando sondas siendo capaces estas sondas de hibridar entre las posiciones de los genes 16S, msp2 y espacio intergénico 16S-23S, según se indica en las tablas 2 y 3, y que consisten en las secuencias SEQ ID NO: 26-45 o sus secuencias complementarias.

30

En una realización particular, el método de la invención comprende adicionalmente los cebadores con secuencia SEQ ID NO: 51-52 para amplificar el gen de control de amplificación interno de THC sintasa de *Cannabis sativa*.

- 35 En otra realización particular, las sondas de la etapa (c) del método de la invención comprenden además la sonda con secuencia SEQ ID NO: 50, capaz de hibridar con la secuencia SEQ ID NO: 49 del control de amplificación interno.

40 La invención también divulga cebadores capaces de amplificar las secuencias seleccionadas del grupo que comprende las SEQ ID NO:1-17, 47 y sus secuencias complementarias. Dichos cebadores deben ser capaces de hibridar entre las posiciones nucleotídicas de los genes 16S, mp2 y el espacio intergénico 16S-23S, según se indica en las tablas 2 y 3 (columna 3). De acuerdo con la invención, los cebadores se seleccionan del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:18-25 y/o sus secuencias complementarias.

45 Otro aspecto de la invención se refiere a sondas capaces de detectar específicamente cualquiera de las especies y géneros bacterianos, como se indica en las tablas 2 y 3 (columna 6), siendo capaces dichas sondas de hibridar entre las posiciones nucleotídicas de los genes 16S, msp2 y el espacio intergénico 16S-23S, como se indica en las tablas 2 y 3. Dichas sondas, cuya secuencia consiste en las SEQ ID NO: 26-32 de las especies de *Anaplasma/Ehrlichia* *A. phagocytophilum*, *E. ruminantium*, *E. sennetsu*, *E. risticii*, *E. muris*, *A. platys*, *E. canis* y *E. ovina*, y las secuencias

50 SEQ ID NO: 33-42 de especies de *Bartonella*, o sus secuencias complementarias, son capaces de hibridar con las secuencias SEQ ID NO: 1-17 y/o con sus correspondientes secuencias complementarias. En lo sucesivo, estas se citarán como sondas de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit de análisis para llevar a cabo la identificación de cualquiera de los géneros o especies bacterianos, según se indica en las tablas 2 y 3, donde dicho kit comprende las sondas de la invención y, en una realización particular, comprende además los cebadores con secuencias SEQ ID NO: 18-25. Además, este kit puede comprender sin ningún tipo de limitación todos aquellos reactivos, tampones, soportes, etc. necesarios para su desarrollo.

55

60 En otro aspecto, la invención se refiere al uso del kit para la identificación específica simultánea de bacterias causantes de zoonosis que pertenecen a los géneros *Anaplasma/Ehrlichia* y al género *Bartonella*, en el que las especies bacterianas que pertenecen a los géneros *Anaplasma/Ehrlichia* se seleccionan de la lista que consiste en *A. phagocytophilum*, *E. ruminantium*, *E. sennetsu*, *E. risticii*, *E. muris*, *A. platys*, *E. canis* y *E. Ovina*.

