

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 327 593**

② Número de solicitud: 200701830

⑤ Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **29.06.2007**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **30.10.2009**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
30.10.2009

⑰ Solicitante/s: **Instituto de Salud Carlos III**
c/ Sinesio Delgado, 6
28029 Madrid, ES

⑱ Inventor/es: **Anda Fernández, Pedro;**
Gil Gil, Horacio;
Escudero Nieto, Raquel;
Jado García, Isabel y
Rodríguez Moreno, Isabel

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Método de identificación de especies bacterianas de los géneros *Anaplasma/Ehrlichia* y *Bartonella*.**

㉑ Resumen:

Método de identificación de especies bacterianas de los géneros *Anaplasma/Ehrlichia* y *Bartonella*.

La presente invención, referida a un método de detección e identificación de las especies bacterianas pertenecientes a los géneros *Anaplasma/Ehrlichia* y *Bartonella*. Junto con este método, la invención también proporciona los cebadores y sondas necesarios para llevarlo a cabo.

ES 2 327 593 A1

DESCRIPCIÓN

Método de identificación de especies bacterianas de los géneros *Anaplasma/Ehrlichia* y *Bartonella*.

5 La presente invención, se refiere a un método de detección e identificación de las especies bacterianas pertenecientes a los géneros *Anaplasma/Ehrlichia* y *Bartonella*. 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, en los países desarrollados determinadas zoonosis, que se extienden en aquéllos que se encuentran en vías de desarrollo, tienden a difundirse como consecuencia del aumento tráfico internacional de animales y viajeros, la concentración de la población en zonas urbanas y periurbanas, etc. 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, ocasiona que más de una zoonosis pueda ser transmitida 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 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 moleculares de diagnósticos disponibles se limitan básicamente a la detección de los patógenos mediante tecnología de anticuerpo. 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 de las alternativas para la detección e identificación de patógenos está basada en la aplicación de medios cultivo. Este tipo de técnicas son 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. Por estas circunstancias ocasionan que estas metodologías estén 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 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.

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.

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.

Breve descripción de la invención

60 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.

65 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 PCR. Concretamente, la invención permite analizar diferentes regiones del ADN bacteriano de los géneros *Anaplasma/Ehrlichia* y *Bartonella* para llevar a cabo identificaciones de género y especie, según se muestra en la siguiente tabla (Tabla 1).

5 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.

10

TABLA 1

15

ESPECIE BACTERIANA	GEN
<i>Anaplasma/Ehrlichia</i>	
<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
<i>Bartonella</i>	
Genérica	16S
<i>B. talpae</i>	16S-23S
<i>Bartonella</i> sp. *	16S-23S
<i>B. phoceensis</i>	16S-23S
<i>B. rattimasiliensis</i>	16S-23S
<i>Bartonella</i> sp. detectada en <i>Apodemus sylvaticus</i>	16S-23S
<i>B. rochalimae</i>	16S-23S
<i>Bartonella</i> sp. detectada en un tejón.	16S-23S
<i>Bartonella</i> sp* detectada en <i>Ixodes ricinus</i>	16S-23S
<i>Bartonella</i> sp detectada en <i>Ixodes ricinus</i>	16S-23S

30

35

40

45

* *B. chomeli/schoenbuchensis/capreoli/birtlesii*

50

Breve descripción de las figuras

55 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-CI2 hace referencia a la sonda empleada como CIA.

60 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-CI2 hace referencia a la sonda empleada como CIA.

65

Descripción detallada de la invención

5 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, preferentemente de manera simultánea, de cualquiera de las especies y géneros bacterianos, según se indica en las tablas 2 y 3, que comprende los siguientes pasos:

- a. amplificar cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo que comprende SEQ ID NO:1-17, 47 y/o sus secuencias complementarias mediante cebadores específicos,
- 10 b. detectar la amplificación de las secuencias del paso a), siendo dicha amplificación indicativa de la presencia o ausencia de los géneros o especies bacterianas causantes de zoonosis, según se indica en las tablas 2 y 3.

15 Los cebadores para llevar a cabo el método de la invención pueden ser diseñados por alineamiento múltiple de las secuencias que comprenden las SEQ ID NO:1-17 y 47 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 En 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), aunque preferentemente dichos cebadores tienen las secuencias seleccionadas del grupo SEQ ID NO:18-25 y/o sus secuencias complementarias, siendo éstos capaces de amplificar las SEQ ID NO:1-17, 47 y/o sus secuencias complementarias, preferentemente de manera simultánea. Estos cebadores, además de facilitar la manejabilidad del método, tienen la ventaja de presentar una baja o nula reactividad frente a muestras procedentes de otras especies (ver tabla 5).

25 En una realización aun más preferida de este aspecto de la invención, la detección de las secuencias SEQ ID NO:1-17, 47 y/o sus complementarias puede ser realizada con metodologías sobradamente conocidas en el estado de la técnica, preferentemente mediante sondas. En una realización aun más preferida, estas sondas son capaces de hibridar entre las posiciones de los genes 16S, msp2 y espacio intergénico 16S-23S, según se indica en las tablas 2 y 3, aunque preferentemente dichas sondas comprenden las secuencias seleccionadas del grupo que comprende las SEQ ID NO:26-42, 48 y/o sus complementarias.