65

TABLA 2. Detección e identificación de especies del género Anaplasma/Ehrlichia					
ORGANISMO	GEN	CEBADOR	SONDAS	SECUENCIAS	POSICIÓN
Anaplasma (Ehrlichia)					
A. phagocytophilum	msp2	SEQ ID NO:18 (EF143812 (1-22)) SEQ ID NO:19 (EF143812 (313-334))	MSP2 (SEQ ID NO:26)	SEQ ID NO:1	EF143812 (223-243)
Genérica	16S	SEQ ID NO:20. (U02521 (9-30)) SEQ ID NO:21 (U02521 (109-86))	AEGEN (SEQ ID NO:48)	SEQ ID NO:47	U02521 (38-57)
Ehrlichia ruminantium	16S	SEQ ID NO:21 SEQ ID NO:21	S-RUM (SEQ ID NO:27)	SEQ ID NO:2	DQ640401 (23-45)
E. sennetsu	16S	SEQ ID NO:20. SEQ ID NO:21	S-SEN (SEQ ID NO:28)	SEQ ID NO:3	M73225 (46-63)
E. risticii	16S	SEQ ID NO:20. SEQ ID NO:21	S-RIS (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO:4	AY005439 (46-65)
E. muris	16S	SEQ ID NO:20. SEQ ID NO:21	S-MUR (SEQ ID NO:30)	SEQ ID NO:5	AY587608 (16-37)
A. platys	16S	SEQ ID NO:20. SEQ ID NO:21	S-PLA (SEQ ID NO:31)	SEQ ID NO:6	EF139459 (53-75)
E. canis/E. ovina	16S	SEQ ID NO:20. SEQ ID NO:21	S-CANOVIN (SEQ ID NO:32)	SEQ ID NO:7	EF011111 (14-37)

TABLA 3. Detección e identificación de especies del género Bartonella					
ORGANISMO	GEN	CEBADOR	SONDAS	SECUENCIAS	POSICIÓN
Bartonella					
Genérica	16S	SEQ ID NO:22 (AJ223780 (961-979)) SEQ ID NO:23 (AJ223780 (1376-1398))	BARTGEN2 (SEQ ID NO:33)	SEQ ID NO:8	AJ223780 (1054-1075)
B. talpae	16S-23S	SEQ ID NO:24 (AY116638 (455-478)) SEQ ID NO:25 (724-743 (AJ269786))	S-TOPO (SEQ ID NO:34)	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:43 (90-113)
B. phoceensis	16S-23S	SEQ ID NO:24 SEQ ID NO:25	S-PHO (SEQ ID NO:35)	SEQ ID NO:10	AY515123 (659-679)
B. rattimasiliensis	16S-23S	SEQ ID NO:24 SEQ ID NO:25	S-RAT (SEQ ID NO:36)	SEQ ID NO:11	AY515122 (807-827)
B. rochalimae	16S-23S	SEQ ID NO:24 SEQ ID NO:25	S-ROC (SEQ ID NO:37)	SEQ ID NO:12	AF415211 (414-434)
Bartonella sp. *	16S-23S	SEQ ID NO:24 SEQ ID NO:25	CHOSCA (SEQ ID NO:38)	SEQ ID NO:13	AY116639 (438-461)
Bartonella sp. de Apodemus sylvaticus	16S-23S	SEQ ID NO:24 SEQ ID NO:25	S-APO38 (SEQ ID NO:39)	SEQ ID NO:14	AJ269792 (425-445)
Bartobella sp de Meles meles	16S-23S	SEQ ID NO:24 SEQ ID NO:25	S-TEJ (SEQ ID NO:40)	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:44 (329-350)

ORGANISMO	GEN	CEBADOR	SONDAS	SECUENCIAS	POSICIÓN
Bartonella					
Bartonella sp. de Ixodes ricinus 13	16S-23S	SEQ ID NO:24	S-G-13 (SEQ ID NO:41)	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:45 (92-111)
		SEQ ID NO:25			
Bartonella sp. de Ixodes ricinus 41	16S-23S	SEQ ID NO:24	S-G-41 (SEQ ID NO:42)	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:46 (86-104)
		SEQ ID NO:25			
* <i>B. chomeli/schoenbuchensis/capreoli/birtlesii</i>					

Breve explicación de las tablas 2 y 3:

- 5 ▪ En la columna 1 (organismo) se indica la especie o grupo de especies bacterianas que es detectado en cada caso. El grupo *Bartonella sp.* hace referencia a un conjunto de especies de este género con un alto grado de similitud y que son detectadas conjuntamente por el método de la invención.
- 10 ▪ En la columna 2 (gen) se indica el gen o región del genoma que es empleada para la detección de la especie o grupo de especies bacterianas de la columna 1.
- 10 ▪ En la columna 3 (cebador) se indica la secuencia del par de cebadores necesario para llevar a cabo la amplificación de regiones variables del gen o espacio intergénico indicado en cada tabla (columna 2), además de la secuencia con la que éstos hibridan.
- 15 ▪ En la columna 4 (sonda) se indica la secuencia de las sondas que son empleadas para la detección de las especies o grupo de especies bacterianas referidas en la columna 1 de cada tabla.
- 15 ▪ En la columna 5 (secuencia 5'-3') se indican las referencias de las secuencias de las regiones variables que son amplificadas para llevar a cabo la detección de cada la especie o grupo de especies bacterianas.
- 20 ▪ En la columna 6 se indica un código de secuencia referente a una región del gen o región genómica referido en la columna 2, así como la posición concreta de dicha secuencia en donde hibrida la sonda indicada en la columna 4.

20 Descripción detallada y modos de realización

La presente invención ha permitido desarrollar un método de análisis para la detección e identificación de diferentes géneros y especies bacterianas por tecnología PCR o PCR múltiple. Para el diseño de la metodología fue necesario analizar el espacio intergénico 16S-23S ARNr del gen 16S. Estas regiones se analizaron combinado diferentes paquetes informáticos y por comparación en bases de datos, hasta que finalmente se detectaron aquellas regiones candidatas que eran susceptibles de ser utilizadas para llevar a cabo el método.

Las regiones candidatas se utilizaron para las construcción de un elevado número de cebadores y sondas, la mayoría de los cuales, aproximadamente el 90%, fueron descartados por ensayos de hibridación, hasta que finalmente se seleccionaron aquellas que no mostraban reactividad cruzada con muestras de diferentes orígenes (Figuras 1 y 2, Tabla 5) y, además, aportaban un alto grado de sensibilidad.

A continuación, se detallan los materiales y métodos que han sido empleados para el desarrollo de la presente invención, así como ejemplos de realización de la misma. Dichos ejemplos no limitan la invención, sino que su finalidad es ilustrarla, poniendo de manifiesto eficiencia del método de la invención.

EJEMPLO 1.

Amplificación, hibridación y validación

En esta etapa se procede a realizar el análisis experimental de las regiones variables detectadas anteriormente usando PCR para su validación. El ADN aislado se amplificó por PCR, aplicando el siguiente cuadro de ciclos de temperatura y composición de la mezcla de reacción, junto con los cebadores específicos usados anteriormente para dicho fin.

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

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

- H₂O: En función del volumen final de ADN
- 5 - Tampón Taq Gold LD: 9 µl
- Cl₂Mg [3 mM]: 6 µl
- dNTPs [200mM] : 1 µl x 4
- 10 - BSA [0,8ug/µl]: 4 µl
- 8 Cebadores específicos (SEC ID 18-25) [50 pm/µl]: 0,5 µl de cada uno (7 µl)
- Taq Gold LD: 0,5 µl [2,5 unidades]
- 15 - ADN problema: máximo de 800 ng

Los amplicones se secuenciaron para su validación, comprobándose que la secuencia amplificada coincidía con las secuencias variables deducidas de los estudios bioinformáticos.

20 Posteriormente, los amplicones se hibridaron con las sondas específicas siguiendo el protocolo de RLB descrito por Sjoerd G. T. Rijpkema et al., Journal of Clinical Microbiology, Dec. 1995, p. 3091-3095, aunque aplicando las siguientes modificaciones (Figuras 1 y 2):

- 25 - Sustrato: Super Signal West Dura (Pierce, Ref: 34075)
- Sondas: se utilizan a una concentración entre 0,2 y 3,2 picomoles/microlitro
- Incubación: a 55 °C
- Lavados: a 52 °C

30 El resultado de las hibridaciones es mostrado en las figuras 1 y 2 donde se aprecia como cada una de las sondas de la invención se unen específicamente a cada uno de los amplicones de las especies bacterianas, que se detectan mediante el método de la invención.