30 Un segundo aspecto de la invención se refiere a cebadores capaces de amplificar las secuencias seleccionadas del grupo que comprende las SEQ ID NO:1-17, 47 y sus secuencias complementarias. Preferentemente, dichos cebadores son 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). En una realización todavía más preferida, los cebadores comprenden las secuencias seleccionadas del grupo SEQ ID NO:18-25 y/o sus secuencias complementarias. En adelante estos cebadores serán denominados como cebadores de la invención.

35 Un tercer aspecto de la invención se refiere a sondas capaces de detectar específicamente cualquiera de las especies y géneros bacterianos, según se indica en las tablas 2 y 3 (columna 6), donde dichas sondas son capaces de hibridar entre las posiciones nucleotídicas de los genes 16S, mp2 y el espacio intergénico 16S-23S, según se indica en las mencionadas tablas 2 y 3. En una realización todavía más preferida, las sondas tienen las secuencias seleccionadas del grupo SEQ ID NO:26-47, 48 y/o sus secuencias complementarias. En adelante estas sondas serán denominadas como sondas de la invención.

40 Un cuarto aspecto de la invención está referido 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 cualquiera de los cebadores y sondas de la invención. Además, este kit puede comprender sin ningún tipo de limitación todos aquellos reactivos, tampones, soportes, etc. que permitan la puesta a punto del mismo.

55

60

65

TABLA 2. Detección e identificación de especies del género Anaplasma/Ehrlichia

ORGANISMO	GEN	CEBADOR	SONDAS	SECUENCIAS	POSICIÓN
Anaplasma (Ehrlichia)					
<i>A. phagocytophilum</i>	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)
<i>Ehrlichia ruminantium</i>	16S	SEQ ID NO:21 SEQ ID NO:21	S-RUM (SEQ ID NO:27)	SEQ ID NO:2	DQ640401 (23-45)
<i>E. sennetsu</i>	16S	SEQ ID NO:20. SEQ ID NO:21	S-SEN (SEQ ID NO:28)	SEQ ID NO:3	M73225 (46-63)
<i>E. risticii</i>	16S	SEQ ID NO:20. SEQ ID NO:21	S-RIS (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO:4	AY005439 (46-65)
<i>E. muris</i>	16S	SEQ ID NO:20. SEQ ID NO:21	S-MUR (SEQ ID NO:30)	SEQ ID NO:5	AY587608 (16-37)
<i>A. platys</i>	16S	SEQ ID NO:20. SEQ ID NO:21	S-PLA (SEQ ID NO:31)	SEQ ID NO:6	EF139459 (53-75)
<i>E. canis/E. ovina</i>	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)
Bartonella sp. de Ixodes ricinus 13	16S-23S	SEQ ID NO:24 SEQ ID NO:25	S-G-13 (SEQ ID NO:41)	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:45 (92-111)
Bartonella sp. de Ixodes ricinus 41	16S-23S	SEQ ID NO:24 SEQ ID NO:25	S-G-41 (SEQ ID NO:42)	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:46 (86-104)

* *B. chomeli/schoenbuchensis/capreoil/birtlesii*.

Breve explicación de las tablas 2 y 3

- 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.
- 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.
- 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.

ES 2 327 593 A1

- 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.
- 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.
- 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.

Exposición 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 rRNA y los genes 16S y msp2. 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 aquellos 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 este paso se procede a realizar el análisis experimental de las zonas variables detectadas anteriormente (regiones candidatas) por 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 que previamente habían sido diseñados.

<u>Ciclos de Temperatura</u>		
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 μ L:

- H₂O: En función del volumen de ADN
- Buffer Taq Gold LD: 9 μ L
- Cl₂Mg [3 mM]: 6 μ L
- dNTPs [200 mM]: 1 μ L x 4
- BSA [0,8 ug/uL]: 4 μ L
- 8 Cebadores específicos (SEQ ID 18-25) [50 pm/ μ L]: 0,5 μ L de cada uno (7 μ L)

ES 2 327 593 A1

- Taq Gold LD: 0,5 μ L [2,5 unidades]
- ADN problema: máximo de 800 ng.

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

10 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):

- 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.

20 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.

25 *Preparación de muestras y PCR múltiple*

30 Una de las ventajas de los sistemas de identificación, basados en las tecnologías 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 grupos de especies citados en las tablas 2 y 3 (Figuras 1 y 2), se procedió a la realización de un análisis por PCR múltiple de una mezcla de ADN de control, 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.

35 Sorprendentemente, la selección de cebadores y sondas realizada consiguió la detectar simultáneamente todos los géneros y especies bacterianas propuestas, con un elevado grado de sensibilidad (10 equivalentes de genoma o copia de los fragmentos insertados en un plásmido vector) y sin que se produjese reactividad cruzada entre las diferentes especies.

40 *Detección de inhibidores de PCR*

45 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

50

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)

65 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.

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).

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

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

ES 2 327 593 A1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la detección simultánea de especies bacterianas causantes de zoonosis, pertenecientes a los géneros *Anaplasma/Ehrlichia* y *Bartonella*, que comprende los siguientes pasos:
- 10 a. Poner en contacto la muestra a analizar con una mezcla de reacción que comprenda cebadores específicos que amplifiquen las secuencias seleccionadas del grupo que comprende SEQ ID NO: 1-17 y 47 ó sus respectivas secuencias complementarias.
- 15 b. Amplificar mediante reacción en cadena de la polimerasa.
- 20 c. Identificar la formación de productos del paso anterior, siendo dicha formación indicativa de la presencia o ausencia de bacterias causantes de zoonosis.
- 2 2. Método para la detección simultánea de especies bacterianas según reivindicación 1, donde los cebadores consisten en las secuencias seleccionadas del grupo que comprende SEQ ID NO:18-25 y sus secuencias complementarias.
- 3 3. Método para la detección simultánea de especies bacterianas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde la detección de los productos de amplificación se realiza mediante sondas que consisten en las secuencias seleccionadas del grupo que comprende SEQ ID NO:26-42 y 48 y sus secuencias complementarias.
- 4 4. Cebadores cuya secuencia consiste en cualquiera de las secuencias SEQ ID NO:20-21 y sus secuencias complementarias, donde dichos cebadores permiten la amplificación de cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo que comprende SEQ ID NO: 2-7 y 47.
- 5 5. Cebadores cuya secuencia consiste en cualquiera de las secuencias SEQ ID NO:22-23 y sus secuencias complementarias, donde dichos cebadores permiten la amplificación de la secuencia que comprende la SEQ ID NO: 8.
- 6 6. Sondas cuya secuencia consiste en cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo que comprende SEQ ID NO:26-42 y 48 y sus secuencias complementarias, donde dichas sondas son capaces de hibridar con las secuencias seleccionadas del grupo que comprende SEQ ID NO:1-17 y 47 y su secuencias complementarias, según se indica en las tablas 2 y 3.
- 7 7. Kit de análisis capaz de llevar a cabo el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 8 8. Kit según la reivindicación anterior que comprende cebadores según las reivindicaciones 4 y 5.
- 9 9. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 7-8 que comprende sondas según la reivindicaciones 6.

FIG. 1

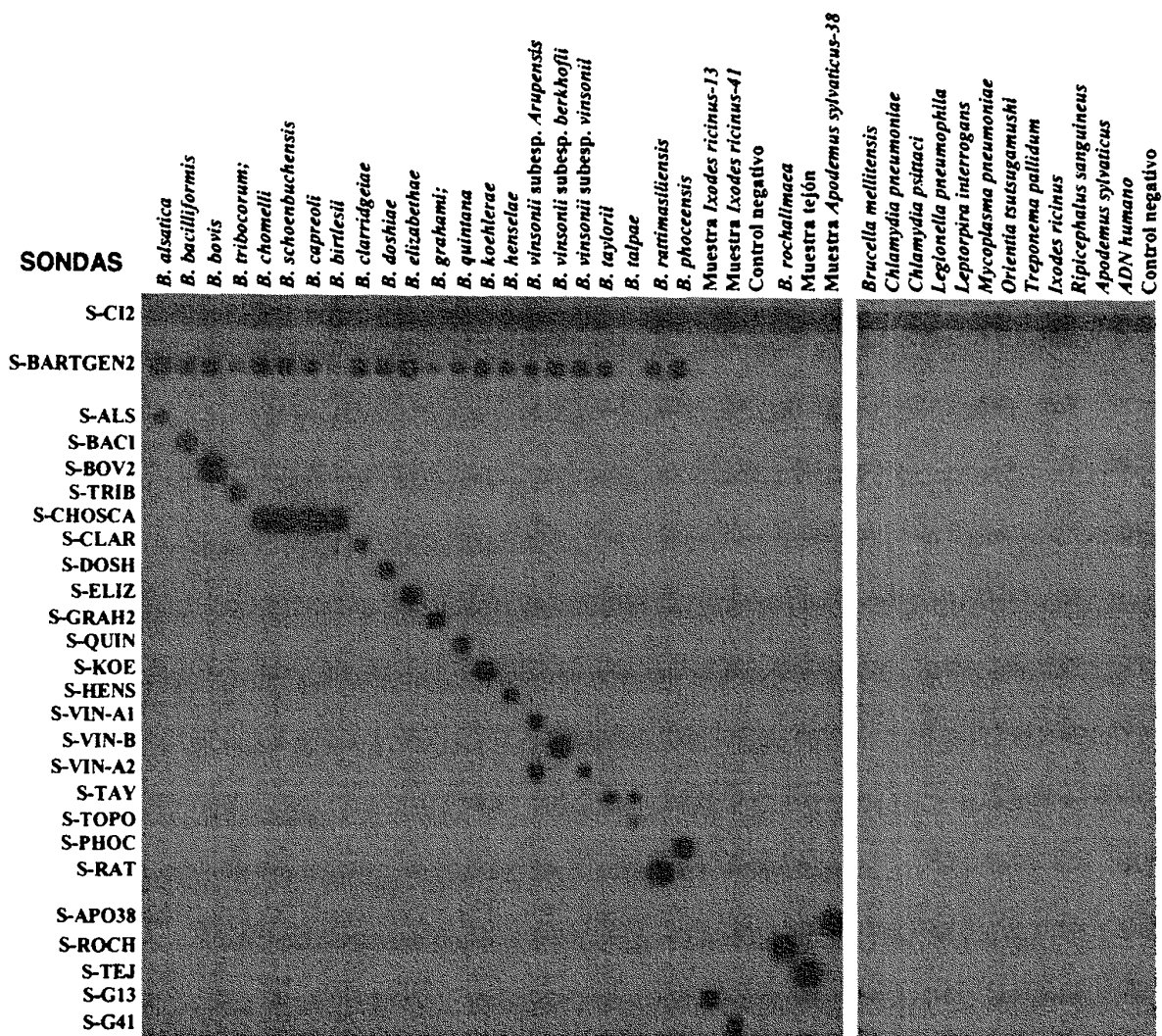
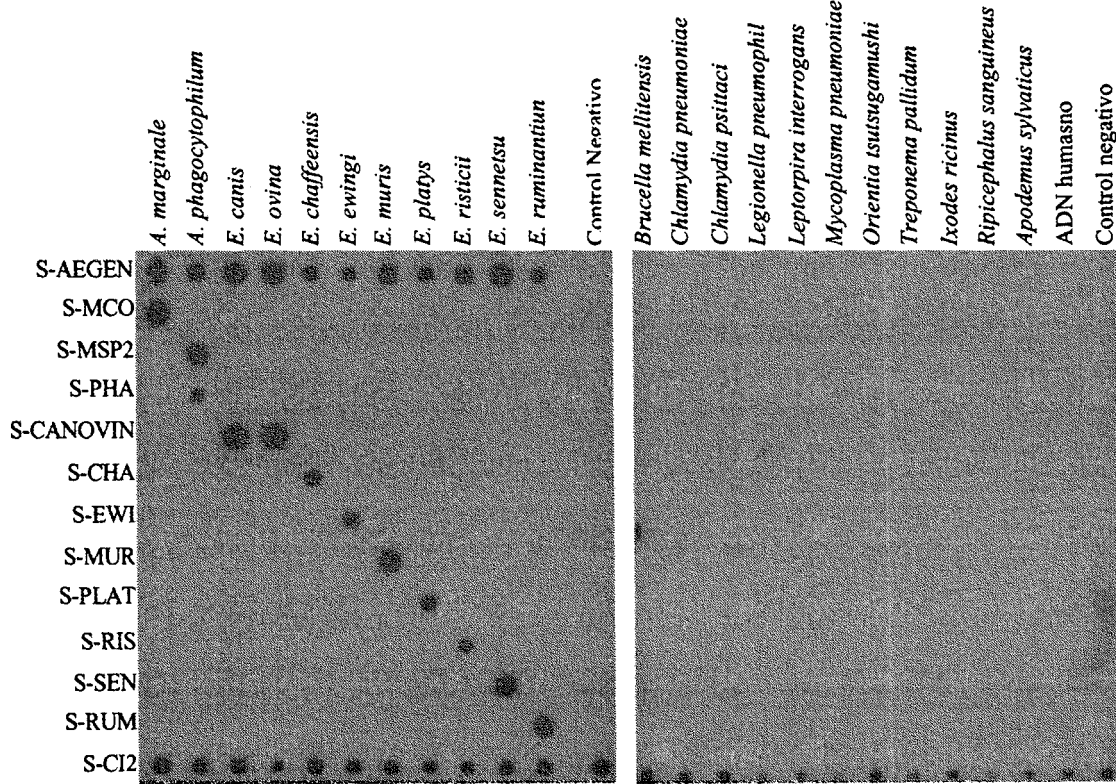