35 Preparación de muestras y PCR múltiple.

Una de las ventajas de los sistemas de identificación basados en las tecnologías de PCR y RLB, consiste en que no es necesario partir de cultivos bacterianos puros. De este modo, y una vez realizada la validación de los cebadores y las sondas con muestras de ADN de las diferentes especies y subespecies citadas en las tablas 2 y 3, se procedió a la realización de un análisis por PCR múltiple de una mezcla de ADN de control (Figuras 1 y 2), que contenía ADN de las diferentes especies y grupos de especies citados en las tablas 2 y 3, preparada en laboratorio, seguida de un ensayo RLB, empleando los cebadores y sondas específicas diseñados, los ciclos de temperatura y la composición de mezcla de reacción, indicados anteriormente.

45 Detección de inhibidores de PCR

Para la detección de inhibidores de PCR, se construyó un control de interno de amplificación (CIA) que fue amplificado junto los ADN diana, utilizando cebadores específicos (Tabla 4), diseñados a partir de regiones conservadas de la secuencia AB183705 perteneciente al gen de la THC sintasa de *Cannabis sativa*. Concretamente, el amplicón que actúa como CIA se corresponde con una secuencia de 371 pares de bases para la cual se diseñó también una sonda para su detección durante el RLB.

Tabla 4: CIA. Gen amplificado, secuencia de cada uno de los cebadores y sondas utilizados en el proceso y posición de los mismos.					
ORGANISMO	GEN	CEBADOR	SONDAS	SECUENCIA	POSICIÓN 5'-3'
<i>C. sativa</i>	THC Sintasa	SEQ ID NO: 51 (CI-F)			AB183705 (77-99)
		SEQ ID NO:52 (CI-R)			AB183705 (447-427)
<i>C. sativa</i>	THC Sintasa	SEQ ID 51 (CI-F) SEQ ID NO: 52 (CI-R)	SEQ ID NO: 50 (S-CI2)	SEQ ID NO:49	AB183705 (281-302)

Especificidad del método

La alta especificidad del presente método está basada en el diseño y selección de los cebadores y sondas que utiliza, los cuales fueron probados con otra serie de organismos (Tabla 5), siguiendo el método descrito anteriormente, comprobándose que en ningún caso se detectó inespecíficamente la formación de amplicones (Figuras 1 y 2, membrana derecha).

5

Tabla 5. Especificidad: especies bacterianas no relacionadas, artrópodos y mamíferos utilizadas durante la puesta a punto del método.		
	ESPECIE	RESULTADO RLB
	Bacterias	
1	<i>Brucella melitensis</i>	Negativo
2	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Negativo
3	<i>Chlamydia psittaci</i>	Negativo
4	<i>Legionella pneumophila</i>	Negativo
5	<i>Leptospira interrogans</i>	Negativo
6	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Negativo
7	<i>Treponema pallidum</i>	Negativo
8	<i>Orientia tsutsugamushi</i>	Negativo
	Artrópodos	
9	<i>Ixodes ricinus</i>	Negativo
10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Negativo
	Mamíferos	Negativo
11	<i>Apodemus sylvaticus</i>	Negativo
12	Humano	Negativo

<110> Instituto de Salud Carlos III

10 <120> MÉTODO DE DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE ESPECIES BACTERIANAS DE LOS GÉNEROS ANAPLASMA/EHRlichIA Y BARTONELLA