FIG. 2



ES 2 327 593 A1

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Instituto de salud Carlos III
- 5 <120> Método de detección simultánea de especies bacterianas de los géneros *Anaplasma/Ehrlichia* y *Bartonella*
- <130> ES1613.3
- 10 <160> 52
- <170> PatentIn version 3.4
- 15 <210> 1
<211> 21
<212> DNA
<213> *Anaplasma phagocytophium*
- 20 <400> 1

 ggtcttgaag cgctcgtaac c 21
- 25 <210> 2
<211> 23
<212> DNA
<213> *Ehrlichia ruminantium*
- 30 <400> 2

 gccgargcta taaataactg tcc 23
- 35 <210> 3
<211> 18
<212> DNA
<213> *Ehrlichia sennetsu*
- 40 <400> 3

 gcaagcagct ttgattcc 18
- 45 <210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> *Ehrlichia risticii*
- 50 <400> 4

 ctgcaagcag ccttgattcc 20
- 55 <210> 5
<211> 22
<212> DNA
<213> *Ehrlichia muris*
- 60 <400> 5
- 65

ES 2 327 593 A1

	<400> 5	
	cgaacggata gctaccata gc	22
5	<210> 6	
	<211> 23	
	<212> DNA	
10	<213> <i>Anaplasma platys</i>	
	<400> 6	
15	catagcaagc tacgacaaaa atc	23
	<210> 7	
	<211> 24	
20	<212> DNA	
	<213> <i>Ehrlichia canis/Ehrlichia ovina</i>	
	<400> 7	
25	gccagaggct ataaataatt gtcc	24
	<210> 8	
30	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> <i>Bartonella</i> sp.	
35	<400> 8	
	aatgctggca actaaggcg ag	22
40	<210> 9	
	<211> 24	
	<212> DNA	
45	<213> <i>Bartonella talpae</i>	
	<400> 9	
50	gattaaatgg acctaaaggg actg	24
	<210> 10	
	<211> 21	
	<212> DNA	
55	<213> <i>Bartonella phoceensis</i>	
	<400> 10	
60	gagagacgct tttcccttg g	21
	<210> 11	
	<211> 21	
65	<212> DNA	
	<213> <i>Bartonella rattimasiliensis</i>	

ES 2 327 593 A1

	<i><400></i> 11	
	cggtgttttg aggcaaagtg c	21
5	<i><210></i> 12	
	<i><211></i> 21	
	<i><212></i> DNA	
10	<i><213></i> <i>Bartonella rochalimae</i>	
	<i><400></i> 12	
15	aacagggaaa agagcaggcc a	21
	<i><210></i> 13	
	<i><211></i> 24	
20	<i><212></i> DNA	
	<i><213></i> <i>Bartonella</i> sp. * (<i>B. chomeli/schoenbuchensis/capreoli/birtlesii</i>)	
	<i><400></i> 13	
25	cagcaaactt atcagcaatc ataa	24
	<i><210></i> 14	
30	<i><211></i> 21	
	<i><212></i> DNA	
	<i><213></i> <i>Bartonella</i> sp.	
35	<i><400></i> 14	
	cctttctcc ttttagggg c	21
40	<i><210></i> 15	
	<i><211></i> 22	
	<i><212></i> DNA	
45	<i><213></i> <i>Bartobella</i> sp de <i>Meles Meles</i>	
	<i><400></i> 15	
50	gatgtttgt aaaagtgcgt cg	22
	<i><210></i> 16	
	<i><211></i> 20	
	<i><212></i> DNA	
55	<i><213></i> <i>Bartonella</i> sp. de <i>Ixodes ricinus</i> 13	
	<i><400></i> 16	
60	cgctcgtcta tcgcttgata	20
	<i><210></i> 17	
65	<i><211></i> 19	
	<i><212></i> DNA	
	<i><213></i> <i>Bartonella</i> sp. de <i>Ixodes ricinus</i> 41	

ES 2 327 593 A1

	<400> 17	
	gcaggcactc ggcataagc	19
5	<210> 18	
	<211> 22	
	<212> DNA	
10	<213> secuencia artificial (cebador)	
	<400> 18	
15	ccagcgttta gcaagataag ag	22
	<210> 19	
	<211> 22	
20	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial (cebador)	
	<400> 19	
25	gccagtaac aacatcataa gc	22
	<210> 20	
30	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> secuencia artificial (cebador)	
35	<400> 20	
	cagaacgaac gctr gcggya rg	22
40	<210> 21	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> secuencia artificial (cebador)	
45	<400> 21	
	gerttackca cccgtctgcc ac	22
50	<210> 22	
	<211> 19	
	<212> DNA	
55	<213> secuencia artificial (cebador)	
	<400> 22	
60	ccttcagttm ggctggatc	19
	<210> 23	
	<211> 23	
65	<212> DNA	
	<213> secuencia artificial (cebador)	

ES 2 327 593 A1

	<code><400> 23</code>		
	<code>gccyccttgc ggtagcaca gca</code>		23
5	<code><210> 24</code>		
	<code><211> 22</code>		
	<code><212> DNA</code>		
10	<code><213> secuencia artificial (cebador)</code>		
	<code><400> 24</code>		
15	<code>ttgataagcg tgaggtcggg gg</code>		22
	<code><210> 25</code>		
	<code><211> 20</code>		
20	<code><212> DNA</code>		
	<code><213> secuencia artificial (cebador)</code>		
	<code><400> 25</code>		
25	<code>caaagcaggt gctctcccag</code>		20
	<code><210> 26</code>		
30	<code><211> 21</code>		
	<code><212> DNA</code>		
	<code><213> Secuencia artificial (sonda -MSP2-)</code>		
35	<code><400> 26</code>		
	<code>ggttacgagc gctcaagac c</code>		21
40	<code><210> 27</code>		
	<code><211> 23</code>		
	<code><212> DNA</code>		
	<code><213> Secuencia artificial (sonda -S-RUM-)</code>		
45	<code><400> 27</code>		
	<code>ggacagttat ttatagcytc ggc</code>		23
50	<code><210> 28</code>		
	<code><211> 18</code>		
	<code><212> DNA</code>		
55	<code><213> Secuencia artificial (sonda -SEM-)</code>		
	<code><400> 28</code>		
60	<code>ggaatcaaag ctgcttgc</code>		18
	<code><210> 29</code>		
	<code><211> 20</code>		
65	<code><212> DNA</code>		
	<code><213> Secuencia artificial (sonda -S-RIS-)</code>		

ES 2 327 593 A1

	<400> 29	
	ggaatcaggg ctgcttgca	20
5	<210> 30	
	<211> 22	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia artificial (sonda -S-MUR-)	
	<400> 30	
15	cgaacggata gctaccata gc	22
	<210> 31	
	<211> 23	
20	<212> DNA	
	<213> secuencia artificial (sonda -S-PLA-)	
	<400> 31	
25	gattttgtc gtagctgct atg	23
	<210> 32	
30	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> secuencia artificial (sonda -S-CANOVIN-)	
35	<400> 32	
	ggacaattat ttatagcctc tggc	24
40	<210> 33	
	<211> 22	
	<212> DNA	
45	<213> secuencia artificial (sonda -S-BARTOGEN2-)	
	<400> 33	
50	ctgccctta gttgccagca tt	22
	<210> 34	
	<211> 24	
	<212> DNA	
55	<213> Secuencia artificial (sonda -S-TOPO-)	
	<400> 34	
60	cagtcccttt aggtccattt aatc	24
	<210> 35	
	<211> 21	
65	<212> DNA	
	<213> secuencia artificial (sonda -S-PHO-)	