<130> ES1613.3

15 <160> 52

<170> PatentIn version 3.4

20 <210> 1
<211> 21
<212> ADN
<213> Anaplasma phagocytophylum

<400> 1
ggctcttgaag cgctcgtaac c
21

30 <210> 2
<211> 23
<212> ADN
<213> Ehrlichia ruminantium

<400> 2
gccgargcta taaataactg tcc
23

35 <210> 3
<211> 18
<212> ADN
<213> E. sennetsu

40 <400> 3

ES 2 527 287 T3

gcaagcagct ttgattcc
18

5 <210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> E. risticii

<400> 4

10 ctgcaagcag ccctgattcc
20

<210> 5
<211> 22
<212> ADN
<213> E. muris

15 <400> 5

20 cgaacggata gctaccata gc
22

<210> 6
<211> 23
<212> ADN
<213> A. platys

<400> 6

25 catagcaagc tacgacaaaa atc
23

<210> 7
<211> 24
<212> ADN
<213> E. canis/E. ovina

30 <400> 7

gccagaggct ataaataatt gtcc
24

35 <210> 8
<211> 22
<212> ADN
<213> Género Bartonella

40 <400> 8

aatgctggca actaagggcg ag
22

45 <210> 9
<211> 24
<212> ADN
<213> Bartonella talpae

<400> 9

50 gattaaatgg acctaaagg actg
24

<210> 10
<211> 21
<212> ADN
<213> B. phoceensis

55 <400> 10

gagagacgct tttcccttg g
21

ES 2 527 287 T3

<210> 11
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> B. rattimasiliensis
 5 <400> 11
 cggtgttttg aggcaaagtg c
 21

<210> 12
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> B. rochalimae
 10 <400> 12
 aacagggaaa agagcaggcc a
 15 21

<210> 13
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Bartonella sp.
 20 * (B. chomeli/schoenbuchensis/capreoli/birtlesii)
 <400> 13
 cagcaaactt atcagcaatc ataa
 25 24

<210> 14
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Bartonella sp. de Apodemus sylvaticus
 30 <400> 14
 ccttttctcc ttttagggg c
 21

<210> 15
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Bartobella sp de Meles Meles
 35 <400> 15
 gatgttttgt aaaagtgcgt cg
 40 22

<210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Bartonella sp. de Ixodes ricinus 13
 45 <400> 16
 cgctcgtcta tcgcttgata
 20

<210> 17
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Bartonella sp. de Ixodes ricinus 41
 50 <400> 17
 gcaggcactc ggcataagc
 55 19

ES 2 527 287 T3

<210> 18
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial (cebador)
5
<400> 18
ccagcgttta gcaagataag ag
22

<210> 19
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial (cebador)
10
<400> 19
gcccagtaac aacatcataa gc
22

<210> 20
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial (cebador)
15
<400> 20
cagaacgaac gctr gcggya rg
22

<210> 21
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial (cebador)
20
<400> 21
gcrttackca cccgtctgcc ac
22

<210> 22
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial (cebador)
25
<400> 22
ccttcagttm ggctggatc
19

<210> 23
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial (cebador)
30
<400> 23
gccyccttgc ggtagcaca gca
23

<210> 24
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial (cebador)
35
<400> 24
ttgataagcg tgaggtcgga gg
22

<210> 25
<211> 20

ES 2 527 287 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial (cebador)

<400> 25
5 caaagcaggt gctctcccag
 20

<210> 26
<211> 21
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial (sonda -MSP2-)

<400> 26
 ggttacgagc gcttcaagac c
 21

<210> 27
<211> 23
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial (sonda -S-RUM-)

<400> 27
20 ggacagttat ttatagcytc ggc
 23

<210> 28
<211> 18
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial (sonda -SEM-)

<400> 28
 ggaatcaaag ctgcttgc
 18

<210> 29
<211> 20
30 <212> ADN
35 <213> Secuencia artificial (sonda -S-RIS-)

<400> 29
 ggaatcaggg ctgcttgcag
 20

<210> 30
<211> 22
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial (sonda -S-MUR-)

<400> 30
 cgaacggata gctaccata gc
45 22

<210> 31
<211> 23
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial (sonda -S-PLA-)

<400> 31
 gatttttgtc gtagcttgct atg
 23

ES 2 527 287 T3

<210> 32
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial (sonda -S-CANOVIN-)
5
<400> 32
ggacaattat ttatagcctc tggc
24

<210> 33
10 <211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial (sonda -S-BARTOGEN2-)

<400> 33
15 ctcgccctta gttgccagca tt
22

<210> 34
<211> 24
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial (sonda -S-TOPO-)

<400> 34
cagtcccttt aggtccattt aatc
24

25 <210> 35
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial (sonda -S-PHO-)