ES 2 327 593 A1

	<400> 35	
	ccaaagggaa aagcgtctct c	21
5	<210> 36	
	<211> 21	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia artificial (sonda -S-RAT-)	
	<400> 36	
15	gcactttgcc tcaaacacc g	21
	<210> 37	
	<211> 21	
20	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial (sonda -S-ROC-)	
	<400> 37	
25	tggcctgctc tttccctgt t	21
	<210> 38	
30	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial (sonda -CHOSCA-)	
35	<400> 38	
	ttatgattgc tgataagttt gctg	24
40	<210> 39	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> secuencia artificial (sonda -S-APO38-)	
45	<400> 39	
50	gccctaaaa aggagaaaag g	21
	<210> 40	
	<211> 22	
	<212> DNA	
55	<213> Secuencia artificial (sonda -S-TEJ-)	
	<400> 40	
60	cgacgcactt ttacaaaca tc	22
	<210> 41	
	<211> 20	
65	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial (sonda -S-G-13)	

ES 2 327 593 A1

	<400> 41		
	tatcaagcga tagacgagcg		20
5	<210> 42		
	<211> 19		
	<212> DNA		
10	<213> secuencia artificial (sonda -S-G-41)		
	<400> 42		
15	gcttatgccg agtgcctgc		19
	<210> 43		
	<211> 452		
20	<212> DNA		
	<213> <i>Bartonella talpae</i> (fragmento del espacio intergénico 16S-23S)		
	<400> 43		
25	ttgataagcg tgaggtcgga ggttcaagtc ctcccaggcc caccaattta cctatccctt		60
	tgccctttatc cgttttattg ccgatttatac agtcccttta ggtccattta atcgggtccat		120
30	ttataagtgt tggtaatagt ttttatcatg atggaaagtc atggttataa aagacctgct		180
	tataaaactt ataaaaggct tgtttctaga ttgtgacgct tatccatttc gcttaggcaa		240
35	gagaaacttc aagcggtttg aaggcaaaat gctttgaatt ttgcaaaata atttgaattt		300
	tgcaaaataa ttcaaatttt aaagtgatcc gattgaatct taaagtggat tgaattttaa		360
	agtgatccaa gttcgtgatc tcgaatttaa aagtttcgaa tgctttatcc ttttttaggg		420
40	gccgtagctc agctgggaga gcacctgatt tg		452
	<210> 44		
	<211> 427		
45	<212> DNA		
	<213> <i>Bartonella asilada</i> de <i>Melus Meles</i> (fragmento del espacio intergénico 16S-23S)		
	<400> 44		
50	ttgataagcg tgaggtcgga ggttcaagtc ctcccaggcc caccaatcac actatgctga		60
	aagctcctat gattgatcgc tttttgaata agcccttaa ggaatttat gatcttttat		120
55	aaaacttttt cccttataaa actttataaa actttcttta tgaaacttta ttgtctcaga		180
	gcattcagag agagtatgat atagcactca gaatatgata cagaaaacag agtatgagat		240
60	ataaagaacg tcacctctga aattgttttt ttatcatttt aaaagtctaa aatattctgt		300
	ctctattttt aattttttaa aagcatcaga tgttttgtaa aagtgcgctg ttttttatag		360
	agcataacgt gaaagcattt taaactattt taggggccgt agctcagctg ggagagcacc		420
65	tgctttg		427

ES 2 327 593 A1

	<210> 45		
	<211> 201		
	<212> DNA		
5	<213> <i>Bartonella asilada</i> de <i>zxodes ricinus</i> 13 (fragmento del espacio intergénico 16S-23S)		
	<400> 45		
10	ttgataagcg tgaggtcgga ggttcaagtc ctccctggcc catttccttt agccccgggc	60	
	tagtagctca gttggttaga tcgaggagcg acgctcgtcg atcgcttgat aagcgtgagg	120	
15	tcggaggttc aagtcctccc aggccaccca tattcctata ccttacgggg gcgtagctca	180	
	gctgggagag cacctgcttt g	201	
20	<210> 46		
	<211> 186		
	<212> DNA		
	<213> <i>Bartonella asilada</i> de <i>zxodes ricinus</i> 41 (fragmento del espacio intergénico 16S-23S)		
25	<400> 46		
30	ttgataagcg tgaggtcgga ggttcaagtc ctcccaggcc caccactcca ttgcttacgc	60	
	acgtacgccc tttgggctgt gctgcgcagg cacgcggcat aagctgcgac ggccagtcgg	120	
	ccttgcaag ctttgcttcg aataccttta cgggggcgta gctcagctgg gagagcacct	180	
35	gctttg	186	
40	<210> 47		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> Género <i>Anaplasma/Ehrlichia</i>		
45	<400> 47		
	catgcaagtc gaacggatta t		21
50	<210> 48		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> Género <i>Anaplasma/Ehrlichia</i> (sonda -AE-GEN-)		
55	<400> 48		
	adrkycgttc gacttgcattg		20
60	<210> 49		
	<211> 22		
	<212> DNA		
65	<213> <i>Cannabis sativa</i> (THC sintasa)		

ES 2 327 593 A1

<400> 49	
cctcctccac taaagtgccc ac	22
5	
<210> 50	
<211> 22	
<212> DNA	
10 <213> secuencia artificial (sonda -S-CI-2-)	
<400> 50	
15 gtggacactt tagtggagga gg	22
<210> 51	
<211> 23	
20 <212> DNA	
<213> secuencia artificial (cebador, CI-F)	
<400> 51	
25 atgatgctga gggatgtccc tac	23
<210> 52	
30 <211> 21	
<212> DNA	
<213> Secuencia artificial (cebador, CI-R)	
35 <400> 52	
gttttctct ccaccaccac g	21
40	
45	
50	
55	
60	
65	