30 <400> 35
ccaaagggaa aagcgtctct c
21

<210> 36
<211> 21
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial (sonda -S-RAT-)

<400> 36
gcactttgcc tcaaacacc g
21

40 <210> 37
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial (sonda -S-ROC-)
45
<400> 37
tggcctgctc ttttccctgt t
21

<210> 38
50 <211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial (sonda -CHOSCA-)

<400> 38
55 ttatgattgc tgataagttt gctg
24

ES 2 527 287 T3

<210> 39
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial (sonda -S-APO38-)
5
<400> 39
gcccctaaaa aggagaaaag g
21

<210> 40
10 <211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial (sonda -S-TEJ-)
<400> 40
cgacgcactt ttacaaaaca tc
15 22

<210> 41
20 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial (sonda -S-G-13)
<400> 41
tatcaagcga tagacgagcg
20

25 <210> 42
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial (sonda -S-G-41)
30 <400> 42
gcttatgccg agtgccctgc
19

35 <210> 43
<211> 452
<212> ADN
<213> Bartonella talpae (fragmento del espacio intergénico 16S-23S)
<400> 43

ES 2 527 287 T3

ttgataagcg tgaggtcgga ggttcaagtc ctcccaggcc caccaattta
cctatccctt 60

tgcctttatc cgtttatttg ccgatttatc agtcccttta ggtccattta
atcgggccat 120

ttataagtgt tggtaatagt ttttatcatg atggaaagtc atggttataa
aagacctgct 180

tataaaactt ataaaaggct tgtttctaga ttgtgacgct tatccatttc
gcttaggcaa 240

gagaaacttc aagcggtttg aaggcaaaat gctttgaatt ttgcaaaata
atttgaattt 300

tgcaaaataa ttcaaatttt aaagtgatcc gattgaaatct taaagtggat
tgaattttta 360

agtgatccaa gttcgtgatc tcgaatttaa aagtttcgaa tgctttatcc
tttttaggg 420

gccgtagctc agctgggaga gcacctgatt tg
452

<210> 44

<211> 427

5 <212> ADN

<213> Bartonella asilada de Melus Meles (fragmento del espacio intergénico 16S-23S)

<400> 44

ES 2 527 287 T3

ttgataagcg tgaggctcgga ggttcaagtc ctcccaggcc caccaatcac
actatgctga 60

aagctcctat gattgatcgc tttttgaata agcccttaaa ggaatttat
gatcttttat 120

aaaacttttt cccttataaa actttataaa actttcttta tgaaacttta
ttgtctcaga 180

gcattcagag agagtatgat atagcactca gaatatgata cagaaaacag
agtatgagat 240

ataaagaacg tcacctctga aattgttttt ttatcatttt aaaagtctaa
aatattctgt 300

ctctattttt aattttttaa aagcatcaga tgttttgtaa aagtgcgctg
ttttttatag 360

agcataacgt gaaagcattt taaactattt taggggccgt agctcagctg
ggagagcacc 420

tgctttg
427

<210> 45

<211> 201

<212> ADN

5 <213> Bartonella asilada de Ixodes ricinus 13 (fragmento del espacio intergénico 16S-23S)

<400> 45

ttgataagcg tgaggctcgga ggttcaagtc ctccctggcc catttccttt
agccccgggc 60

tagtagctca gttggttaga tcgaggagcg acgctcgtcg atcgcttgat
aagcgtgagg 120

tcggagggtc aagtcctccc aggcccacca tttcctata ccttacgggg
gcgtagctca 180

gctgggagag cacctgcttt g
201

10

<210> 46

<211> 186

<212> ADN

15 <213> Bartonella asilada de Ixodes ricinus 41 (fragmento del espacio intergénico 16S-23S)

<400> 46

ES 2 527 287 T3

ttgataagcg tgaggtcgga ggttcaagtc ctcccaggcc caccactcca
ttgcttacgc 60

acgtacgccc tttgggctgt gctgcgcagg cacgcggcat aagctgcgac
ggccagtcgg 120

ccttgcaag ctttgcttcg aataccttta cgggggcgta gctcagctgg
gagagcacct 180

gctttg
186

5 <210> 47
<211> 21
<212> ADN
<213> Género Anaplasma/Ehrlichia

<400> 47
catgcaagtc gaacggatta t
21

10 <210> 48
<211> 20
<212> ADN
<213> Género Anaplasma/Ehrlichia (sonda -AE-GEN-)

15 <400> 48
aidrkycgtt cgacttgcat g
20

20 <210> 49
<211> 22
<212> ADN
<213> Cannabis sativa (THC sintasa)

<400> 49
cctcctccac taaagtgtcc ac
22

30 <210> 50
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial (sonda -S-CI-2-)

<400> 50
gtggacactt tagtgaggga gg
22

35 <210> 51
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial (cebador, CI-F)

40 <400> 51
atgatgctga gggatatgtcc tac
23

45 <210> 52
<211> 21
<212> ADN

ES 2 527 287 T3

<213> Secuencia artificial (cebador, CI-R)

<400> 52

gttttctcct ccaccaccac g
21

5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la identificación simultánea y específica de bacterias causantes de zoonosis, pertenecientes a los géneros *Anaplasma/Ehrlichia* y al género *Bartonella*, que comprende las siguientes etapas:
- 10 a. Poner en contacto la muestra a analizar con una mezcla de reacción que contenga cebadores que amplifiquen de forma específica las secuencias SEQ ID NO: 1-7 de las especies de *Anaplasma/Ehrlichia* y las secuencias SEQ ID NO: 8-17 de especies de *Bartonella*, o sus respectivas secuencias complementarias,
- 10 b. Amplificar de manera simultánea las secuencias de la etapa (a) mediante reacción en cadena de la polimerasa,
- 10 c. Identificar las secuencias amplificadas de la etapa (b) usando las sondas que consisten en las SEQ ID NO: 26-42, o sus secuencias complementarias, para hibridar con las secuencias SEQ ID NO 1-17, y
- 15 d. Detectar la presencia o ausencia de bacterias causantes de zoonosis asociando las secuencias identificadas de la etapa (c) con una especie bacteriana que pertenece a los géneros *Anaplasma/Ehrlichia* o al género *Bartonella*,
- 15 en el que las especies bacterianas que pertenecen a los géneros *Anaplasma/Ehrlichia* se seleccionan de la lista que consiste en *A. phagocytophilum*, *E. ruminantium*, *E. sennetsu*, *E. risticii*, *E. muris*, *A. platys*, *E. canis* y *E. Ovina*.
- 20 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los cebadores comprenden las secuencias de las SEQ ID NO: 18-25 o sus secuencias complementarias.
- 25 3. Método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que además comprende los cebadores con secuencia SEQ ID NO: 51-52 para amplificar el control interno de amplificación del gen de THC sintasa de *Cannabis sativa*.
- 25 4. Método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que las sondas de la etapa (c) comprenden adicionalmente la sonda con secuencia SEQ ID NO: 50, capaz de hibridar con la secuencia SEQ ID NO: 49 del control de amplificación interno.
- 30 5. Sondas, cuya secuencia consiste en las SEQ ID NO: 26-32 de las especies de *Anaplasma/Ehrlichia* *A. phagocytophilum*, *E. ruminantium*, *E. sennetsu*, *E. risticii*, *E. muris*, *A. platys*, *E. canis* y *E. ovina*, y las secuencias SEQ ID NO: 33-42 de especies de *Bartonella*, o sus secuencias complementarias, siendo capaces dichas sondas de hibridar con las secuencias SEQ ID NO: 1-17 y/o con sus secuencias complementarias respectivas.
- 35 6. Un kit que comprende las sondas de acuerdo con la reivindicación 5.
7. El kit de acuerdo con la reivindicación 6, que además comprende los cebadores con secuencias SEQ ID NO: 18-25.
- 40 8. Un uso del kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, para la identificación simultánea y específica de bacterias causantes de zoonosis que pertenecen a los géneros *Anaplasma/Ehrlichia* y al género *Bartonella*, en donde las especies bacterianas del género *Anaplasma/Ehrlichia* se seleccionan de la lista que consiste en *A. phagocytophilum*, *E. ruminantium*, *E. sennetsu*, *E. risticii*, *E. muris*, *A. platys*, *E. canis* y *E. ovina*