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 327 593

② Nº de solicitud: 200701830

③ Fecha de presentación de la solicitud: **29.06.2007**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** **C12Q 1/68** (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	Base de datos GeneSeq. [On line] 22.03.2007. ANDA, P., et al.: "Anaplasma/Ehrlichia 16S rRNA PCR primer 16S/AE-F, SEQ:1." Recuperado de EBI; nº de acceso GSN:AEM74241. Todo el documento.	4
X	Base de datos GeneSeq. [On line] 22.03.2007. ANDA, P., et al.: "Anaplasma/Ehrlichia 16S rRNA PCR primer 16S/AE-F, SEQ:2." Recuperado de EBI; nº de acceso GSN:AEM74242. Todo el documento.	4
Y	ES 2264642 A1 (ANDA, P., et al.) 01.01.2007, todo el documento.	1-9
Y	LEVIN, M.L., et al. Reinfection with Anaplasma phagocytophilum in BALB/c mice and cross-protection between two sympatric isolates. Infection and immunity. Agosto 2004, vol. 72, nº 4, páginas 4723-4730. ISSN 0019-9567. Ver resumen y página 4725.	1-9
Y	SCHOULS, L. M., et al. Detection and identification Ehrlichia, Borrelia burgdorferi Senu Lato, and Bartonella species in dutch Ixodes ricinus ticks. Journal of Clinical Microbiology. 01.07.1999. Vol. 37, nº 7, páginas 2215-2222. ISSN 0095-1137. Ver todo el documento, especialmente resumen y tabla 1.	1-9
Y	MASSUNG, R. F., et al. Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, Anaplasma phagocytophilum. Journal of Clinical Microbiology. 01.02.2003. Vol. 41, nº 2, páginas 717-722. ISSN 0095-1137. Ver resumen, tabla 1 y figuras 1, 2 y 3.	1-9

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
15.10.2009

Examinador
B. Pérez Esteban

Página
1/6



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 327 593

② Nº de solicitud: 200701830

③ Fecha de presentación de la solicitud: 29.06.2007

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C12Q 1/68 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	SHUKLA, S. K., et al. Importance of primer specificity for PCR detection of Anaplasma phagocytophila among Ixodes scapularis ticks from Wisconsin. Journal of clinical microbiology. Agosto 2003. Vol. 41, nº 8, página 4006. ISSN 0095-1137. Ver todo el documento.	1-9
Y	COURTNEY, J. W., et al. Multiplex real-time PCR for detection of anaplasma phagocytophilum and Borrelia burgdorferi. Journal of clinical microbiology. Julio 2004. Vol. 42, nº 7, páginas 3164-3168. ISSN 0095-1137. Ver todo el documento.	1-9
A	CHRISTOVA, I., et al. Identification of Borrelia burgdorferi sensu lato, Anaplasma and Ehrlichia species, and spotted fever group Rickettsiae in ticks from Southeastern Europe. European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 21.08.2003. Vol. 22, nº 9, páginas 535-542. ISSN 0934-9723. Ver todo el documento.	1-9

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

15.10.2009

Examinador

B. Pérez Esteban

Página

2/6

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

C12Q

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

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP, EBI (EMBL All, EMBLproc, naGeneSeq), REGISTRY

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 15.10.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-3, 6-9	SÍ
	Reivindicaciones	4, 5	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones		SÍ
	Reivindicaciones	1-9	NO

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

Base de la Opinión:

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

1. Documentos considerados:

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	GSN:AEM74241	22-03-2007
D02	GSN:AEM74242	22-03-2007
D03	ES 2264642 A1	01-01-2007
D04	LEVIN, M.L., et al.	08-2004
D05	SCHOULS, L. M., et al.	01-07-1999
D06	MASSUNG, R. F., et al.	01-02-2003
D07	SHUKLA, S. K., et al.	08-2003
D08	COURTNEY, J. W., et al.	07-2004
D09	CHRISTOVA, I., et al.	21-08-2003

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la presente solicitud de patente es un método para la detección simultánea de especies bacterianas causantes de zoonosis de los géneros *Anaplasma*/*Ehrlichia* y *Bartonella*. Dicho método se basa en la amplificación por PCR de genes específicos de las bacterias, y en la detección de los productos de amplificación mediante hibridación con sondas específicas. Además del método, la patente reivindica los oligonucleótidos y sondas empleados.

Los documentos D01 y D02 divulgan las secuencias de los cebadores SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21, por lo que la reivindicación 4 carece de novedad según el artículo 6 de la Ley de Patentes.

El documento D05 divulga la secuencia del cebador SEQ ID NO: 22, y, por consiguiente, la reivindicación 5 tampoco es nueva.

El documento D03 se considera el más cercano del estado de la técnica. En él se emplea el mismo método de la solicitud (PCR múltiple seguida de hibridación por RLB) para detectar e identificar varias especies bacterianas causantes de zoonosis, incluyendo las especies de la solicitud (*Anaplasma*/*Ehrlichia* y *Bartonella*). Los cebadores y sondas utilizados en la patente D03 se diseñan a partir de las secuencias del gen 16S para las especies de *Ehrlichia*, y de la región intergénica 16S-23S para las especies de *Bartonella* (tablas 1 y 2), igual que se describe en la presente solicitud de patente.