45

FIG. 1

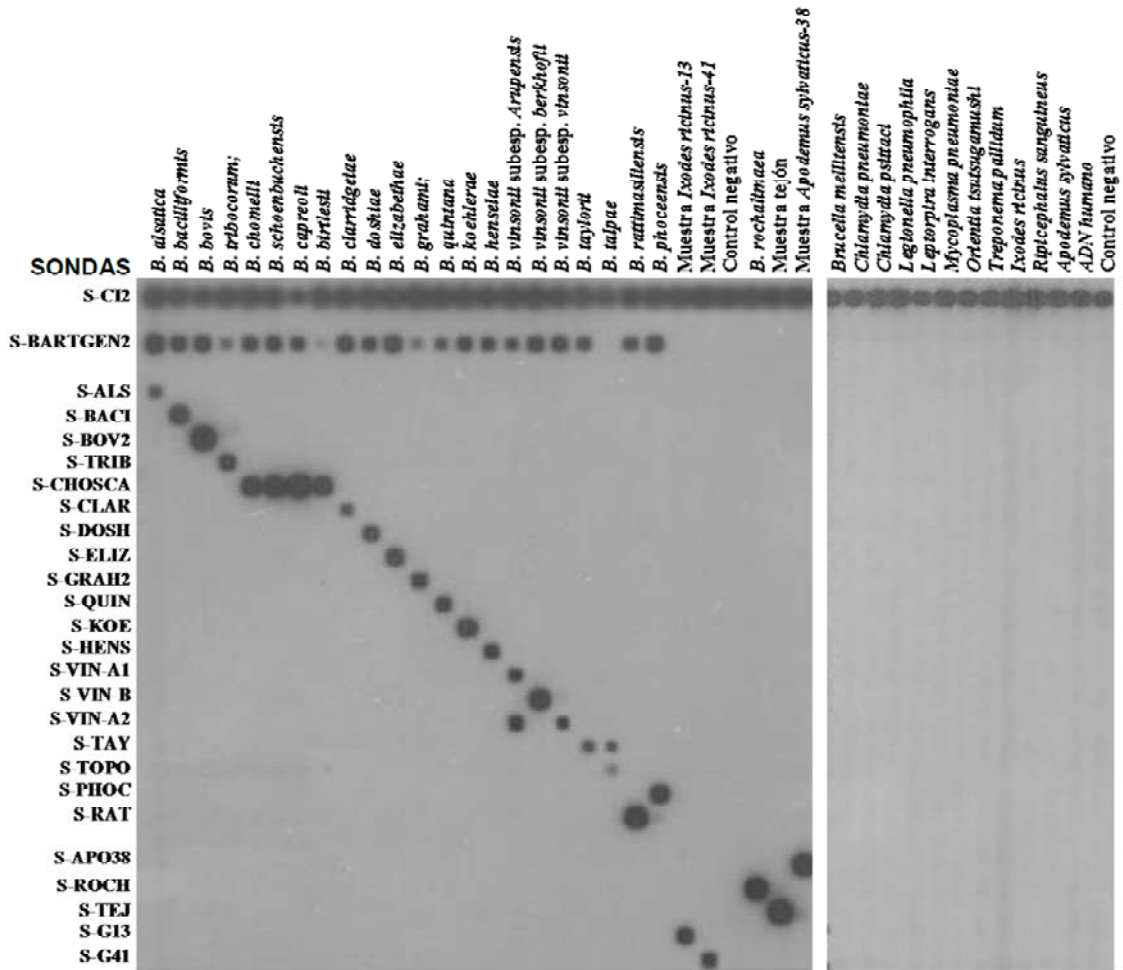


FIG. 2