La diferencia entre estos dos documentos está en el diseño de los cebadores y sondas empleados para la detección de la especie *Anaplasma*, que en D03 se basa en secuencias del gen 16S, mientras que en la solicitud se trata de secuencias del gen *msh2*. Dado que en D03 se consigue en cualquier caso la detección de *Anaplasma* con el empleo de las secuencias 16S, el problema técnico al que se enfrentaría el experto en la materia sería la búsqueda de genes alternativos para detectar esta especie bacteriana utilizando el método de la invención.

En el estado de la técnica se han encontrado numerosos documentos en los que se utilizan secuencias del gen *msh2* para detectar e identificar bacterias del género *Anaplasma*. Así, en el documento D04 (página 4725, 1ª columna, 3er párrafo) se divulgan las secuencias de los oligonucleótidos *msh2-3f* y *msh2-3r* (que corresponden a las SEQ ID NO: 18 y 19 de la presente solicitud), y se emplean para detectar *Anaplasma phagocytophilum* mediante PCR en muestras aisladas de ratones infectados con la bacteria.

Por tanto, se considera que el experto en la materia elegiría el gen *msh2* como solución al problema técnico planteado anteriormente. Por tanto, la reivindicación 1 de la solicitud no cumple el requisito de actividad inventiva del artículo 8 de la Ley de Patentes.

Las reivindicaciones dependientes 2 y 3 especifican oligonucleótidos y sondas para ser usados en el método de la reivindicación 1. El diseño de oligonucleótidos y sondas para genes conocidos es una técnica ampliamente utilizada, y, por ello, las reivindicaciones 2 y 3 tampoco tendrían actividad inventiva.

Hoja adicional

Tampoco las reivindicaciones 4 a 6 cumplen el requisito del artículo 8 de la Ley de Patentes. En ellas se reivindican las secuencias de los oligonucleótidos y sondas empleados en el método de la solicitud. Puesto que el método no es nuevo, ni tampoco los genes a partir de los cuales se diseñan las secuencias reivindicadas (como se pone de manifiesto en los documentos D03 y D04), sería evidente para el experto en la materia diseñar los oligonucleótidos y sondas necesarios para llevar a cabo el método reivindicado, puesto que estas técnicas forman parte del conocimiento general en este campo técnico.

Por último, las reivindicaciones 7 a 9 de la presente solicitud tampoco tienen actividad inventiva, ya que la creación de un kit a partir de componentes conocidos para llevar a cabo un método también conocido, es una práctica habitual que no supondría un esfuerzo inventivo para el experto en la materia.

En el documento D05 se emplea un ensayo de PCR seguido de una hibridación específica (técnica de RLB) para detectar distintas especies bacterianas, entre ellas *Anaplasma/Ehrlichia* y *Bartonella*, las bacterias de la solicitud. Se trata, por tanto, del mismo método que el reivindicado en la presente solicitud. De hecho, una de las secuencias reivindicadas en la solicitud (SEQ ID NO: 22), se encuentra divulgada en la Tabla 1 de D05 que, de esta manera, anticiparía la novedad de la reivindicación 5. El resto de secuencias de oligonucleótidos y sondas se diseñan a partir de los genes 16S (ver Tabla 1).

El documento D06 describe nuevamente un método basado en la técnica de PCR para detectar *Anaplasma phagocytophilum* en líneas celulares humanas infectadas, y en el estudio se incluyen otras bacterias, como *Ehrlichia* y *Bartonella*. Las secuencias empleadas en el método son las de los genes 16S y *msp2* (Tabla 1 y Figuras 1, 2 y 3).

Siguiendo el mismo razonamiento explicado anteriormente, se considera evidente para el experto en la materia la combinación de los documentos D05 y D06 para llegar al método, oligonucleótidos, sondas y kits reivindicados en la presente solicitud. Por tanto, las reivindicaciones 1 a 9 no tienen actividad inventiva según el artículo 8 de la Ley de Patentes.

El mismo razonamiento aplica en el caso de los documentos D07 y D08. En el primer documento se detectan e identifican bacterias de los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia* y *Bartonella* mediante amplificación por PCR e hibridación por Southern utilizando oligonucleótidos y sondas derivados de los genes 16S, y en el segundo documento se divulgan secuencias del gen *msp2* específicas de *Anaplasma phagocytophilum* que, aunque diferentes de las de la solicitud, sirven igualmente para detectar la bacteria mediante el método reivindicado.

La combinación de los documentos D07 y D08, evidente para el experto en la materia, supone que la presente solicitud no cumple el requisito de actividad inventiva del artículo 8 de la Ley de Patentes.

Finalmente, el documento D09 consiste en la utilización de técnicas de PCR y RLB para determinar la presencia de bacterias de los géneros *Borrelia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma* y *Rickettsia* en garrapatas y estudiar el porcentaje de cada una de estas bacterias en las muestras. Con este método se detectan secuencias de los genes ribosomales (16S y 5S-23S). Aunque las técnicas empleadas son las mismas que las de la presente solicitud, no se considera que el documento D09 afecte la novedad ni la actividad inventiva de la misma, puesto que no se detectan las mismas especies bacterianas, y tampoco coinciden los genes amplificados, y no se emplea el gen *msp2* en la detección de *Anaplasma*.